



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Delimitación de las especies mexicanas de arañas del género *Loxosceles* Heineken y Lowe (Araneae, Sicariidae) del Centro Occidente de México con evidencia molecular y morfológica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Claudia Isabel Navarro Rodríguez

Codirectores

Dr. Alejandro Valdez Mondragón

Dr. Oscar Federico Francke Ballvé

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Delimitación de las especies mexicanas de arañas del género *Loxosceles* Heineken y Lowe (Araneae, Sicariidae) del Centro Occidente de México con evidencia molecular y morfológica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Claudia Isabel Navarro Rodríguez

Comité tutorial

Dr. Alejandro Valdez Mondragón

Dr. Oscar Federico Francke Ballvé

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Alejandro Zaldívar Riverón

M. en C. Alejandro Kong Luz

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2019

Hoja de financiamiento

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Aracnología Tlaxcala (LATLAX) del Instituto de Biología de la UNAM sede Tlaxcala, financiado por el proyecto de Ciencia Básica CONACyT 2016 No.: 282834, titulado: “Arañas de Importancia Medica: Taxonomía integrativa basada en evidencia molecular y morfológica para la delimitación de las especies de arañas mexicanas de arañas violinistas del género *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae)-Etapa 1”.

Cabe mencionar que la Maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional del Posgrado (PNP).



Universidad
Autónoma de
Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Claudia Isabel Navarro Rodríguez** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Delimitación de las especies mexicanas de arañas del género *Loxosceles* Heineken & Lowe (*Araneae, Sicariidae*) del centro Occidente de México con evidencia molecular y morfológico”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., 26 DE NOVIEMBRE 2019

DR. ALEJANDRO VALDEZ MONDRAGÓN

F. Aldivar R. Riverón

DR. OSCAR FEDERICO FRANCKE BALLVÉ

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN

M.C. ALEJANDRO KONG LUZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Agradecimientos

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC)** y a la **Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)**, por las facilidades otorgadas para cursar mis estudios de maestría, gracias por los conocimientos compartidos.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo con la beca número: 855438, para poder realizar mis estudios de maestría en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

A los **miembros de mi comité**: al Dr. Alejandro Valdez Mondragón, Dr. Oscar Federico Francke Ballvé, Dra. Alba Mónica Montiel González, Dr. Alejandro Zaldívar Riverón, M. en C. Alejandro Kong Luz y al Dr. Arturo Estrada Torres gracias por sus comentarios, observaciones, correcciones y aportaciones que ayudaron a mejorar considerablemente este trabajo. Muchas gracias por su tiempo y dedicación.

Al **Laboratorio de Aracnología (LATLAX)** del IBUNAM, sede Tlaxcala, por convertirse en mi hogar durante estos dos años y en especial al Dr. Alejandro Valdez Mondragón por abrir las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de ser parte de este gran equipo.

Al **Instituto de Biología (IBUNAM)** y a la **Colección Nacional de Arácnidos (CNAN)**, especialmente al Dr. Oscar F. Francke Ballvé por el préstamo del material de *Loxosceles*.

Al **Laboratorio de Biología Molecular** del IBUNAM, en especial a la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín, por su apoyo y asesoría con el trabajo molecular.

Al **Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud** del IBUNAM, en especial a la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar y a la M. en C. Nelly María López Ortiz, LaNaBio.

Agradecimientos personales

A mis padres, por todo su amor y apoyo, por siempre apoyar mis decisiones, dejarme volar y darme todo el amor a pesar de estar lejos, los amo y espero algún día retribuir todo lo que han hecho por mí, sin duda todos mis logros son gracias a ustedes y para ustedes.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional, por las porras y los ánimos que siempre me dan, los quiero mucho “changuitos”: Mari, Ale (chulas) y Marcos (negrito).

A Jared (Saurio) por el amor que siempre me diste, por tu apoyo en todos los aspectos, por respetar mi decisión de partir y por darme ánimos para continuar con mi pasión, mil gracias, por tanto.

Al **Dr. Fabio G. Cupul Magaña**, por apoyarme en mi decisión de continuar con las arañas y por recomendarme con el Dr. Alejandro Valdez Mondragón.

Al **M. en C. Diego A. Barrales Alcalá**, por los consejos durante la maestría y por su apoyo con el material de ejemplares de *Loxosceles*, ¡¡Gracias Diego!!

Al **Dr. Rodrigo Monjaraz Ruedas** por su ayuda con el manejo de software, gracias Rodrigo, por el tiempo y apoyo.

A mis “**Chicas Toxicas**” Alma, Pau y May, mil gracias por su apoyo. Alma gracias por adoptarme, hiciste mis puentes menos solitarios, mi “Mimi”. Pau gracias por tu compañía, aunque casi no nos veíamos en casa jajaja, por lo menos no me sentía tan sola, eres una buena “roomie”. Maaay gracias por tu amistad, por el apoyo con las localidades y con los mapas. Gracias chicas, por su compañía y los buenos momentos compartidos.

A **José Cruz Valerdi Tlachi** († descansa en paz), infinitas gracias por tu apoyo siempre, desde campo hasta en lo personal, hasta el cielo “Cucho”.

A mis compañeros de la maestría: **Juanita, Saul y Raúl (“Los aules”)**, **Luis e Iván** gracias por su amistad, por el apoyo que me brindaron y los por los buenos e inolvidables momentos.

Un agradecimiento especial al **Dr. Alejandro Valdez Mondragón**, por su apoyo durante la maestría, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por los buenos momentos, las bromas, las salidas a campo y por compartir sus conocimientos conmigo, siempre estaré agradecida.

A todas las personas que de alguna u otra manera colaboraron con la realización de esta tesis, por ahora no pude nombrarlos a todos, pero les agradezco de corazón.

¡¡INFINITAS GRACIAS A TODOS!!

¡Jalisco no se rajó!

Dedicatoria

A mis padres: Elena y Acevedo

A mis hermanos: Ale, Mark y Mery y al pequeño Santi

Con amor

Isa

RESUMEN

El género de arañas *Loxosceles* está conformado actualmente por 140 especies descritas a nivel mundial, siendo México el país con la mayor riqueza en el mundo con 40 especies descritas. Las hembras del género presentan una amplia variación morfológica en las estructuras sexuales, lo cual complica su identificación con base en taxonomía tradicional. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue delimitar las especies del género *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México, con base un criterio de taxonomía integradora (morfológica y evidencia molecular). Se utilizó un gen mitocondrial (Citocromo *c* Oxidasa subunidad 1; CO1) y uno nuclear (Espaciador Interno Transcrito 2; ITS2). Los análisis de delimitación de especies se llevaron a cabo utilizando cuatro métodos diferentes: 1) distancias (*p*) corregidas con Neighbor Joining (NJ), 2) Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), 3) Automatic Barcode Gap Discovery (GMYC) y 4) Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP). Los métodos de delimitación de especies utilizados recuperaron para CO1 (674 pb) y para el análisis concatenado CO1+ITS2 (1109 pb) un total de nueve especies: 1. *L. colima*, 2. *L. jaca* 3. *L. malintzi*, 4. *L. misteca*, 5. *L. nahuana*, 6. *L. tenango*, 7. *L. tenochtitlan*, 8. *L. sp. 1* y 9. *L. zapoteca*. Para ITS2 (435 pb), el número de especies delimitadas difirió con cada método. La distancia (*p*) genética media entre las especies analizadas fue de 15.9% para CO1 y 8.4% para ITS2. Para CO1, los cuatro métodos utilizados se corroboraron conjuntamente con la delimitación morfológica, nueve especies de *Loxosceles* para la Región Centro-Occidente, incluidas dos especies nuevas para la ciencia: *L. sp. 1* y *L. tenochtitlan*, la primera en proceso de descripción y la segunda descrita recientemente. Para los datos morfológicos, se revisaron estructuras sexuales con importancia taxonómica en machos (pedipalpos), y en hembras (receptáculos seminales), analizando su variación morfológica. En el caso de los receptáculos seminales, se observó que para una misma especie la variación es notoria. Esta variación en receptáculos seminales está presente en ocho de las nueve especies de *Loxosceles* examinadas, lo cual complica su identificación basada solo en hembras. De esta manera, se utilizaron los pedipalpos de los machos al presentar poca o nula variación, considerándose caracteres taxonómicamente robustos para la identificación de especies. Concluimos que la evidencia morfológica y molecular dentro de un contexto de taxonomía integradora, son evidencias suficientes hasta el momento para la delimitación de especies del género *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México.

ÍNDICE

RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
Generalidades	3
1.1 Diversidad y clasificación de arañas a nivel mundial	3
1.2 Morfología general de arañas	5
1.3. Diversidad de arañas en México	10
1.4 Diversidad y clasificación del género <i>Loxosceles</i>	13
1.5 Morfología y biología general del género <i>Loxosceles</i>	16
1.6 Historia taxonómica de <i>Loxosceles</i> y distribución en México	24
1.7. Herramientas moleculares para la delimitación de especies	29
2. ANTECEDENTES.....	32
2.1 Delimitación de especies de arañas con herramientas moleculares	32
2.2 Delimitación de especies con marcadores moleculares en el género <i>Loxosceles</i>	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo General:	37
5.2 Objetivos Particulares:	37
6. METODOLOGÍA	38
6.1 Delimitación del área de estudio	38
6.1.1 Colecciones científicas	38
6.2 Trabajo de campo	39
6.3 Revisión e identificación de material	39
6.4 Muestreo taxonómico	41
6.4.1 Elección del grupo externo	41
6.4.2 Marcadores moleculares	42
6.4.2 Criterios para la delimitación de especies	43
6.5 Trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular	45
6.5.1 Separación de tejido	45
6.5.2 Extracción de ADN	45
6.5.3 Cuantificación de ADN	47
6.5.4 Amplificación por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	47
6.5.5 Electroforesis de extracción de ADN y de PCR	48
6.6 Secuenciación, edición y alineamiento de secuencias	49

6.7	Análisis de datos moleculares para delimitación de especies	51
6.8	Estudios morfológicos y descripciones de especies	54
7.	RESULTADOS	55
	CAPÍTULO 1. TAXONOMÍA: ESTUDIOS MORFOLÓGICOS	55
7.1	Variación intraespecífica de estructuras sexuales primarias en el género <i>Loxosceles</i>	55
7.1.1	<i>Loxosceles malintzi</i> Valdez-Mondragón, Cortez-Roldán, Juárez-Sánchez y Solís-Catalán, 2018.	55
7.1.2	<i>Loxosceles aff. colima</i>	58
7.1.3	<i>Loxosceles misteca</i> Gertsch, 1958.....	60
7.1.4	<i>Loxosceles tenochtitlan</i> Valdez-Mondragón y Navarro-Rodríguez, 2019.....	63
7.1.5	<i>Loxosceles zapoteca</i> Gertsch, 1958	66
7.1.6	<i>Loxosceles nahuana</i> Gertsch, 1958.....	68
7.1.7	<i>Loxosceles jaca</i> Gertsch y Ennik, 1983.....	71
7.1.8	<i>Loxosceles sp. 1.</i>	73
7.1.9	<i>Loxosceles tenango</i> Gertsch, 1973	76
	CAPÍTULO 2. ESTUDIOS MOLECULARES	79
7.2	Taxonomía integradora: análisis de delimitación de especies y evidencia morfológica	79
7.2.1.	Secuencias de ADN	79
7.2.2	Análisis de distancias (<i>p</i>) genéticas	79
7.2.3.	Delimitación de especies con métodos moleculares	83
8.	DISCUSIÓN	87
8.1	Taxonomía: Estudios Morfológicos	87
8.2	Delimitación de especies (taxonomía integradora)	88
9.	CONCLUSIONES	93
10.	PERSPECTIVAS	94
11.	REFERENCIAS	95
12.	ANEXOS	112
13.	PUBLICACIONES	115
	Título del artículo: “Under an integrative taxonomic approach: the description of a new species of the genus <i>Loxosceles</i> (Araneae, Sicariidae) from Mexico City”.	115

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Especies y distribución actual por estado del género <i>Loxosceles</i> en México.....	25
Cuadro 2 Localidades muestreadas en 2017- 2019, de las especies de <i>Loxosceles</i> de la Región Centro-Occidente de México M= machos, H= hembras, J= juveniles.....	40
Cuadro 3 Material revisado de las especies del género <i>Loxosceles</i> de colecciones nacionales.....	41
Cuadro 4 Características de los marcadores moleculares utilizados en este trabajo.....	43
Cuadro 5 Caracteres morfológicos utilizados para la delimitación de las especies del género <i>Loxosceles</i>	44
Cuadro 6. Especies de <i>Loxosceles</i> utilizados en la separación de tejido para extracción de ADN.....	46
Cuadro 7. Marcadores moleculares y sus secuencias utilizados para la amplificación por medio de PCR.....	48
Cuadro 8. Especímenes secuenciados para cada especie, código de ADN, localidades y números de acceso de GenBank.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1-2. Morfología general externa del cuerpo de las arañas. 1) Habitus, vista dorsal. 2) Habitus, vista ventral. Escala: 2 mm.	7
Figura 3. Vista ventral de las hileras en <i>Araneus diadematus</i> Clerck, 1757. A = hileras anteriores, M = hileras medias, P = hileras posteriores, a = ano. Las puntas de flecha apuntan a las "tríadas" donde se produce el hilo de captura adhesivo. 30 x. Foto por Peters y Hüttemann, tomado de Foelix, 2011.	8
Figura 4. Región ocular en vista frontal de una araña con seis ocelos, las flechas indican la posición de los ocelos en un ejemplar del género <i>Loxosceles</i> . Ocelos medios anteriores (OMA), ocelos medios posteriores (OMP) y ocelos laterales posteriores (OLP). Escala: 1 mm.	9
Figuras 5-6. Morfología general interna de los órganos reproductores en arañas de los grupos 5) Synspermiata y 6) Entelegynae. Flechas grises indican la dirección de transferencia de esperma dentro de la espermateca (Rec), flechas negras indican la transferencia de esperma hacia los óvulos antes de la fertilización. Cc= conductos copulatorios, F= conducto de fertilización, Ut= Útero. Tomada y modificada de Foelix (2011).	9
Figuras 7-10. Fotografías de pedipalpos y receptáculos seminales de arañas Synspermiata (=ex Haplogynae): 7) pedipalpo de <i>Loxosceles yucatanus</i> Chamberlin y Ivie, 1938; 8) receptáculo seminal de <i>Loxosceles malintzi</i> Valdez-Mondragón, Cortez-Roldán, Juárez-Sánchez y Solís-Catalán, 2018 y Entelegynae: 9) pedipalpo y 10) epiginio de <i>Novalena approximata</i> (Gertsch y Ivie, 1936). Fotos por Alma R. Juárez Sánchez (2017).	10
Figura 11. Riqueza total de especies de arañas para los estados de la República Mexicana. Tomado y modificado de Jiménez (1996).	11

Figura 12. Distribución geográfica de los géneros de la familia Sicariidae y de los grupos de especies del género *Loxosceles*, en paréntesis se indica el número de especies incluidas en cada grupo. En azul se representa la distribución del grupo de especies reclusa, al que pertenecen las especies Norteamericanas incluidas las de México. Tomado y modificado de Binford y cols. (2008). 15

Figuras 13-18. Variación en el patrón dorsal en forma del “violín” presente en el prosoma de algunas especies de *Loxosceles* de México: 13) *Loxosceles jaca* Gertsch y Ennik, 1983; 14) *Loxosceles zapoteca* Gertsch, 1958; 15) *Loxosceles boneti* Gertsch, 1958; 16) *Loxosceles malintzi*; 17) *Loxosceles tehuana* Gertsch, 1958; 18) *Loxosceles aurea* Gertsch, 1973. Foto 18 por Mayra R. Cortez Roldán (2017). Escala: 1 mm..... 177

Figuras 19-20. 19). Variación ontogenética de un macho de *Loxosceles misteca* Gertsch, 1958, mostrando las diferencias en el tamaño y coloración en los diferentes estadios hasta alcanzar la etapa de adulto. 20). Ejemplar vivo de una hembra adulta de *L. misteca*, mostrando el patrón en forma de violín en el prosoma y coloración general del cuerpo, nótese que el opistosoma y las patas no presentan patrón de dibujo o bandas (anillos en las patas). 18

Figuras 21-25. Hábitats y microhábitat naturales del género *Loxosceles* en México. 21. Matorral xerófilo, Durango, México. 22. Matorral xerófilo, Hidalgo, México. 23. Selva baja caducifolia, Puebla, México. 24. Entrada de la cueva “General Carlos Pacheco”, Municipio de Pilcaya, Guerrero, México. 25. Grutas de Tolantongo, Hidalgo, México. Las flechas indican microhábitat específico donde pueden ser encontrados los ejemplares en ambiente silvestre. Fotos: 21 por José Cruz Valerdi Tlachi (2018), 22-25 por Alejandro Valdez Mondragón (2018). 21

Figuras 26-27. Hembras de *Loxosceles malintzi*, 26) En estado de reposo en su telaraña. 27) Con restos de sus presas. Fotos por Humberto J. Lacayo Ramírez (2018). 22

Figuras 28-29. Registros actualizados de las especies de *Loxosceles* para los estados del norte de México. 28) Región Noroeste. 29) Región Noreste. Asterisco en *L. rufescens* indica un nuevo registro para México. Abreviaturas para los estados mexicanos: BC, Baja California; BCS, Baja California Sur; CHIH, Chihuahua; COAH, Coahuila; DGO, Durango; NL, Nuevo León; SIN, Sinaloa; SLP, San Luis Potosí; SON, Sonora; TAMS, Tamaulipas; ZAC, Zacatecas. Tomados de Valdez-Mondragón y cols. (2018a, b). 27

Figuras 30-31. Registros actualizados de las especies de *Loxosceles* para los estados de la región centro y sur de México. 30) Región Centro-Occidente. 31) Región Sureste. Abreviaturas para los estados mexicanos: AGS, Aguascalientes; CAM, Campeche; CDMX, Ciudad de México; CHIS, Chiapas; COL, colima; MEX, Estado de México; GTO, Guanajuato; GRO, Guerrero; HGO, Hidalgo; JAL, Jalisco; MICH, Michoacán; Mor, Morelos; NAY, Nayarit; OAX, Oaxaca; PUE, Puebla; QR, Quintana Roo; QRO, Querétaro; TAB; Tabasco; TLAX, Tlaxcala; VER, Veracruz; YUC, Yucatán. Tomados de Valdez-Mondragón y cols. (2018a, b). 28

Figuras 32-36. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. malintzi*, vista dorsal, de dos localidades. 32-35) San Pablo Anicano, Puebla. 36) Taxco de Alarcón,

Guerrero. Tomada de Valdez-Mondragón y cols. (2018b). Escala 0.2 mm..... 56

Figuras 37-44. Variación intraespecífica reducida de los pedipalpos de los machos de *L. malintzi*, palpo izquierdo, vista prolateral, de seis localidades. 37-38) San Pablo Anicano, Puebla. 39) Izúcar de Matamoros, Puebla. 40-41) Tepalcingo, Morelos. 42) Taxco de Alarcón, Guerrero. 43) Tlaltizapán, Morelos. 44) Tepecuacuilco de Trujano, Guerrero. Tomada de Valdez-Mondragón y cols. (2018b). Escala 0.5 mm.....57

Figuras 45-59. Variación morfológica de los receptáculos seminales en hembras de *Loxosceles* aff. *colima* de distintos estados del país de la región Occidente 45) *Loxosceles* morfo “Nayarit 1”, Colorado de La Mora, Nayarit; 46, 47, 48 y 49) *Loxosceles* m. “quechu”, Quechultenango, Guerrero; 50) *Loxosceles* morfo “Vallarta”, Puerto Vallarta, Jalisco; 51) *Loxosceles* morfo “Nayarit 2”, Reacomodo Los Sabinos, Nayarit; 52) *Loxosceles* morfo “Fogos”, Microondas Fogos, Guerrero; 53, 54, 55, 56, 57, 58) *Loxosceles* aff. *colima* 1, Coquimatlán, Colima; y 59) *Loxosceles* aff. *colima* 2, Comala, Colima.... 59

Figuras 60-63. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. misteca*, vista dorsal, de dos localidades: 60, 61) Cueva Agustín Lorenzo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón, Guerrero. 62, 63) Cueva del Jardín Botánico, Parque Nacional Grutas de Cacahuamilpa, Pilcaya, Guerrero. Escala 0.5 mm..... 8261

Figuras 64-69. Variación intraespecífica reducida de los pedipalpos de los machos de *L. misteca*, palpos izquierdos, vista prolateral, de cinco localidades: 64) Jardín Botánico, Parque Nacional Grutas de Cacahuamilpa, Pilcaya, Guerrero. 65) Grutas General Carlos Pacheco, Cacahuamilpa, Pilcaya. Guerrero. 66) Cueva del diablo, Acuitlapán, Taxco, Guerrero. 67) Cuernavaca, Morelos. 68) Tlaltenango, Cuernavaca, Morelos. 69) Lomas de Cortes, Cuernavaca, Morelos. Fotos 64-66 por Alma R. Juárez Sánchez (2019)..... 62

Figuras 70-73. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. tenochtitlan* vista dorsal, de cuatro localidades: 70) Cruz Verde #132, Tlalpan, Ciudad de México. 71) Calle Tepocatl #6, Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán, Ciudad de México. 72) Turiello Guerra, calle Cuitláhuac S/N, Tlalpan, Ciudad de México. 73) Juaréz #23, San Mateo Ixtacalco, municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Fotos por Mayra R. Cortez Roldan (2019). Escala 0.5 mm..... 64

Figuras 74-79. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. tenochtitlan* palpos izquierdos, vista prolateral, de cinco localidades: 74) Turiello Guerra, Calle Cuitlahuac S/N, Tlalpan, Ciudad de México. 75) Cruz Verde #132, Tlalpan, Ciudad de México. 76) Calle Tepocatl #61, Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán, Ciudad de México. 77) Los Reyes Copilco, Frac. Areada Dpto. 102-A, Coyoacán, Ciudad de México. 78, 79) Calle Reforma #5, Santiago Tlacochealco, Municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Fotos por Mayra R. Cortez Roldan (2019). Escala 0.5 mm..... 65

Figuras 80-83. Variación intraespecífica de los receptáculos seminales de las hembras de *L. zapoteca*, vista dorsal, de dos localidades de Guerrero: 80-82) Cueva Agustín Lorenzo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón. 83) Camino hacia Mexcaltepec el viejo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón. Escala 0.5 mm.... 66

Figuras 84-87. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de <i>L. zapoteca</i> , palpos izquierdos, vista prolateral, de dos localidades de Guerrero: 84-86) Cueva Agustín Lorenzo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón. 87) Jardín Botánico en Parque Nacional Grutas de Cacahuamilpa, Pilcaya. Escala 0.5 mm...	67
Figuras 88-93. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de <i>L. nahuana</i> , vista dorsal, de tres localidades: 88, 89) 2.9 km al S de Tasquillo, Zimapán. 90, 91) 1 km al E de Zimapán, Hidalgo 92, 93) Comunidad Cruz Pinta, 2 km al SE de Zimapán, Hidalgo. Escala 0.5 mm..	69
Figuras 94-97. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de <i>L. nahuana</i> , palpos izquierdos, vista prolateral, de tres localidades: 94, 95) 1 km al E de Zimapán, Hidalgo. 96) Comunidad Cruz Pinta, 2 km al SE de Zimapán, Hidalgo. 97) 8 km al S de Zimapán, Hidalgo. Escala 0.5 mm.....	70
Figuras 98-101. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de <i>L. jaca</i> , vista dorsal, de una localidad 98-101) 2.5 Km al N de Jacala de Ledezma, Hidalgo. Escala 0.2 mm.	71
Figuras 102-104. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de <i>L. jaca</i> , palpos izquierdos, vista prolateral, de una localidad 102-104) 2.5 Km al N de Jacala de Ledezma, Hidalgo. Escala 0.5 mm..	72
Figuras 105-109. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de <i>L. sp. 1</i> vista dorsal de una localidad 105-109) Grutas de Tolantongo, Municipio de Cardonal, Hidalgo. Escala 0.2 mm.	74
Figuras 110-115. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de <i>L. sp. 1</i> palpos izquierdos, vista prolateral, de dos localidades 110-112, 115 Grutas de Tolantongo, Cardonal, Hidalgo. 113, 114 500 m al Oeste de la entrada No.5 de Grutas de Tolantongo, Cardonal, Hidalgo. Escala 0.5 mm.....	75
Figuras 116-119. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de <i>L. tenango</i> , vista dorsal de dos localidades 116, 117) Grutas El Carrizal de Tenango, Chapulhuacán, Hidalgo. 118, 119) Cueva del Caracol, 1.5 km al SE de la comunidad El Caracol, Pisaflores, Hidalgo. Escala 0.5 mm.	76
Figuras 120-123. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de <i>L. tenango</i> , palpos izquierdos, vista prolateral, de dos localidades 120-122. Cueva del Caracol, 1.5 km al SE de la comunidad El Caracol, Pisaflores, Hidalgo. 123. Grutas El Carrizal de Tenango, Chapulhuacán, Hidalgo. Escala 0.5 mm.	77
Figura 124. Análisis de distancias (<i>p</i>) con Neighbor Joining (NJ) para CO1 de nueve especies del género <i>Loxosceles</i> de la región Centro-Occidente de México. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (valores significativos > 50%). Los colores de las ramas representan cada una de las especies delimitadas. Los círculos rojos representan las especies nuevas.....	81

Figura 125. Análisis de distancias (p) genéticas con Neighbor Joining (NJ) para ITS2 de nueve especies del género *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (valores significativos de >55%). Los colores de las ramas representan cada una de las especies delimitadas. Los círculos rojos representan las especies nuevas.....71
2

Figura 126. Delimitación de especies basadas en un árbol de Máxima Verosimilitud inferido a partir de un fragmento de CO1 de especies de *Loxosceles* de México (ramas y barras en colores). Los números en las barras a la derecha representan los métodos de delimitación: 1: Morfología (M). 2: Neighbor-Joining (NJ). 3: ABGD. con particiones iniciales (PI). 4, 5, 6: ABGD con particiones recursivas (PR). 7: GMYC análisis de Yule. 8: GMYC análisis de Coalescent. 9: bPTP con ML y 10: bPTP con IB. Los números debajo de las barras representan las especies recuperadas para cada método de delimitación. Los círculos rojos representan las especies nuevas. Los números rojos en las ramas representan valores de probabilidades posteriores bajo IB, los números negros representan valores de soporte de Bootstrap bajo ML.....694

Figura 127. Delimitación de especies basadas en un árbol de Máxima Verosimilitud inferido a partir de un fragmento de ITS2 de especies de *Loxosceles* de México (ramas y barras en colores). Los números en las barras a la derecha representan los métodos de delimitación: 1: Morfología (M). 2: Neighbor-Joining (NJ). 3: ABGD. con particiones iniciales (PI). 4, 5, 6: ABGD con particiones recursivas (PR). 7: GMYC análisis de Yule. 8: GMYC análisis de Coalescent. 9: bPTP con ML y 10: bPTP con IB. Los números debajo de las barras representan las especies recuperadas para cada método de delimitación. Los círculos rojos representan las especies nuevas. Los números rojos en las ramas representan valores de probabilidades posteriores bajo IB, los números negros representan valores de soporte de Bootstrap bajo ML.....715

Figura 128. Delimitación de especies basadas en un árbol de Máxima Verosimilitud inferido a partir de una matriz concatenada de fragmentos de los genes CO1 e ITS2 de especies de *Loxosceles* de México (ramas y barras en colores). Los números en las barras a la derecha representan los métodos de delimitación: 1: Morfología (M). 2: GMYC análisis de Yule. 3: GMYC análisis de Coalescent. 4: bPTP con ML y 5: bPTP con IB. Los números debajo de las barras representan las especies recuperadas para cada método de delimitación. Los círculos rojos representan las especies nuevas. Los números rojos en las ramas representan valores de probabilidades posteriores bajo IB, los números negros representan valores de soporte de Bootstrap bajo ML.....696

Figura 129. Árbol de Inferencia Bayesiana (IB) inferido a partir de una matriz concatenada de fragmentos de los genes CO1 e ITS2 de nueve especies de *Loxosceles* de México (ramas colapsadas de colores). Los números sobre las ramas representan valores de probabilidades posteriores.....92

1. INTRODUCCIÓN

Las arañas pertenecen a uno de los grupos megadiversos, a nivel mundial se han descrito un total de 120 familias, 4,152 géneros y 48,362 especies (WSC, 2019). A pesar de esta diversidad, sólo un pequeño porcentaje (0.43%) resultan ser de relevancia en salud pública para el humano debido a su mordedura venenosa. Los géneros conocidos a nivel mundial por ser de importancia médica son principalmente seis: las “arañas tela de embudo” de Australia pertenecientes al género *Atrax* O.P.-Cambridge 1877 (Atracidae), las “arañas bananeras” de las zonas tropicales de Sudamérica del género *Phoneutria* Perty, 1833 (Ctenidae) (Coddington y Levi, 1991), las arañas “viudas negras” del género *Latrodectus* Walckenaer, 1805 (Theridiidae), las arañas “arenas de seis ocelos” de los géneros *Sicarius* Walckenaer, 1847 y *Hexophthalma* Karsch, 1878, y las arañas “violinistas”, “arañas del rincón”, “arañas reclusas pardas”, “arañas reclusas” del género *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832 (Sicariidae) (Magalhaes y cols. 2017). De estos géneros, solamente *Latrodectus* y *Loxosceles* se distribuyen en México.

Además de su importancia médica, las especies del género *Loxosceles*, al igual que otras arañas, son depredadores que se alimentan de pequeños artrópodos, principalmente de insectos. Gracias a esto, las arañas de este género cumplen un importante rol ecológico en los lugares donde se distribuyen manteniendo bajo control las poblaciones de insectos, así como consumiendo presas dentro de las casas que son dañinas para los humanos, como moscas, mosquitos y cucarachas. Las arañas a su vez sirven de alimento a otros animales como aves, reptiles y anfibios (Foelix, 2011; Hénaut y cols. 2012; Ibarra, 2013).

El género *Loxosceles* está actualmente conformado por 140 especies descritas a nivel mundial, siendo México el país con la mayor diversidad en el mundo, registrando un total de 40 especies descritas (WSC, 2019; Valdez-Mondragón y cols. 2018b) La mayor parte de la investigación con estas arañas no solo en México sino a nivel mundial, ha sido enfocada principalmente en la parte médica, bioquímica, inmunológica y toxicológica debido a su veneno hemotóxico (Moye de Alba, 1997; Tambourgi y cols. 2000; Young y Pincus, 2001; De Roodt y cols. 2002; Domingos y cols. 2003; Ramos-Cerrillo y cols. 2004; Barbaro y cols. 2005; Oliveira y cols. 2005; Ramos-Cerrillo, 2012;). Recientemente, se han publicado trabajos

sobre su sistemática y taxonomía integradora en distintas partes del mundo, utilizando evidencia morfológica y molecular (Planas y Ribera, 2014; 2015; Tahami y cols. 2017).

La taxonomía tradicional en arañas está basada en estructuras sexuales como pedipalpos en machos y epiginios o receptáculos seminales en hembras, caracteres morfológicos robustos para la separación de especies y diagnosis para la mayoría de los grupos (Huber, 2003). Sin embargo, en el género *Loxosceles*, para el caso de las hembras dichos caracteres (receptáculos seminales) presentan un grado de variación morfológica continua que complica la delimitación y diagnosis de las especies, poniendo en duda si se trata de especies con una amplia variación morfológica intraespecífica e incluso geográfica o varias especies distintas, las cuales son difícilmente reconocibles solamente con evidencia morfológica.

Debido a lo anterior, es necesario un estudio a fondo de la taxonomía de las especies de *Loxosceles*, en concreto de la región Centro-Occidente de México para conocer el número total de especies y poder establecer la validez de estas con base en evidencia molecular, utilizando marcadores moleculares y evidencia morfológica dentro de un contexto de taxonomía integradora (Padial y cols. 2010).

Generalidades

1.1 Diversidad y clasificación de arañas a nivel mundial

En México tenemos representados los 11 órdenes de la clase Arachnida, los cuales son: Acari (ácaros y garrapatas), Amblypygi (arañas látigo, arañas corazón, tenderapos o canclos), Araneae (arañas y tarántulas), Opiliones (patones, papaítos piernas largas o segadores), Palpigradi (palpígrados), Pseudoscorpionida (falsos escorpiones o escorpiones de los libros), Ricinulei (ricinúlidos o garrapatas encapuchadas), Schizomida (esquizómidos, mini-vinagrillos o escorpión látigo de cola corta), Scorpiones (escorpiones o alacranes), Solifugae (matavenados, arañas sol o arañas camello, madres de alacrán) y Thelyphonida (uropígididos, vinagrillos, madres de escorpión, vinagreras o escorpiones látigo) (Francke, 2014). Las arañas pertenecen al orden Araneae, el segundo orden más diverso de la clase Arachnida después del orden Acari (Coddington y cols. 1991). El orden está compuesto por 120 familias, 4,152 géneros y 48,362 especies a nivel mundial, y según algunas estimaciones, el grupo podría incluir 120,000 especies aun sin describir (Agnarsson y cols. 2013; WSC, 2019).

El orden Araneae se subdivide en dos subórdenes: Mesothelae y Opisthothelae (Coddington, 2005, Wheeler y cols. 2017). El suborden Mesothelae contiene una sola familia Liphistiidae Thorell, 1869 con ocho géneros (*Ganthela* Xu y Kuntner, 2015, *Heptathela* Kishida, 1923, *Liphistius* Schiödte, 1849 *Qionghela* Xu y Kuntner, 2015, *Ryuthela* Haupt, 1983, *Sinothela* Haupt, 2003, *Songthela* Ono, 2000 y *Vinathela* Ono, 2000). Las arañas de esta familia conservan el abdomen segmentado y su distribución esta confinada al sudeste de Asia (Xu y cols. 2015; WSC, 2019). El suborden Opisthothelae comprende dos infraordenes: Mygalomorphae y Araneomorphae (Coddington, 2005; Wheeler y cols. 2017). Los infraordenes se caracterizan principalmente por la orientación de los colmillos de los quelíceros *paraxiales* o *diaxiales*. En el primero, los quelíceros se mueven de arriba hacia abajo, y en el segundo, de forma perpendicular o en posición oblicua al eje longitudinal del cuerpo (Masiac, 1996; Beccaloni, 2009; Foelix, 2011; Bradley, 2012; Francke, 2014). El infraorden Mygalomorphae (arañas tramperas, tarántulas, arañas tela de embudo, etc.) representa el 6% de las especies del orden a nivel mundial, mientras que el infraorden Araneomorphae (arañas tejedoras irregulares, arañas tejedoras orbiculares, saltarinas, lobo, etc.) agrupa la mayor

diversidad de arañas con el 94% de las especies descritas (Bond y cols. 2014; Ubick y cols. 2017; Wheeler y cols. 2017; Guerrero-Fuentes, 2017; WSC, 2019). A continuación, se presenta la clasificación actual del orden Araneae:

Dominio: Eukaryota (Chatton, 1925)

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Phylum: Arthropoda Lankester, 1904

Clase: Arachnida Lamarck, 1801

Orden: Araneae Clerck, 1757

Suborden: Mesothelae Pocock, 1892

Suborden: Opisthothelae Pocock, 1892

Infraorden: Araneomorphae Pocock, 1892

Infraorden: Mygalomorphae Pocock, 1892

Actualmente la monofilia de la clase Arachnida no está resuelta, datos morfológicos y moleculares utilizados hasta el momento no han resuelto las relaciones dentro de la clase (Shultz 1990, 2007; Wheeler y Hayashi 1998; Giribet y cols. 2002; Ballesteros y Sharma, 2019). Sin embargo, en un estudio filogenético donde incluyen todos los linajes de arácnidos, Regier y cols. (2010) recuperan la monofilia del clado Tetrapulmonata, el cual relaciona a Araneae con el clado Pedipalpi (Amblypygi, Thelyphonida y Schizomida) como grupo hermano. Posteriormente, en otro estudio filogenético Sharma y cols. (2014), obtuvieron un resultado similar recuperando también la monofilia del clado Tetrapulmonata y este a su vez como grupo hermano de Escorpiones, clado nombrado como Arachnopulmonata el cual comprende Escorpiones + Tetrapulmonata. Wang y cols. (2018) descubrieron un fósil *Chimerarachne yingi* perteneciente al orden Uruaraneida de la clase Arachnida, el cual presenta caracteres similares de varios ordenes de arácnidos: abdomen segmentado, hileras multiarticulares con espigas bien definidas, pedipalpos del macho modificados para transferencia de esperma y quelíceros similares al de las arañas, y un telson similar a un uropígido. Se realizó un análisis filogenético en el cual se propone al orden Uruaraneida como el clado hermano de Araneae (Wang y cols.

2018; Huang y cols. 2018). La posición filogenética de este fósil vuelve plesiomórficas (dentro del orden Araneae) a las hileras secretoras de seda y pedipalpos modificados, ya que los coloca más basalmente en el árbol filogenético (Huang y cols. 2018).

Recientemente, se consideró a las “cacerolitas de mar” o Xiphosura como el grupo hermano de la clase Arachnida sin embargo, el análisis filogenético más reciente realizado por Ballesteros y Sharma (2019) basado en datos filogenómicos con genomas completos de tres de las cuatro especies de Xiphosura, así como genomas y transcriptomas de varias especies de arácnidos, concluye que la clase Arachnida es parafilética, apareciendo Xiphosura como grupo hermano de Ricinulei dentro de la clase Arachnida. Estudios adicionales son necesarios para corroborar o descartar esta hipótesis.

1.2 Morfología general de arañas

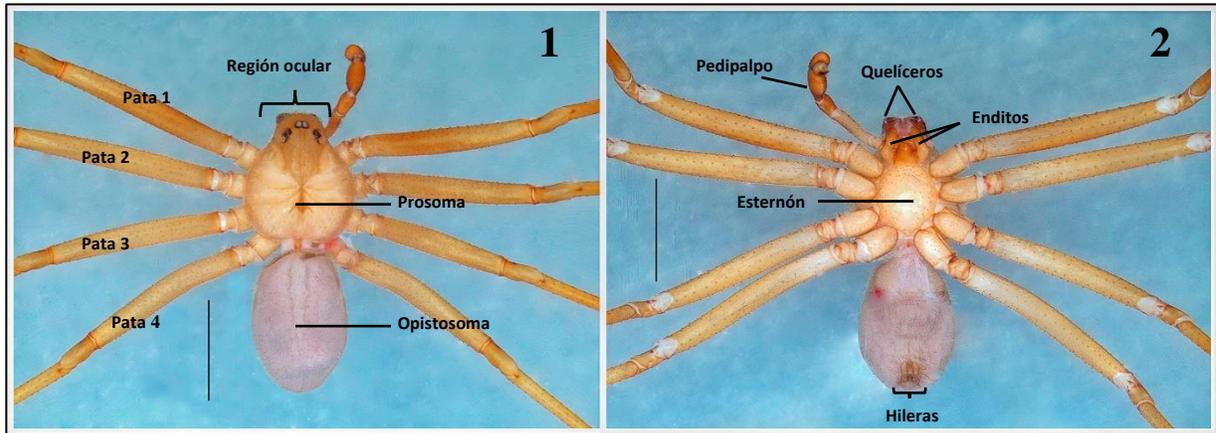
El cuerpo de las arañas está dividido en dos regiones o tagmas: prosoma (cefalotórax) y opistosoma (abdomen) (Figuras 1, 2). La región del prosoma alberga los ocelos, los quelíceros, pedipalpos y los cuatro pares de patas (Figuras 1, 2). Además, el prosoma es la región del cuerpo relacionada con la mayoría de las interacciones con su ambiente: locomoción, ingestión de alimentos, percepción del mundo exterior y la integración nerviosa (Beccaloni, 2009; Ibarra-Núñez, 2013). Las arañas presentan de cero a ocho ocelos, los cuales por lo general se encuentran en dos filas y se denominan dependiendo la posición en el cefalotórax en: ocelos laterales anteriores (OLM), ocelos medianos anteriores (OMA), ocelos laterales posteriores (OLP) y ocelos medianos posteriores (OMP) (Figura 4) (Francke, 2014, Foelix, 2011). Existen especies troglobias de diferentes familias tanto de arañas migalomorfas como araneomorfas habitantes de cuevas que por adaptaciones convergentes presentan una reducción en el tamaño de los ocelos (ej. *Lycosa howarthi* Gertsch, 1973, *Hemirrhagus grieta* (Gertsch, 1982), *Hemirrhagus kalebi* y *Hemirrhagus sprousei* Mendoza y Francke, 2018), o incluso en otras han desaparecido por completo (ej. *Adelocosa anops* Gertsch, 1973, *Sinopoda scurion* Jäger, 2012) (Millot, 1949; Howarth, 1972; Sanocka, 1982; Foelix, 2011; Mendoza y Francke, 2018). El primer par de apéndices, los quelíceros son bisegmentados, constan de dos partes, una parte basal fuerte (basiquelícerico) y un colmillo articulado móvil, el cual presenta un conducto para la

inyección del veneno (Foelix, 2011; Bradley, 2013; Francke, 2014) (Figura 4). El segundo par de apéndices son los pedipalpos, los cuales en los machos adultos están modificados para almacenar y transferir esperma a los receptáculos seminales de las hembras al momento de la copula, también son utilizados para la captura y manipulación de las presas y cuentan con pelos y fosas sensoriales que les sirven para oler (olfato) y probar (gusto) (Foelix, 2011; Bradley, 2013; Francke, 2014). La segmentación de los pedipalpos es similar a la de una pata (coxa, trocánter, fémur, patela, tibia y tarso) exceptuando el metatarso.

Los siguientes apéndices son los cuatro pares de patas locomotoras (I, II, III y IV). Cada pata tiene siete segmentos: coxa, trocánter, fémur, patela, tibia, metatarso y un tarso con dos o tres uñas dependiendo del grupo (Foelix, 2011). Dentro del prosoma se encuentran el Sistema Nervioso Central (SNC) ubicado ventralmente, parte del tracto intestinal, la faringe y el estómago, dorsalmente un par de glándulas venenosas; las cuales en las tarántulas son de tamaño pequeño y se encuentran dentro de los quelíceros, en contraste con la mayoría de las arañas que tienen glándulas relativamente grandes las cuales se ubican en el prosoma, también en esta región encontramos la musculatura para las extremidades y parte del sistema circulatorio ubicado dorsalmente (Foelix, 2011, Bradley, 2013).

La región del opistosoma o abdomen en la mayoría de las arañas es blanda, sin segmentación (excepto las arañas de la familia Liphistiidae) (Figuras 1, 2). Las principales funciones de esta región son: respiración, circulación, excreción, digestión, reproducción; así como la producción de seda o telaraña (Levi y Levi, 1968; Kaston, 1972; Hoffmann, 1993; Beccaloni, 2009; Foelix, 1996, 2011; Ibarra-Núñez, 2013). Ventralmente en el opistosoma, encontramos la abertura genital (espermatecas o receptáculos seminales en hembras y el gonoporo en los machos), las aberturas de los sistemas respiratorios, los cuales son de dos tipos: las filotráqueas o pulmones en forma de libro (constituidos por una serie de láminas, dispuestas como las páginas de un libro) y las tráqueas (Foelix, 2011). En la parte posterior del opistosoma encontramos el tubérculo anal y las hileras, utilizadas para secretar la seda. Pueden tener dos o tres pares de hileras y dependiendo de la posición se nombran como: anteriores, medias o posteriores (Figura 3). El opistosoma alberga el corazón, el intestino, los túbulos de Malpighi (los cuales cumplen una función excretora), la cloaca y las glándulas de seda (Foelix, 2011, Bradley, 2013).

Dentro del Infraorden Araneomorphae, se encuentran dos grupos que contienen a la mayoría de las familias de arañas con base en la complejidad de estructuras sexuales en machos y hembras (pedipalpos y epiginios respectivamente), el grupo de los enteléginos (Entelegynae) y el grupo de los haplóginos (ex-Haplogynae, ahora Synspermiata) (Michalik y Ramírez, 2014; Wheeler y cols. 2017).



Figuras 1-2. Morfología general externa del cuerpo de las arañas. 1) Habitus, vista dorsal. 2) Habitus, vista ventral. Escala: 2 mm.

En las arañas enteleginas, las hembras poseen una placa genital esclerosada externa o epiginio, que está conformado por la abertura copuladora y por ductos de fecundación de forma separada, por donde se realiza la fecundación y la ovoposición respectivamente (Figuras 5, 6). En los machos, los pedipalpos de las arañas enteléginas (Figuras 9) resultan ser más complejos morfológicamente, con varias estructuras o escleritos útiles (cymbium, paracymbium, apófisis media, tégula, émbolo, apófisis terminal y conductor) que ayudan en la diagnosis de los géneros, pero principalmente a nivel de especie (Ubick y cols. 2017). En las arañas del clado Synspermiata, la genitalia de las hembras resulta ser relativamente simple, ya que por la misma abertura de copulación se realiza la fecundación y la ovoposición. De manera similar, los machos de arañas Synspermiata poseen pedipalpos simples, compuestos solamente por un bulbo y el émbolo (Figura 7) (Coddington, 1990; Foelix, 2011).

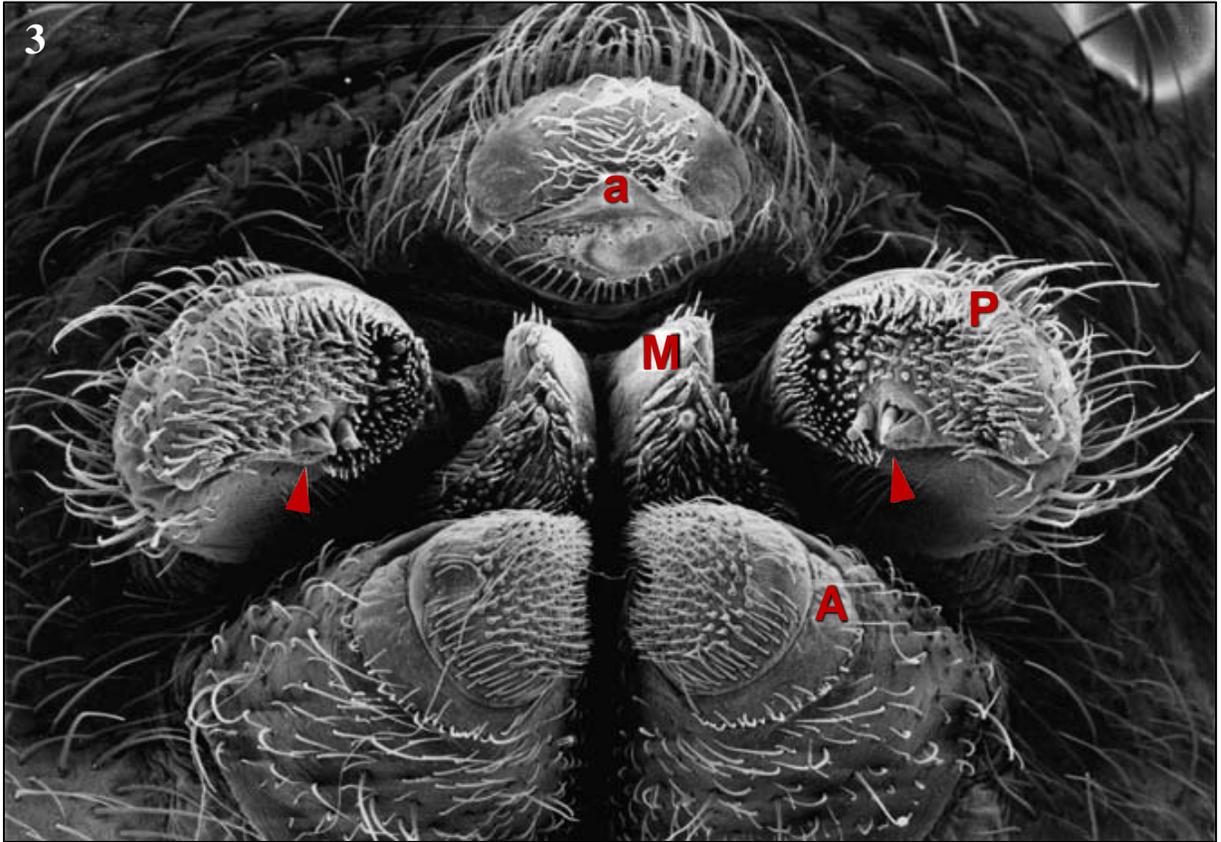


Figura 3. Vista ventral de las hileras en *Araneus diadematus* Clerck, 1757. A = hileras anteriores, M = hileras medias, P = hileras posteriores, a = ano. Las puntas de flecha apuntan a las "tríadas" donde se produce el hilo de captura adhesivo. 30 x. Foto por Peters y Hüttemann, tomado de Foelix, 2011.

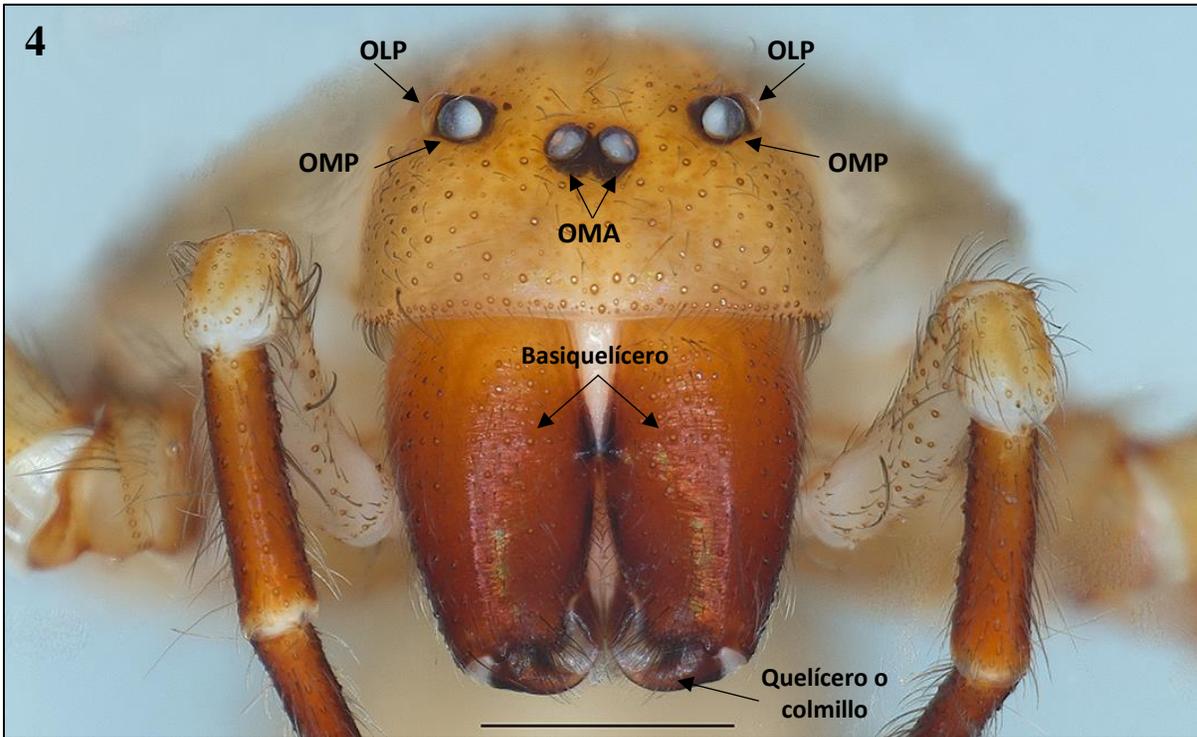
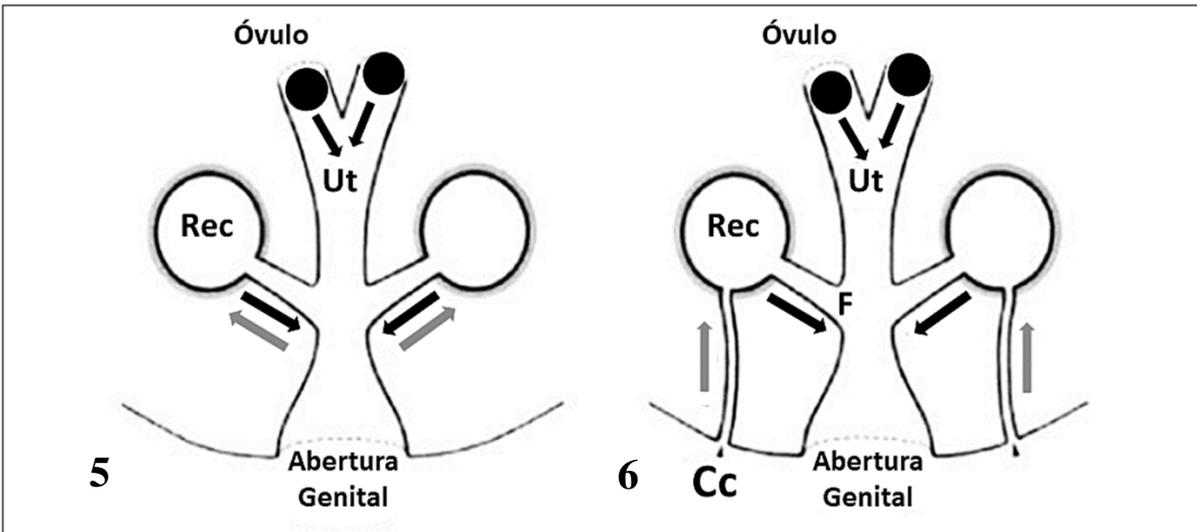
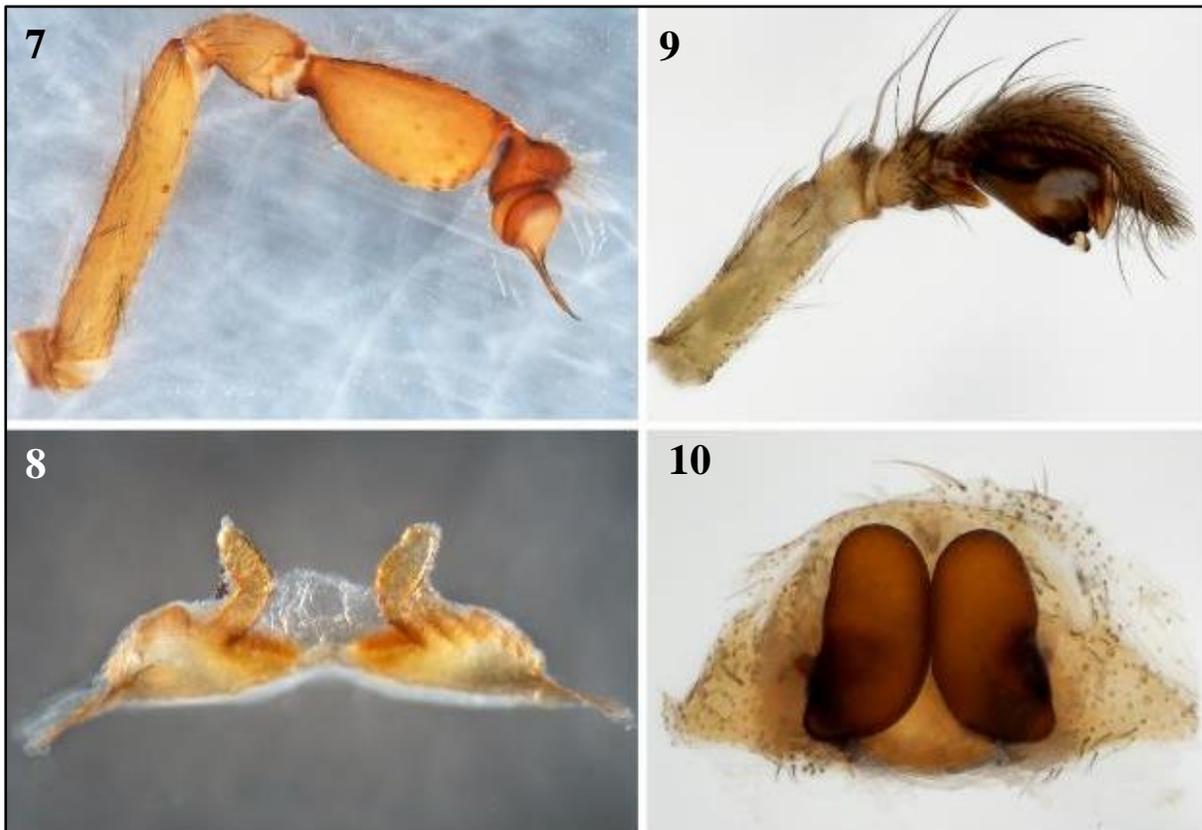


Figura 4. Región ocular en vista frontal de una araña con seis ocelos, las flechas indican la posición de los ocelos en un ejemplar del género *Loxosceles*. Ocelos medios anteriores (OMA), ocelos medios posteriores (OMP) y ocelos laterales posteriores (OLP). Escala: 1 mm.



Figuras 5-6. Morfología general interna de los órganos reproductores en arañas de los grupos 5) Synspermiata y 6) Entelegynae. Flechas grises indican la dirección de transferencia de esperma dentro de la espermateca (Rec), flechas negras indican la transferencia de esperma hacia los óvulos antes de la fertilización. Cc= conductos copulatorios, F= conducto de fertilización, Ut= Útero. Tomada y modificada de Foelix (2011).



Figuras 7-10. Fotografías de pedipalpos y receptáculos seminales de arañas Synspermiata (=ex Haplogynae): 7) pedipalpo de *Loxosceles yucatanana* Chamberlin y Ivie, 1938; 8) receptáculo seminal de *Loxosceles malintzi* Valdez-Mondragón, Cortez-Roldán, Juárez-Sánchez y Solís-Catalán, 2018 y Entelegynae: 9) pedipalpo y 10) epiginio de *Novalena approximata* (Gertsch y Ivie, 1936). Fotos por Alma R. Juárez Sánchez (2017).

1.3. Diversidad de arañas en México

El orden Araneae Clerck, 1757 en México está constituido por 69 familias, 453 géneros y 2,388 especies, y se estima que se conoce el 22.9% de su riqueza en la República Mexicana (Francke, 2014; Brescovit y cols. 2017). Los estados con mayor número de especies de arañas registradas son: Veracruz (374), Baja California Sur (371), Guerrero (364), Chiapas (281), Tamaulipas (277) y Tabasco (264); mientras que los estados con menor diversidad son: Tlaxcala (46), Guanajuato (34), Querétaro (29), Zacatecas (29), Quintana Roo (25) y Aguascalientes (8) (Figura 11) (Jiménez, 1996; Arisqueta-Chablé y cols. 2015; Briones-Osorno, 2018). La fauna de arañas en México es muy diversa. Hasta la fecha existen cuatro trabajos en los cuales se registrado el número de especies para México. En uno de estos trabajos Hoffmann (1976)

reporta 1,598 especies de arañas, mientras que en el segundo Jiménez (1996) actualiza el listado registrando 2,506 especies, en el tercer trabajo Jiménez e Ibarra-Núñez (2008) registran 2,340 especies y por último Durán-Barrón y cols. (2016) registran 2,388 especies de arañas para México.

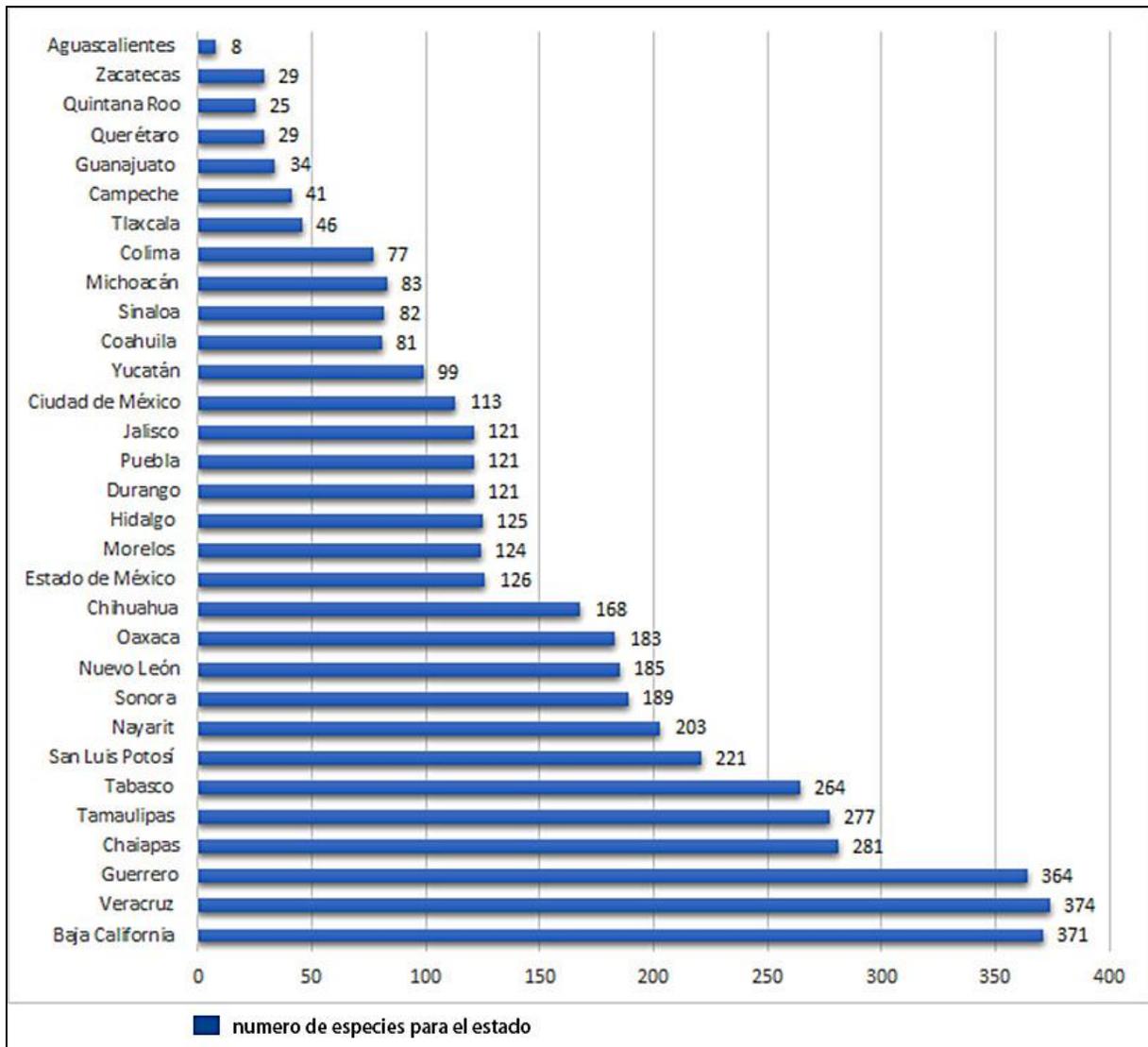


Figura 11. Riqueza total de especies de arañas para los estados de la República Mexicana. Tomado y modificado de Jiménez (1996).

Trabajos más recientes en los que se han realizado inventarios en México destacan los de Desales-Lara y cols. (2013) quienes realizaron un estudio de arañas que se encuentran en hábitats antropogénicos en la ciudad de Toluca, encontrando 41 especies en el interior de casas ubicadas en cuatro ambientes con diferente grado de urbanización. Ibarra-Núñez (2013), actualiza los registros sobre la araneofauna del estado de Chiapas, encontrando 487 especies, 212 géneros y 50 familias, que representan 22.6 % de las especies, 50.1 % de los géneros y 78.5 % de las familias de la República Mexicana. Lo que convierte a Chiapas como uno de estados más ricos del país, aunque señala que: “falta actualizar los valores sobre la araneofauna de la gran mayoría de los estados”. Bizuet-Flores y cols. (2015), analizaron distribución y patrones de diversidad de las arañas del suelo del área protegida Churince en Cuatro Ciénegas, Coahuila, obteniendo 29 familias y 144 morfoespecies. Además, estos autores reportaron cuatro nuevos registros para México y cuatro para el desierto de Chihuahua, incluyendo dos posibles nuevas especies de los géneros *Sergiolus* y *Oecobius*. Jiménez y cols. (2015), realizaron un estudio de la araneofauna de cuatro oasis en Baja California Sur, en el cual registraron 34 familias, 130 géneros y 243 especies, que representan el 63.2% de las registradas para la península de Baja California. Asimismo, estos autores registraron por primera vez un género y 11 especies para México. Lucio-Palacio e Ibarra-Núñez (2015), estudiaron la diversidad y estacionalidad de arañas arborícolas de dos cacaotales en Chiapas, registrando 28 familias, 66 géneros y 89 morfoespecies, de las cuales 57 se identificaron a nivel de especie, además registraron un género y nueve especies nuevas para México. Rodríguez-Rodríguez y cols. (2015) estudiaron la diversidad de arañas antropogénicas de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero; registrando 21 familias, 49 géneros y 63 morfoespecies. Campuzano y cols. (2016), estudiaron los ensamblajes de arañas en una reserva de bosque nuboso en Chiapas, registrando siete familias, 52 géneros y 100 especies. Corcuera y cols. (2016), estudiaron los gremios de arañas terrestres y la diversidad en plantaciones de pinos nativos y eucaliptos de Morelia, Michoacán, registrando 19 familias y 71 especies, asimismo encontraron que la abundancia de arañas cazadoras de tierra y arañas tejedoras de hojas entre las plantaciones y los pinos era diferente. Sin embargo, no tuvieron diferencia entre los sitios de cada uno de los tipos de vegetación. Rivera-Quiroz y cols. (2016), describieron la diversidad de arañas en un remanente ecoturístico de bosque tropical, en Xilitla, San Luis Potosí, registrando seis familias, 86 géneros, 91 especies y 12

morfoespecies. Candía-Ramírez y Valdez-Mondragón (2017), realizaron un estudio sobre la riqueza de arañas tejedoras orbiculares del municipio de Calakmul, Campeche; recolectando 1,151 ejemplares pertenecientes a ocho familias, 56 géneros y 100 especies; registrando dos especies nuevas, además de cuatro familias, 32 géneros y 74 especies como nuevos registros para Calakmul. Briones-Osorno (2018) realizó un estudio ecológico analizando la diversidad y abundancia de arañas de suelo en dos tipos de vegetación y en un gradiente altitudinal de la zona noreste del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala. Donde registran un total de 16 familias, 26 géneros y 27 especies de arañas de suelo, encontrando cuatro especies nuevas y registrando nueve familias nuevas para el estado de Tlaxcala. Recientemente, Desales-Lara y cols. (2018) realizaron un estudio sobre la diversidad de arañas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, dando a conocer cuatro nuevos registros de especies de arañas para México y cuatro registros nuevos para el estado de Coahuila; además, presentan un listado actualizado de las arañas presentes en Coahuila, agrupadas en 32 familias, 100 géneros y 178 especies.

1.4 Diversidad y clasificación del género *Loxosceles*

Con excepción de las familias Uloboridae y Holarchoeidae todas las arañas poseen glándulas de veneno que utilizan ofensivamente para paralizar o matar a sus presas. La inmovilización es la principal función del veneno, y el efecto letal es solo secundario (Maretić, 1987; Friedel, 1987; Friedel y Nentwig, 1989; Foelix, 2011). Debido a la poca cantidad de veneno que inoculan y el tamaño de los quelíceros, la mayoría de las especies se consideran inofensivas para el ser humano (Maretić, 1987; Zamani y cols. 2014).

Respecto a la diversidad de arañas de importancia médica, en México tenemos dos géneros solamente: *Latrodectus*, comúnmente llamadas “casampulga”, “araña capulina”, “chintatlahua”, o “viudas negras” con tres especies, *L. mactans* (Fabricius, 1775), *L. geometricus* Koch, 1841 y *L. hesperus* Chamberlin e Ivie, 1935 (Desales-Lara y cols. 2018). El otro género es *Loxosceles*, comúnmente llamadas en México “arañas violinistas”, con 40 especies reconocidas hasta el momento (Valdez-Mondragón y cols. 2018b; Valdez-Mondragón y cols. 2019). De las 2,388 especies de arañas registradas en México (Jiménez, 1996; Francke, 2014; Brescovit y cols. 2017), solamente 43 especies son consideradas de importancia médica

debido a su mordedura, lo cual representa tan solo el 1.8% de arañas de importancia médica para el país.

La familia Sicariidae Keyserling, 1880, que incluye al género *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832, se agrupa dentro del clado Scytodoidea junto con Ochyroceratidae, Scytodidae, Drymusidae y Periegopidae, cuyas características compartidas son los seis ocelos agrupados en tres pares (Wheeler y cols. 2017). La familia Sicariidae está compuesta por tres géneros: *Hexophthalma* Karsch, 1879 con seis especies, *Sicarius* Walckenaer, 1847 con 21 especies, y *Loxosceles*, siendo el género más diverso dentro de la familia con 140 especies descritas (Magalhaes y cols. 2017; WSC, 2019).

Con base en la distribución del género *Loxosceles*, se han propuesto siete grupos de especies en el mundo, con seis distribuidos en América: grupo *reclusa*, con 51 especies; grupo *laeta*, con 31 especies; grupo *gaucho*, con cuatro especies; grupo *spadicea*, con tres especies; grupo *vonwredei* con dos especies y grupo *rufescens* con una especie (Binford y cols. 2008; Duncan y cols. 2010). El grupo *reclusa* es el que contiene la mayoría de las especies a nivel mundial, con una distribución desde Estados Unidos, México, Centroamérica y las principales islas de las Antillas. Las especies mexicanas se encuentran clasificadas dentro de este grupo con 40 especies, siendo este el país a nivel mundial con la mayor riqueza de las 140 especies para este género (Gertsch y Ennik, 1983; Valdez-Mondragón y cols. 2018a; Valdez-Mondragón y cols. 2018b, Valdez-Mondragón y cols. 2019) (Figura 12).

El género *Loxosceles* se encuentra distribuido principalmente en Centro y Norteamérica (93 especies), seguido por África (22 especies), Europa (8 especies) y Asia (2 especies) (Gertsch, 1967; Gertsch y Ennik, 1983; Binford y cols. 2008; Ribera y Planas, 2009; Tahami y cols. 2017, WSC, 2019, Valdez-Mondragón y cols. 2019). El género *Loxosceles* cuenta con una especie cosmopolita por antropocoría: *Loxosceles rufescens* (Dufour, 1844), del cual se tiene un registro reciente y bien documentado para el estado de Chihuahua, al norte de México (Valdez-Mondragón y cols. 2018a; Valdez-Mondragón y cols. 2018b). La clasificación actual del género *Loxosceles* se presenta a continuación:

Dominio: Eukaryota (Chatton, 1925)

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Phylum: Arthropoda Lankester, 1904

Clase: Arachnida Lamarck, 1801

Orden: Araneae Clerck, 1757

Infraorden: Araneomorphae Pocock, 1892

Superfamilia: Scytodoidea Blackwall, 1864

Familia: Sicariidae Keyserling, 1880

Género: *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832

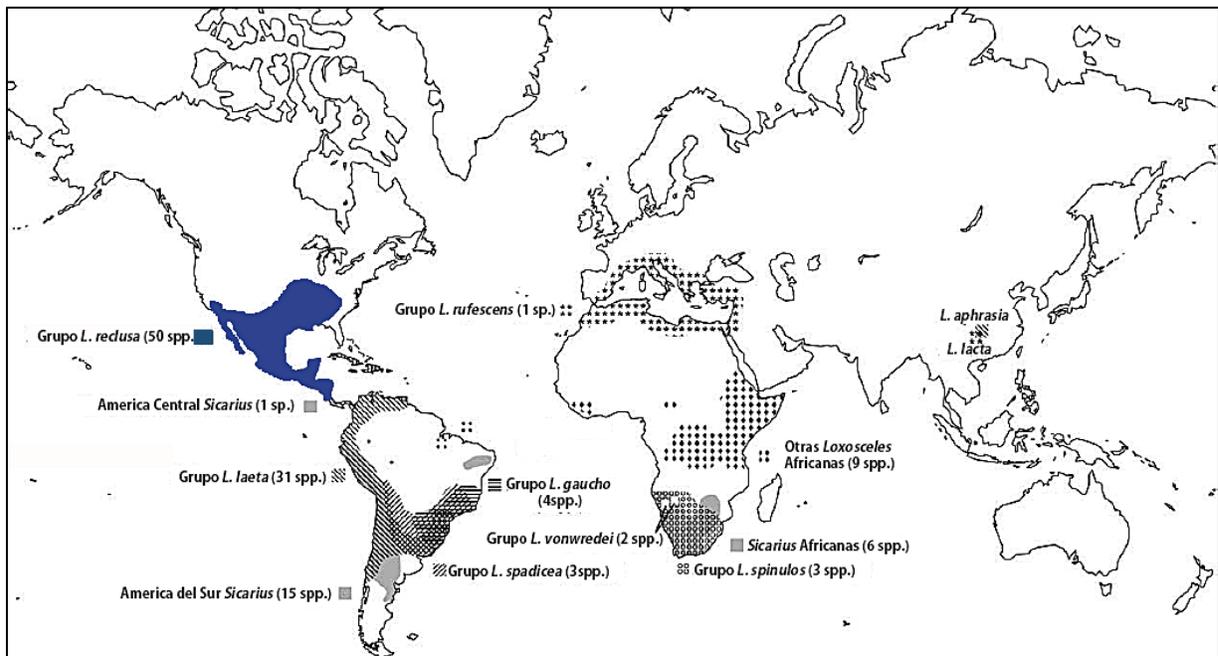


Figura 12. Distribución geográfica de los géneros de la familia Sicariidae y de los grupos de especies del género *Loxosceles*, en paréntesis se indica el número de especies incluidas en cada grupo. En azul se representa la distribución del grupo de especies *reclusa*, al que pertenecen las especies norteamericanas incluidas las de México. Tomado y modificado de Binford y cols. (2008).

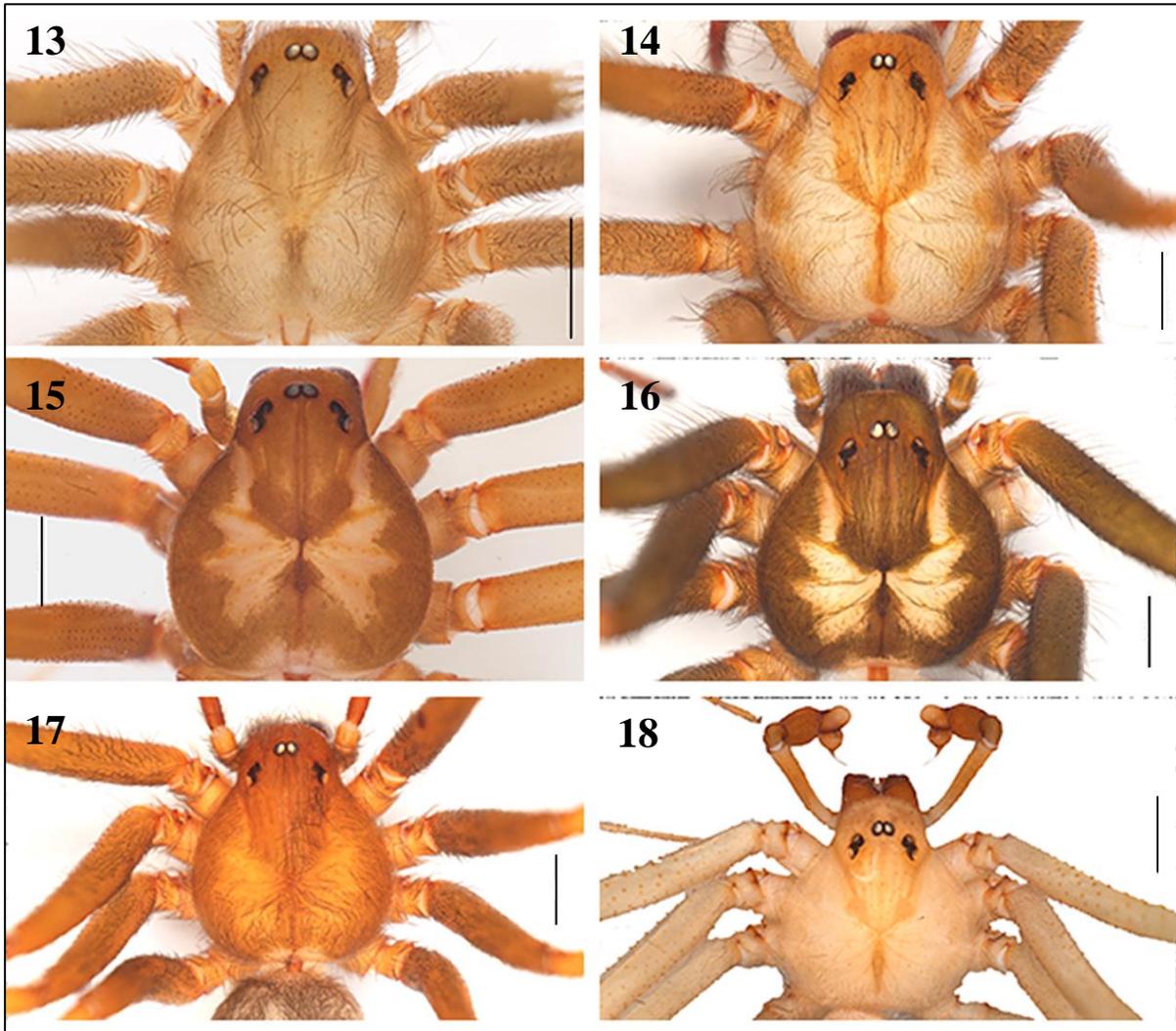
Las sinapomorfias que soportan la monofilia del género *Loxosceles* son: 1) abertura en forma de ranura de la espícula de la glándula ampullacea principal de las hileras, 2) ápice bifido de la lámina del quelícero, 3) falta de spigots en la hilera mediana posterior, y 4) presencia de un pozo septal con setas modificadas en las hileras laterales posteriores (Magalhaes y cols. 2017).

1.5 Morfología y biología general del género *Loxosceles*

La característica más notable del género *Loxosceles* es el patrón dorsal en forma de “violín” en el caparazón, con el cuello del “violín” apuntando hacia la parte trasera, de ahí el nombre común de “arañas violinistas” (González-Sponga, 2010). Se ha observado que no todas las especies de *Loxosceles* de México tienen definido el patrón en forma de “violín” en el caparazón, ya que en algunas especies se encuentra muy marcado, pero en otras es muy tenue y no lo presentan (Figuras 13-18) (Valdez-Mondragón y cols. 2018a). Otra manera de reconocer a las especies de *Loxosceles* es por la forma piriforme (forma de pera) del caparazón y los tres pares de ocelos presentes en una fila transversal recurvada (seis en total), aunque este último carácter no es exclusivo del género, ya que hay otros géneros pertenecientes a otras familias con dicha característica como se explicó anteriormente (Lotz, 2017) (Figuras 13-18). Las hileras medianas posteriores carecen de *spigots* y las hileras laterales posteriores con un hoyo septum con setas modificadas (Lotz, 2017). Las características antes señaladas son más fáciles de ver en adultos que en juveniles, como se aprecia en la Figura 18, en los primeros estadios la coloración de los juveniles es más clara y el patrón dorsal del violín no se aprecia de forma clara (Figura 19) (Potter, 2005; Chaim, y cols. 2011).

El tamaño de las especies del género *Loxosceles* puede variar dependiendo de la especie, abarcando de 8 a 15 mm de longitud total (Gonzales-Sponga, 2010). El cuerpo de los machos (prosoma y opistosoma) es ligeramente más pequeño y un poco más alargado que las hembras, al igual que la longitud de las patas, que son ligeramente más largas en los machos (Huber, 2005; Canals y cols. 2016). La coloración presente en el opistosoma de estas arañas también es variable dependiendo de las presas que consumen, variando desde un color marrón o café oscuro si se alimentan de moscas a un café más claro si se alimentan de grillos o termitas (Vetter, 2015). Sin embargo, en el caso de las especies africanas (*Loxosceles cederbergensis* Lotz, 2017, *Loxosceles dejagerae* Lotz, 2017, *Loxosceles griffinae* Lotz, 2017, *Loxosceles haddadi* Lotz, 2017, *Loxosceles smithi* Simon, 1897) presenta patrones dorsales, como son marcas marrones a lo largo de los lados y en la línea central del opistosoma (Lotz, 2012; 2017), a diferencia de las especies americanas las cuales no presentan patrón alguno y son totalmente lisas. En este género, las patas son largas, delgadas y carecen de espinas, sin presentar ningún tipo de patrón ni bandas (Figura 20) (Tautz y cols. 2002, 2003; Blaxter y Floyd 2003; Sandidge

y Hopwood, 2009).



Figuras 13-18. Variación en el patrón dorsal en forma del “violín” presente en el prosoma de algunas especies de *Loxosceles* de México: 13) *Loxosceles jaca* Gertsch y Ennik, 1983; 14) *Loxosceles zapoteca* Gertsch, 1958; 15) *Loxosceles boneti* Gertsch, 1958; 16) *Loxosceles malintzi*; 17) *Loxosceles tehuana* Gertsch, 1958; 18) *Loxosceles aurea* Gertsch, 1973. Foto 18 por Mayra R. Cortez Roldán (2017). Escala: 1 mm.



Figuras 19-20. Variación ontogenética y etapa adulta de ejemplares del género *Loxosceles*. 19). Variación ontogenética de un macho de *Loxosceles misteca* Gertsch, 1958, mostrando las diferencias en el tamaño y coloración en los diferentes estadios hasta alcanzar la etapa de adulto. 20). Ejemplar vivo de una hembra adulta de *L. misteca*, mostrando el patrón en forma de violín en el prosoma y coloración general del cuerpo, nótese que el opistosoma y las patas no presentan patrón de dibujo o bandas (anillos en las patas).

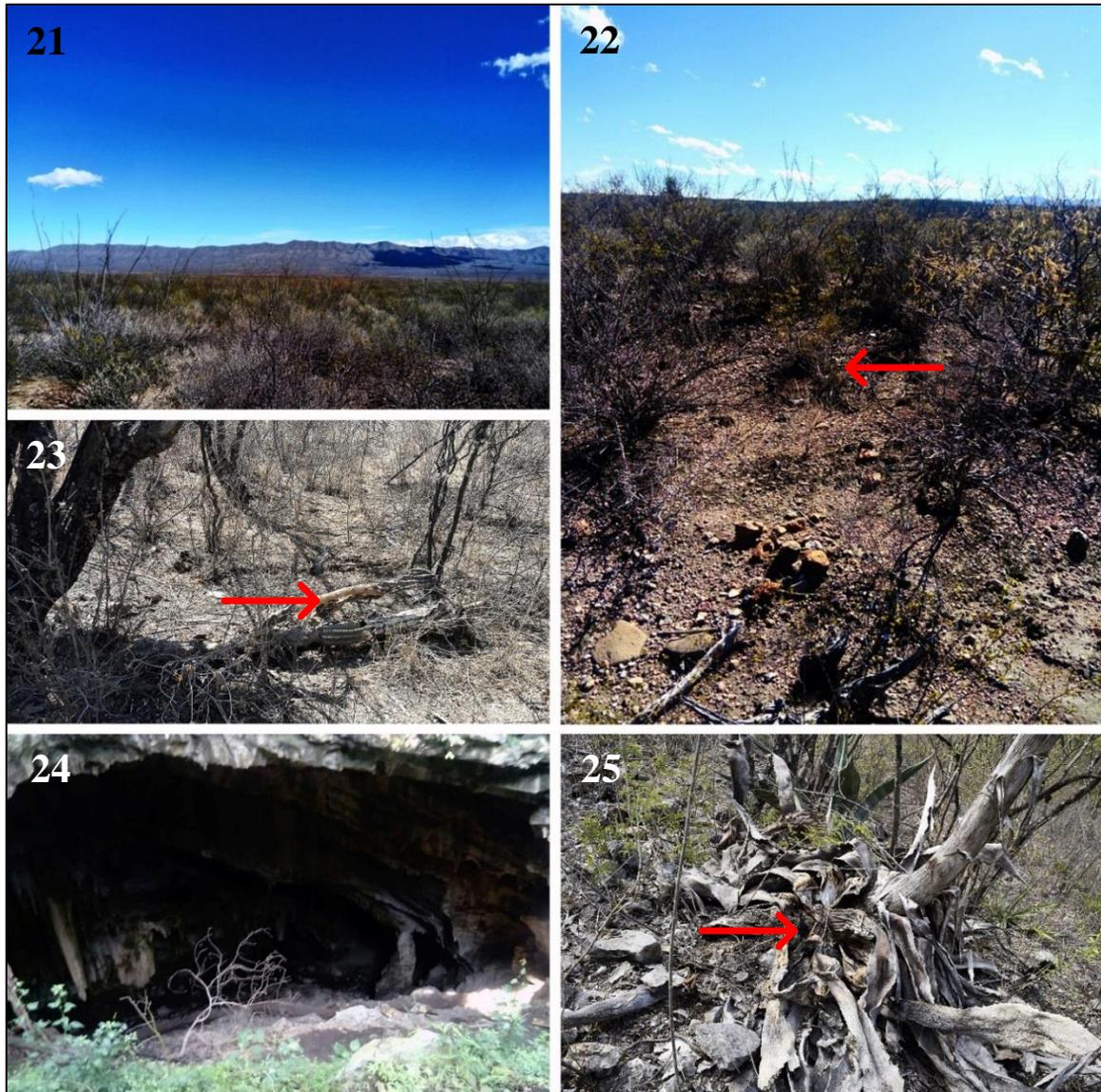
Las especies mexicanas de *Loxosceles* en su mayoría prefieren hábitats secos como selvas bajas o matorrales xerófilos, aunque hay algunas especies como *Loxosceles tenango* Gertsch, 1973 y *Loxosceles yucatanana* que se distribuyen en ambientes tropicales como bosques mesófilos y en selvas altas respectivamente, ambas encontradas en cuevas en dichos hábitats (Valdez-Mondragón y cols. 2018a, 2018b, 2019; Cortez-Roldán y Valdez-Mondragón *en prep.*). En cuanto a los microhábitats, las especies de este género en México se han encontrado en cuevas en zona de penumbra y a pocos metros en zona de completa oscuridad, en paredes de roca caliza, en grietas de las paredes, a nivel del suelo, debajo o entre montículos de rocas, en laderas secas o cortes de pared en caminos de terracería, y en plantas secas como saguaros, biznagas, opuntias y entre cortezas de árboles como mezquites y acacias (Figuras 21-25) (Hite

y cols. 1966; Gertsch, 1967; Gertsch y Ennik, 1983; Fischer y Vasconcellos-Neto, 2005; Potter, 2005; Binford y cols. 2008; obs. pers.). Las arañas violinistas son arañas tímidas. Las hembras durante el día suelen encontrarse en áreas oscuras y aisladas, son más sedentarias y regularmente se han encontrado exoesqueletos de muda de distintos estadios junto a ejemplares maduros, lo cual indica que pasan la mayoría de su vida en el mismo lugar y en la misma telaraña (Figuras 26, 27) (Sandidge y Hopwood, 2005; Binford y cols. 2008; Chaim, y cols. 2011; obs. pers.). Los machos adultos son más activos, desplazándose distancias más lejanas, por lo regular en temporada de reproducción, esto debido a que buscan hembras para copular (Valdez-Mondragón y cols. 2018a). Estas arañas no emplean una red para capturar sus presas, esperan en su telaraña, por lo cual extienden hilos de seda, que les servirán para alertarlas cuando pase una posible presa (regularmente insectos) y así poder capturarla (Vetter, 2008). Sandidge (2003) reporta que *Loxosceles reclusa* Gertsch y Mulaik, 1940 muestra una clara preferencia por la presa muerta sobre la presa viva (Figura 27). De manera general, las arañas *Loxosceles* tienen un promedio de vida de 1 a 2 años en cautiverio (Hite y cols. 1966).

En comparación con otras arañas que producen cientos de huevecillos por ovisaco durante su etapa de vida, como el caso de *Latrodectus mactans* que llega a depositar cientos de huevos por ovisacos, llegando a poner de 6 a 7 ovisacos por temporada (Valdez-Mondragón y cols. 2018a), las arañas del género *Loxosceles* tienen una fecundidad más baja (Vetter, 2008). En estudios de laboratorio, una hembra de *L. reclusa* llega a poner en promedio 50 huevecillos por ovisaco, con una tasa de eclosión de 48% (Hite y cols. 1966). Para el caso de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 los ovisacos contenían 30 huevecillos con una tasa de eclosión del 70% (Fischer y Vasconcellos-Neto 2005). Además, estudios realizados con *L. reclusa* han demostrado que con un solo apareamiento las hembras presentan una disminución en la fecundidad en cuanto al número de ovisacos, de huevecillos y la viabilidad por temporada (Horner y Stewart 1967; Fischer y Vasconcellos-Neto 2005; Vetter, 2008).

Para el caso de las especies mexicanas en el Laboratorio de Aracnología LATLAX, del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), del Instituto de Biología, UNAM, se han realizado observaciones con respecto a la puesta de ovisacos. Para una hembra de *L. misteca* de Guerrero se registraron dos ovisacos, del primero se contabilizaron 23 huevecillos de los cuales el 91% eclosionó, y del segundo se registraron 37 huevecillos con

un éxito de eclosión del 100%. También se tiene registro de una hembra de *L. aff. colima* de Michoacán, que tuvo una puesta de dos ovisacos con diferente número de huevecillos. Para el primero se registraron 51 huevos, de los cuales el 61% eclosionó. Del segundo se registraron 38 huevecillos de los cuales ninguno eclosionó. Adicionalmente, se tiene registro de una hembra de *L. jaca* de Hidalgo, la cual depositó un ovisaco con 32 huevecillos de los cuales el 44% eclosionaron. Asimismo, se registró el caso de una hembra de *L. zapoteca* la cual depositó un total de 107 huevecillos, con un éxito de eclosión del 100% (Valdez-Mondragón y cols. 2018a).



Figuras 21-25. Hábitats y microhábitat naturales del género *Loxosceles* en México. 21. Matorral xerófilo, Durango, México. 22. Matorral xerófilo, Hidalgo, México. 23. Selva baja caducifolia, Puebla, México. 24. Entrada de la cueva “General Carlos Pacheco”, Municipio de Pilcaya, Guerrero, México. 25. Grutas de Tolantongo, Hidalgo, México. Las flechas indican microhábitat específico donde pueden ser encontrados los ejemplares en ambiente silvestre. Fotos: 21 por José C. Valerdi Tlachi (2018), 22-25 por Alejandro Valdez Mondragón (2018).



Figura 26-27. Hembras de *Loxosceles malintzi*, 26) En estado de reposo en su telaraña. 27) Con restos de sus presas. Fotos por Humberto J. Lacayo Ramírez (2018).

Ocasionalmente, algunas especies de arañas violinistas se les encuentra fuera de su rango de distribución natural. Esto podría deberse a transporte incidental por la acción humana (antropocoría), ya que viajan como polizones en plantas, cajas, o material de construcción o materiales en general, ampliando así su distribución a lugares donde no se tenía registro (Potter, 2005; Binford y cols. 2008; Vetter, 2008; Planas y Ribera, 2014). Para México, se tiene registro de dos especies introducidas: *Loxosceles reclusa* Gertsch y Mulaik 1940, procedente de Sudamérica para Tamaulipas y *Loxosceles rufescens* Dufour, 1820, procedente de Europa para Chihuahua (Valdez-Mondragón y cols. 2018a; Valdez-Mondragón y cols. 2018b, 2019)

A las arañas violinistas también se les encuentra en zonas urbanas, y a menudo se encuentran dentro de casas en lugares donde por lo regular hay poco movimiento (detrás de los muebles y cuadros, en rincones, áticos, sótanos, bodegas, armarios y registros), que sirven de refugio para estas arañas (Chaim y cols. 2011). En una casa inhabitada en Tlaxcala, México, se encontraron en 1 hora 30 minutos 71 ejemplares de *L. tenochtitlan* siendo los refugios predilectos detrás de cuadros u objetos pegados a la pared, dentro de muebles como alacenas, closets, detrás de cajas, a nivel del suelo detrás de puertas y dentro de zapatos (Valdez-Mondragón y cols. 2018a). A pesar de convivir con el humano, los casos de mordedura son en realidad raros y escasos (Schenone y cols. 1970; Vetter y Barger 2002). Vetter y Barger (2002) encontraron en seis meses 2,055 arañas reclusa parda *L. reclusa* dentro de una casa en Lenexa, Kansas, Estados Unidos. A pesar de la abundancia, ninguno de los miembros de la familia sufrió mordedura durante ese periodo de tiempo.

Sandidge y Hopwood (2005) mencionan que las arañas reclusas son muy resistentes, ya que pueden sobrevivir varios meses sin comida ni agua. Especímenes alojados en cajas de plástico habían vivido 10 meses sin comida ni agua y en un recipiente hermético; y hasta seis meses, sin comida, agua o aire fresco (Sandidge y Hopwood, 2009).

Todas las especies del género *Loxosceles* destacan por la capacidad de su veneno hemotóxico, el cual ocasiona lesiones necróticas en el tejido, además de daños internos en riñones e hígado, principalmente causado por la acción de la enzima esfingomielinasa D, la cual provoca la condición clínica llamada loxoscelismo (Newlands y Atkinson, 1990; Moye de Alba, 1997; Tambourgi y cols. 2000; Young y Pincus, 2001; De Roodt y cols. 2002; Vetter y Barger, 2002; Binford y Wells, 2003; Domingos y cols. 2003; da Silva y cols. 2004; Ramos-Cerrillo y

cols. 2004; Barbaro y cols. 2005; Oliveira y cols. 2005; Vetter, 2008; Binford y cols. 2008; Ramos-Cerrillo, 2012; Planas y Ribera, 2014). La mayoría de las mordeduras, las cuales son indoloras, ocurren accidentalmente y como defensa, por lo regular en las noches cuando la persona duerme o cuando se viste, como por ejemplo cuando una araña queda atrapada inadvertidamente entre la piel desnuda y la ropa, y esta presión ocasiona el accidente (Potter, 2005; Vetter, 2008).

1.6 Historia taxonómica de *Loxosceles* y distribución en México

Respecto a la taxonomía con el género *Loxosceles*, la primera especie descrita para México fue *L. yucatanana* por Chamberlin y Ivie (1938) (Cuadro 1). Posteriormente, en una revisión del género para Norteamérica, América Central y las Antillas, Gertsch (1958) describió seis especies para México, y Gertsch (1973) describió siete especies más para el país. La revisión más completa y reciente del género para México fue realizada hace 35 años por Gertsch y Ennik (1983), en donde describieron 20 especies adicionales (Cuadro 1). Dichos trabajos taxonómicos estaban basados solamente en caracteres morfológicos. Después se realizaron solamente nuevos registros para algunos estados del país y la descripción del macho de *Loxosceles mulege* Gertsch y Ennik, 1983 por Jiménez y Llinas (2005) (Cuadro 1).

Las 20 especies descritas por Gertsch y Ennik (1983) estuvieron basadas en la forma de los bulbos y émbolos de los machos, y en la forma de los receptáculos seminales de las hembras. Sin embargo, en el caso de los receptáculos seminales, en los trabajos de Gertsch (1958, 1973) y Gertsch y Ennik (1983), para muchas de las especies se ilustró variación intraespecífica considerable en su forma y tamaño. Por ejemplo, Gertsch (1973), ilustró 15 tipos de variación continua en la forma y tamaño de la espermateca para *L. deserta*, especie distribuida en México y Estados Unidos. Para el caso de los machos, solamente se ilustra un tipo de pedipalpo para cada especie, sin describir si existía o no variación intraespecífica continua para dicha estructura importante taxonómicamente para la identificación a nivel de especie.

Recientemente, se describieron dos nuevas especies para México: *L. malintzi* (Valdez-Mondragón y cols. 2018b) y *L. tenochtitlan* (Valdez-Mondragón y cols. 2019); *L. malintzi* con distribución en los estados de Puebla, Guerrero y Morelos, México. Esta especie fue

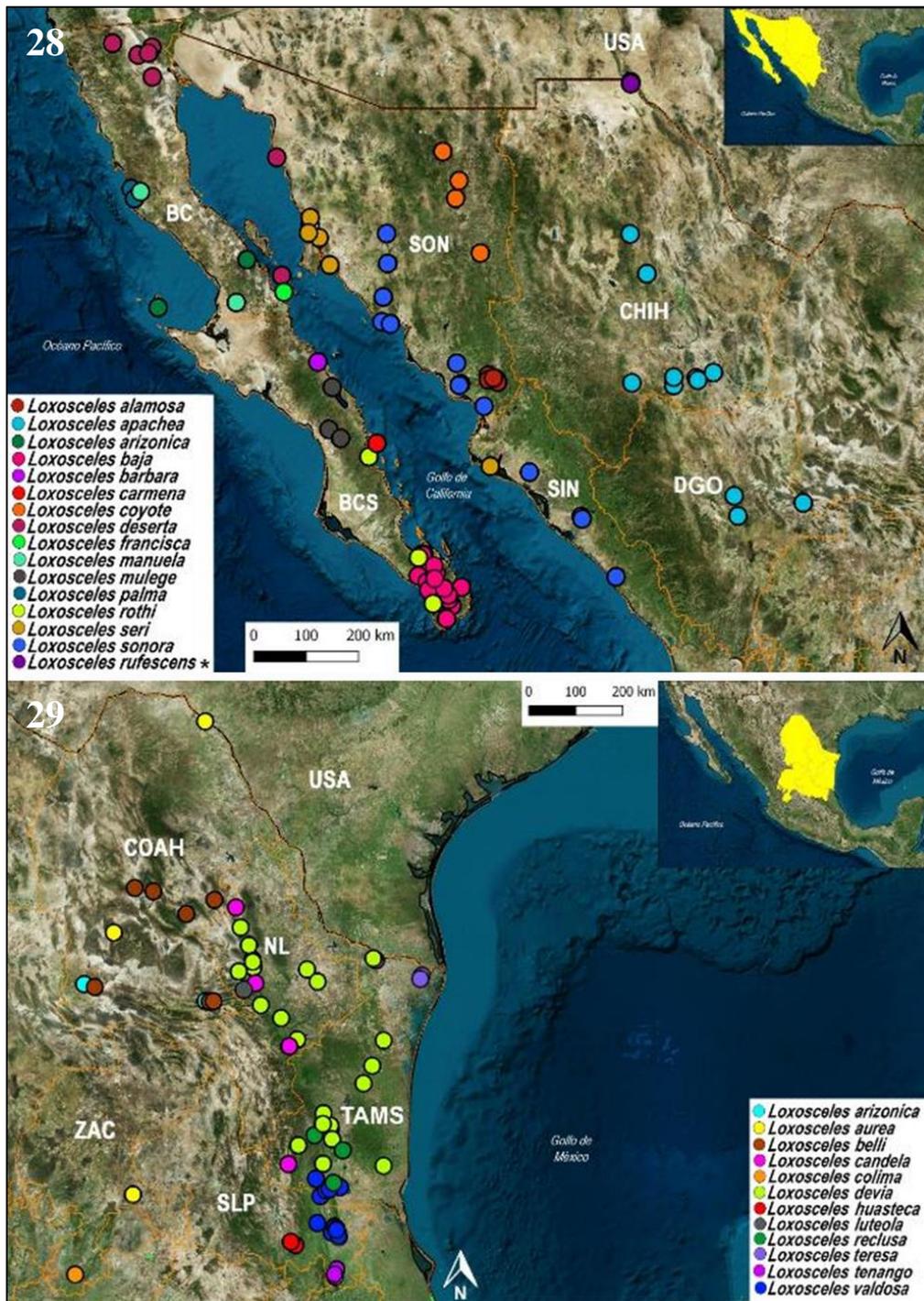
corroborada con evidencia morfológica, biogeográfica, con fotografías de microscopía electrónica de barrido (Cortez-Roldán, 2018; Valdez-Mondragón y cols. 2018b Juárez-Sánchez, 2019), y con evidencia molecular (Valdez-Mondragón y cols. 2019; Navarro-Rodríguez y Valdez-Mondragón, *en prep.*). Además, en este trabajo se registra por primera vez *L. rufescens* para México, una especie introducida de la cuenca mediterránea y de Medio Oriente (Nentwig y cols. 2017; Tahami y cols. 2017; Valdez-Mondragón y cols. 2018b). *Loxosceles tenochtitlan* con distribución en los estados de Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México descrita bajo un contexto de taxonomía integradora: con evidencia de morfología tradicional, lineal y geométrica, marcadores moleculares (COI+ITS2) y modelaje de nicho ecológico (Valdez-Mondragón y cols. 2019) (Cuadro 1).

Cuadro 1 Especies y distribución actual por estado del género *Loxosceles* en México.

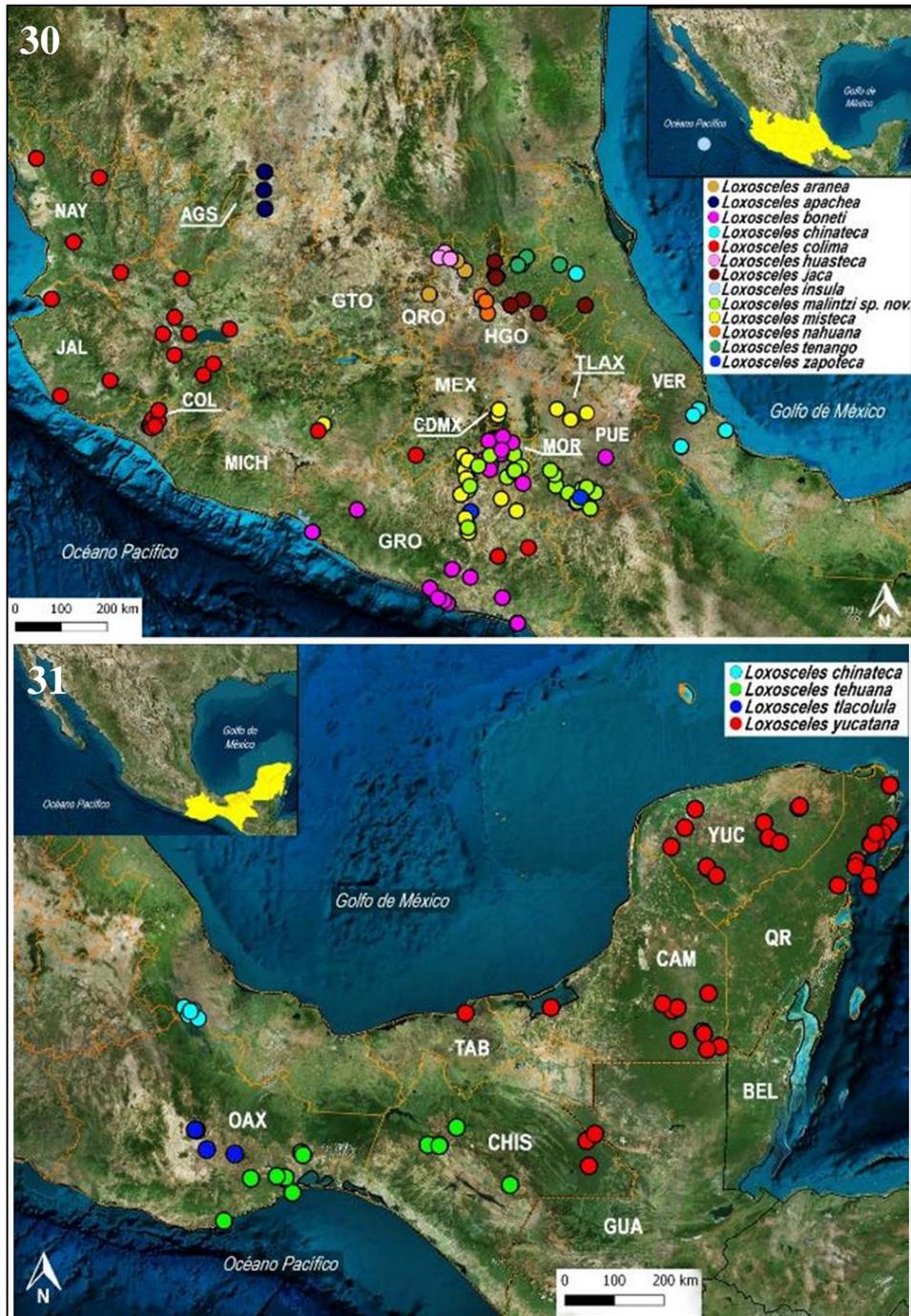
No.	Especie	Autor y año	Distribución
1	<i>Loxosceles alamosa</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Sonora
2	<i>Loxosceles apachea</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Chihuahua, Zacatecas y Durango
3	<i>Loxosceles aranea</i>	Gertsch, 1973	Querétaro
4	<i>Loxosceles arizonica</i>	Gertsch y Mulaik, 1940	Baja California Norte
5	<i>Loxosceles aurea</i>	Gertsch, 1973	Durango y Coahuila
6	<i>Loxosceles baja</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Sur
7	<i>Loxosceles barbara</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Sur
8	<i>Loxosceles belli</i>	Gertsch, 1973	Coahuila
9	<i>Loxosceles boneti</i>	Gertsch, 1958	Guerrero, Puebla y Morelos
10	<i>Loxosceles candela</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Nuevo León
11	<i>Loxosceles carmena</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Sur
12	<i>Loxosceles chinateca</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Oaxaca y Veracruz
13	<i>Loxosceles colima</i>	Gertsch, 1958	Colima, Jalisco y Nayarit
14	<i>Loxosceles coyote</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Sonora
15	<i>Loxosceles deserta</i>	Gertsch, 1973	Baja California Norte
16	<i>Loxosceles devia</i>	Gertsch y Mulaik, 1940	Tamaulipas y Nuevo León.
17	<i>Loxosceles francisca</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Norte
18	<i>Loxosceles huasteca</i>	Gertsch y Ennik, 1983	San Luis Potosí
19	<i>Loxosceles ínsula</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Sur
20	<i>Loxosceles jaca</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Hidalgo
21	<i>Loxosceles luteola</i>	Gertsch, 1973	Nuevo León
22	<i>Loxosceles malintzi</i>	Valdez-Mondragón, Cortez-Roldán, Juárez-Sánchez y	Guerrero, Morelos y Puebla

		Solís-Catalán, 2018	
23	<i>Loxosceles manuela</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Norte
24	<i>Loxosceles misteca</i>	Gertsch, 1958	Guerrero
25	<i>Loxosceles mulege</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Sur
26	<i>Loxosceles nahuana</i>	Gertsch, 1958	Hidalgo
27	<i>Loxosceles palma</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Norte
28	<i>Loxosceles reclusa</i>	Gertsch y Mulaik, 1940	Tamaulipas
29	<i>Loxosceles rothi</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Baja California Sur
30	<i>Loxosceles rufescens</i>	(Dufour, 1820)	Chihuahua
31	<i>Loxosceles seri</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Sonora y Sinaloa
32	<i>Loxosceles sonora</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Sonora y Sinaloa
33	<i>Loxosceles tehuana</i>	Gertsch, 1958	Oaxaca y Chiapas
34	<i>Loxosceles tenango</i>	Gertsch, 1973	Hidalgo y San Luis Potosí
35	<i>Loxosceles tenochtitlan</i>	Valdez-Mondragón y Navarro-Rodríguez, 2019	Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México
36	<i>Loxosceles teresa</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Tamaulipas
37	<i>Loxosceles tlacolula</i>	Gertsch y Ennik, 1983	Oaxaca
38	<i>Loxosceles valdosa</i>	Gertsch, 1973	San Luis Potosí y Tamaulipas
39	<i>Loxosceles yucatanana</i>	Chamberlin y Ivie, 1938	Campeche, Tabasco, Yucatán y Quintana Roo.
40	<i>Loxosceles zapoteca</i>	Gertsch, 1958	Guerrero y Puebla

Con respecto a la distribución geográfica de las especies de México, Cortez-Roldán (2018) estudió la distribución real y potencial de las especies del género *Loxosceles* para México, en la cual se dividió a la República Mexicana en cuatro regiones geográficas: 1) Región Noroeste, 2) Región Noreste, 3) Región Centro-Occidente, y 4) Región Sureste (Figuras 28-31). Las regiones presentaron los siguientes números de registros de especies de *Loxosceles*: la región Centro-Occidente con 218 registros, la región Noroeste con 113 registros, la región Noreste con 82 registros y la región Sureste 69 registros (Figuras 28-31). Las regiones presentaron los siguientes números de especies: la región Noroeste con 16 especies, la región Centro-Occidente con 13 especies, la región Noroeste con 11 especies y la región Sureste con cuatro especies. La cantidad de registros se relaciona con los eventos de recolecta los cuales han sido en su mayoría para la región Centro-Occidente (Cortez-Roldán, 2018; Valdez-Mondragón y cols. 2018a, b).



Figuras 28-29. Registros actualizados de las especies de *Loxosceles* para los estados del norte de México. 28) Región Noroeste. 29) Región Noreste. Asterisco en *L. rufescens* indica un nuevo registro para México. Abreviaturas de los estados mexicanos: BC, Baja California; BCS, Baja California Sur; CHIH, Chihuahua; COAH, Coahuila; DGO, Durango; NL, Nuevo León; SIN, Sinaloa; SLP, San Luis Potosí; SON, SONORA; TAMS, Tamaulipas; ZAC, Zacatecas. Tomados de Valdez-Mondragón y cols. (2018a, b).



Figuras 30-31. Registros actualizados de las especies de *Loxosceles* para los estados de la región centro y sur de México. 30) Región Centro-Occidente. 31) Región Sureste. Abreviaturas de los estados mexicanos: AGS, Aguascalientes; CAM, Campeche; CDMX, Ciudad de México; CHIS, Chiapas; COL, colima; MEX, Estado de México; GTO, Guanajuato; GRO, Guerrero; HGO, Hidalgo; JAL, Jalisco; MICH, Michoacán; Mor, Morelos; NAY, Nayarit; OAX, Oaxaca; PUE, Puebla; QR, Quintana Roo; QRO, Querétaro; TAB; Tabasco; TLAX, Tlaxcala; VER, Veracruz; YUC, Yucatán. Tomados de Valdez-Mondragón y cols. (2018a, b).

1.7. Herramientas moleculares para la delimitación de especies

La delimitación de especies forma parte de la sistemática moderna, la cual consiste en un ejercicio argumentativo para delimitación de linajes y taxones (Hebert, 2003). El usar múltiples enfoques y datos adicionales para reconocer especies forma parte de la taxonomía integradora, la cual se define como el criterio que tiene como objetivo delimitar las unidades de la diversidad de la vida desde perspectivas múltiples y complementarias (filogeografía, morfología comparada, genética de poblaciones, ecología, desarrollo, comportamiento, datos moleculares, etc.) (Dayrat, 2005; DeSalle y cols. 2005). Además, un enfoque integrador nos brinda mayor nivel de confianza al momento de delimitar a las especies como linajes bien definidos.

Una manera de entender cómo funciona la taxonomía integradora es mediante el círculo taxonómico propuesto por DeSalle y cols. (2005). El “círculo taxonómico” (Apéndice 3) representa una propuesta metodológica para el reconocimiento de especies o linajes, y es un esquema que representa el enfoque de la taxonomía integradora y cómo a partir del uso de distintas líneas de evidencia se puede llegar al reconocimiento de nuevo linajes. Las líneas que lo atraviesan indican las rutas experimentales (morfología, reproducción, ecología, geografía y ADN) que pueden ser utilizadas individualmente o en conjunto para reconocer o corroborar una hipótesis taxonómica (Dayrat, 2005; DeSalle y cols. 2005). El reconocimiento de la hipótesis taxonómica se da a partir de que dos o más de las diferentes rutas o herramientas, son congruentes y esto permite “salir” o “romper” del círculo, corroborando así nuestra hipótesis de especies o linajes distintos. De esta manera, se puede reconocer y/o delimitar especies por medio de diferentes tipos o evidencias de caracteres, ya sean morfológicos, moleculares, fisiológicos, conductuales, ecológicos, reproductivos y geográficos (DeSalle y cols. 2005; Flores, 2007), los cuales se pueden usar por separado o en conjunto e incluir a más de una, de este modo y con base en el carácter seleccionado se establece el concepto de especies que se maneja.

Hasta ahora, se han propuesto más de 25 conceptos de especie (Mayden, 1997, 1999, de Queiroz, 2007), y aunque no existe un concepto universal de especies (Ortiz y Francke, 2016), existe un consenso en el cual se considera a las especies como linajes en el tiempo que representan su genealogía (Cadena-Mendoza, 2016; de Queiroz, 2007). Existen diferentes métodos para la delimitación de especies, los cuales pueden ser a nivel morfológico, genético e

incluso biogeográfico: morfometría, marcadores moleculares para evaluar distancias (p) génicas, topología de árboles filogenéticos, presencia o ausencia de flujo génico, agregación cladística de haplotipos, modelaje de nicho ecológico, por citar algunos (Morgan y Blair, 1998; Téllez-Mazzocco, 2006; Smith y cols. 2008; Wheeler y cols. 2017; Cortez-Roldán y Valdez-Mondragón, 2018; Piacentini y Ramírez, 2019).

Hasta el momento existen 48,362 especies de arañas (WSC, 2019) a pesar de este gran número de especies descritas aún faltan por describir gran cantidad de especies (Barrett y Hebert 2005). Sin embargo, Barrett y Hebert (2005) mencionan que determinar especies por medio de morfología para ciertos casos tiene sus complicaciones, una de ellas es que la mayoría de las identificaciones se basan en ejemplares adultos, por lo tanto, etapas juveniles son no identificables. El dimorfismo sexual es otra complicación, ya que se utilizan caracteres diferentes para identificar hembras y machos. Otras identificaciones se limitan a la determinación de un solo sexo y más recientemente el descubrimiento de polimorfismos en la genitalia de algunas especies de arañas (Huber y González 2001; Jocque 2002; Valdez-Mondragón, 2010) añaden complicaciones. Debido a esto, propusieron el uso de herramientas basadas en ADN como una solución al problema de delimitación de especies de arañas en ciertos grupos de arañas (Tautz y cols. 2002, 2003; Hebert y cols. 2003; Blaxter y Floyd 2003; Ortiz y Francke, 2016).

Barrett y Hebert (2005) proponen utilizar el gen mitocondrial Citocromo *c* Oxidasa subunidad 1 (CO1) como parte del código de barras para delimitar entre especies de arañas; pero sin dejar de lado las identificaciones por medio de caracteres morfológicos (taxonomía tradicional), ya que las secuencias de ADN son solo una fuente de caracteres adicional para el descubrimiento, reconocimiento y delimitación de especies (Prendini, 2005).

La iniciativa del Código de Barras de la vida (DNA Barcoding) fue propuesta por Hebert y cols. (2003), se basa en caracteres moleculares (divergencia genética) para la identificación y delimitación de especies, utiliza un fragmento de 650 pares de bases del gen CO1, el cual sirve como medida estándar de comparación entre taxones (Pérez-Ponce de León, 2018). Por medio de la extracción de una muestra de tejido de un organismo, se obtiene una secuencia corta de ADN estandarizada (Hebert y cols. 2003; Savolainen y cols. 2005) que posteriormente se compara con otras secuencias almacenadas en una base de datos (León-Règagnon, 2018), los

códigos de barras de especímenes desconocidos que no concuerden con ninguna especie presente en la base de datos de referencia pueden sugerir que la base de datos está incompleta o que se trata de una posible nueva especie (Mata-López y cols. 2018).

La forma apropiada de delimitar especies es analizar estos datos con una amplia variedad de métodos y delimitar linajes que sean consistentes en los resultados y congruentes entre los métodos (Carstens y cols. 2013; Luo y cols.2018). De igual manera hay que señalar que las inferencias extraídas de los estudios de delimitación de especies deben ser conservadoras, ya que en la mayoría de los contextos es mejor no delimitar especies que delimitar falsamente entidades que no representan linajes evolutivos reales (Carstens y cols. 2013; Luo y cols.2018).

Un ejemplo de esto, es el trabajo de Satler y cols (2013), quienes delimitaron las especies de un grupo de arañas trampilla utilizando seis métodos diferentes, para la delimitación de especies, los cuales delimitaron entre tres y 18 linajes y Satler y cols (2013) interpretaron esta incongruencia de manera conservadora al reconocer tres de estos linajes como especies. Ya que la mayoría de los métodos eran congruentes con tres y cuatro linajes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Delimitación de especies de arañas con herramientas moleculares

El proceso de reconocimiento y descripción de especies lleva implícito el potencial descubrimiento de especies crípticas. Estas últimas se definen, como aquellas que son morfológicamente indistinguibles, pero genéticamente diferentes (Bickford y cols. 2007). Para delimitar especies es necesario el uso de datos morfológicos y moleculares, con estos últimos se obtienen diferencias genéticas que permiten buscar caracteres morfológicos más detallados para establecer de manera objetiva, que se trata de dos entidades evolutivas distintas, enfatizando así también la relevancia de la taxonomía alfa basada en morfología (Schlick-Steiner y cols. 2007).

Actualmente existen varias aproximaciones para la delimitación de especies de arañas empleando datos moleculares. Recientemente, Hamilton y cols. (2011), reconstruyeron la filogenia del grupo de especies *hentzi* y de especies hermanas del género de tarántulas *Aphonopelma* Pocock, 1901 (familia Theraphosidae Thorell, 1869), y también utilizaron un conjunto de marcadores mitocondriales para la delimitación de especies, su enfoque incluyó métodos basados en árboles de ADN (inferencia bayesiana), distancias genéticas no corregidas y el modelo de coalescencia ‘Generalized Mixed Yule Coalescent’ (GMYC). Como resultado de los análisis se obtuvieron tres especies adicionales para el género *Aphonopelma*, con base en los marcadores moleculares CO1 y 16S.

Posteriormente, Hamilton y cols. (2014) evaluaron la eficacia de distintos métodos moleculares para la delimitación de especies de *Aphonopelma*, debido a que los caracteres morfológicos usualmente empleados en arañas no eran informativos para el género para evaluar los límites intra e interespecíficos, como es el caso de pedipalpos en machos y receptáculos seminales en hembras. En este estudio se utilizó el marcador CO1 y se usó el método de distancias Neighbor-Joining (NJ) con tres enfoques modernos de delimitación cuantitativa de especies (Automatic Barcode Gap Discovery procedure (ABGD), un plugin en Geneious v. 7.0 para delimitación de especies P ID (Liberal) y (GMYC). Los análisis revelaron una notable consistencia y congruencia entre los diversos enfoques y como resultado, se obtuvieron siete

supuestas especies recién descubiertas y nueve especies no reconocidas previamente con la taxonomía clásica, por tratarse de especies crípticas.

Hendrixson y cols. (2015), usando dos métodos (morfometría y análisis filogenético), delimitaron especies de la familia Theraphosidae del género *Aphonopelma*, utilizando dos métodos de cohesión basado en medidas de intercambiabilidad genética (GE) e intercambiabilidad ecológica (EI), además utilizaron el gen CO1 y realizaron un análisis de distancias (p) genéticas y un análisis de inferencia bayesiana. Como resultado su enfoque integrador delimitó tres nuevas especies.

Ortiz y Francke (2016), realizaron la delimitación de las especies de tarántulas del género *Bonnetina* Vol, 2000, un género endémico de México. Además de evidencia morfológica, utilizaron métodos moleculares basados en distancia (Hard-Gap DNA barcoding y ABGD), basados en árboles (Poisson Tree Processes (PTP) y Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP)) y en métodos de coalescencia (GMYC), usando los marcadores CO1 e ITS1 (Espaciador Interno Transcrito 1). Se delimitaron 12 especies robustamente soportadas por los datos moleculares, de las cuales siete estaban aun sin describir, siendo tres especies consideradas morfológicamente crípticas. Para la identificación de especies de *Bonnetina*, con CO1 se propusieron umbrales intra e interespecíficos de 2% y 6% de divergencia, respectivamente.

Recientemente, Aguilera-Ardiles (2016) realizó un estudio sobre delimitación de especies del género *Latrodectus* en Chile a partir de evidencia molecular y morfológica, en el cual por medio de CO1 y el método de Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) se lograron determinar y corroborar especies de *Latrodectus* que morfológicamente eran difíciles de identificar. Recuperando solo dos agrupaciones; *geometricus* y *mactans* con buen soporte y validados por caracteres morfológicos robustos.

2.2 Delimitación de especies con marcadores moleculares en el género *Loxosceles*

En cuanto a estudios filogenéticos con base en caracteres moleculares de la familia Sicariidae, Binford y cols. (2008) realizaron el primer análisis filogenético con datos moleculares para establecer los patrones de divergencia y de vicarianza entre *Loxosceles* y *Sicarius* causados por

la deriva continental. En dicho estudio incluyeron datos de representantes de todas las regiones geográficas nativas de *Loxosceles* y *Sicarius*, exceptuando *Loxosceles* de África del Norte y Central. Para el análisis utilizaron los genes 28S, CO1, 16S y NADHI. Aunque este trabajo estaba enfocado más hacia la filogenia del grupo y cuestiones macroevolutivas y no a la delimitación de especies como tal, se incluyeron cuatro especies de México: *L. baja*, *L. boneti*, *L. aff. colima* y *L. chinateca*. Los resultados apoyan que el ancestro común más reciente entre *Loxosceles* y *Sicarius* provino de Gondwana Occidental, antes de la separación de África y Sudamérica. Asimismo, se menciona que la migración de las especies de *Loxosceles* hacia América del Norte coincide con la colonización a través del puente de Panamá (Binford y cols. 2008).

El primer trabajo sobre delimitación de especies utilizando datos moleculares en el género *Loxosceles* fue realizado por Ribera y Planas (2009), en donde describen una nueva especie del género para Túnez, la cual tiene un alto grado de similitud morfológica con *L. gaucho* Gertsch, 1967, una especie distribuida en Brasil. Sin embargo, al realizar la delimitación de especie utilizando el gen CO1 y analizando las distancias genéticas se encontró una diferencia significativa entre ambas especies, ya que la especie nueva (*L. mrazig sp. norte*), presentó una distancia (*p*) genética alta (más del 20%), corroborando que se trataba de una especie distinta a *L. gaucho*. Con estos resultados, los autores discuten que la similitud morfológica entre estas dos especies puede ser explicada como un fenómeno de convergencia evolutiva debido a la simplicidad de las estructuras sexuales como ya se ha discutido con anterioridad. El género *Loxosceles* se caracteriza por tener estructuras sexuales simples, hembras con receptáculos seminales muy variables y pedipalpos de los machos con poca variación, lo cual complica en ocasiones la delimitación y límites de una especie y otra.

Posteriormente, Planas y Ribera (2014) describiendo la diversificación, colonización y delimitación de las especies de *Loxosceles* en las Islas Canarias en el Océano Atlántico, utilizaron especies de *Loxosceles* de África occidental y la cuenca mediterránea con la finalidad de probar la monofilia del grupo y delimitar linajes evolutivos, ya que son las especies que están estrechamente relacionadas de las áreas vecinas. En total utilizaron material de 13 especies: *L. mrazig*, *L. rufescens*, *L. foutadjalloni* Millot, 1941, *L. rufescens*, *L. aff. rufescens*, *L. sp. Fuerteventura*, *L. sp. Lanzarote*, *L. sp. Gran Canaria 2*, *L. sp. Gran Canaria 1*, *L. sp. La Gomera-*

El Hierro, *L. sp.* Tenerife 1, *L. sp.* Tenerife 2, *L. sp.* Tenerife 3. También utilizaron el registro fósil, con la finalidad de tener un marco de tiempo para la calibración y de esta manera explicar los periodos de diversificación del género. Para los análisis moleculares, utilizaron los genes CO1, 16S, NADH, H3 e ITS2. Los resultados de los análisis filogenéticos arrojaron un clado bien soportado para las ocho especies de las Islas Canarias (*L. sp.* Fuerteventura, *L. sp.* Lanzarote, *L. sp.* Gran Canaria 2, *L. sp.* Gran Canaria 1, *L. sp.* La Gomera-El Hierro, *L. sp.* Tenerife 1, *L. sp.* Tenerife 2, *L. sp.* Tenerife 3), en total, revelando la presencia de un linaje de *Loxosceles* endémico del archipiélago. Adicionalmente, se encontraron representantes de la especie cosmopolita *L. rufescens* en las islas. El método de delimitación de especies GMYC identificó siete linajes evolutivos dentro del archipiélago, algunos con distancias (p) genéticas bajas (1.4%) respecto al tiempo de aparición, lo cual sugiere una colonización reciente.

Posteriormente, Planas y Ribera (2015), realizan la descripción de seis nuevas especies crípticas de *Loxosceles* de las Islas Canarias (*L. mahan* sp. nov. endémica de Fuerteventura, Lanzarote; *L. bentejui* sp. nov. y *L. tazarte* sp. nov. ambas endémicas de Gran Canaria; *L. guayota* sp. nov. y *L. tibicena* sp. nov. ambas endémicas de Tenerife y *L. hupalupa* sp. nov. endémica de La Gomera y El Hierro) utilizando una taxonomía integradora, combinando datos moleculares y morfológicos. Utilizaron marcadores nucleares (ITS2) y mitocondriales (CO1), realizaron una identificación previa con base en caracteres morfológicos y la integraron con la parte molecular, para confirmar las especies existentes en la isla, destacando la importancia de los análisis con marcadores mitocondriales cuando existen especies crípticas. En cuanto al análisis de caracteres morfológicos, tuvieron problemas al momento de diferenciar entre especies, debido a las estructuras sexuales simples (receptáculos seminales y pedipalpos), lo que complicaba determinar cuándo se trataba de una especie u otra. Por el contrario, con los datos moleculares y el análisis de distancias (p) con Neighbor-Joining (NJ), se obtuvo una distancia (p) genética mayor al 12%, lo cual sustenta claramente que se trataban de especies distintas.

El trabajo más reciente con delimitación de especies en el género, Tahami y cols. (2017) describieron una nueva especie: *Loxosceles persica* Ribera y Zamani, 2017 de tres cuevas de Irán, esto a partir de datos morfológicos y moleculares, utilizando genes mitocondriales y nucleares: H3, CO1 y 16S. Las tres localidades donde *L. persica* fue recolectada estaban

separadas por 165 y 450 km en línea recta. La divergencia evolutiva media (distancia (p)) de CO1 en las tres localidades es del 16.2%. En tres localidades separadas por menos de 30 km, las distancias (p) genéticas calculadas con CO1 superan el 7% dentro de cada linaje y alcanzan el 12.7% entre linajes vecinos. Asimismo, las tres localidades iraníes donde *L. persica* fue recolectada tienen características geográficas similares. A pesar de pertenecer a la misma especie presentan una alta diversidad genética, misma que pudo haberse desencadenado debido a las distancias entre cada cueva, el microhábitat y la baja dispersión que caracteriza a las especies del género *Loxosceles*. Para las especies del grupo *reclusa* de Norteamérica incluidas las especies de México nunca se ha utilizado una perspectiva integradora para la identificación y delimitación de especies, lo cual es de suma importancia para el caso de México al ser el país con la mayor diversidad a nivel mundial. Esto permitiría saber si la diversidad de especies de *Loxosceles* esta subestimada o no, lo cual podría incrementar el número de especies conocidas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las hembras del género *Loxosceles* presentan una amplia variación morfológica en las estructuras sexuales (receptáculos seminales) que complica la identificación de las especies con base en taxonomía tradicional, poniendo en duda si se trata de diferentes especies difícilmente reconocibles solamente con evidencia morfológica tradicional, o se trata de especies con amplia variación morfológica interespecífica. A la fecha, no se ha realizado un estudio basado en marcadores moleculares que incluya a especies de *Loxosceles* del grupo *reclusa* de Norteamérica ni de la región Centro-Occidente de México. Debido a lo anterior, este proyecto de investigación permitirá actualizar el conocimiento con base en taxonomía tradicional y datos moleculares para delimitar las especies del género *Loxosceles* en la región Centro-Occidente de México.

4. HIPÓTESIS

Las especies del género *Loxosceles* presentes en México poseen una variación considerable en estructuras taxonómicamente importantes, tales como receptáculos seminales en hembras, por lo que representan un complejo de especies difícilmente identificables solo con morfología tradicional; a diferencia de los machos donde la variación intraespecífica en las estructuras sexuales (pedipalpos) es mínima o casi nula, y la variación interespecífica facilita la separación de las especies. Por lo tanto, la evidencia molecular a la par de la taxonomía tradicional basada principalmente en estructuras masculinas (pedipalpos) nos permitirá una acertada delimitación de las especies del Centro-Occidente de México.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Delimitar a las especies del género *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832 del Centro-Occidente de México con base en un criterio de taxonomía integradora, así como actualizar la información respecto a su diversidad.

5.2 Objetivos Particulares:

1. Delimitar a las especies de *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México utilizando secuencias de ADN (CO1 e ITS2) para estudiar la variación genética intra e interespecífica.
2. Estudiar la variación morfológica intra e interespecífica de estructura de importancia taxonómica como pedipalpos en machos y receptáculos seminales en hembras.
3. Descripción de especies nuevas registradas en el contexto de taxonomía integradora, que hayan sido corroboradas tanto por evidencia morfológica y por la evidencia molecular para la región Centro-Occidente.

6. METODOLOGÍA

6.1 Delimitación del área de estudio

Para este trabajo, se estudiaron las especies de la Región Centro-Occidente de México, la cual incluye los siguientes estados de la República Mexicana: Aguascalientes, Ciudad de México, Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz (Figura 30) CONEVyT (2018). Sin embargo, para fines de este estudio y por el material disponible se trabajó con material de los siguientes estados: Ciudad de México, Colima, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla y Tlaxcala. Las especies de *Loxosceles* reportadas previamente dentro del área de estudio son ocho: *L. boneti*, *L. colima*, *L. jaca*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango* y *L. zapoteca* (Figura 30).

6.1.1 Colecciones científicas

Se revisaron ejemplares del género *Loxosceles* depositados en las siguientes colecciones biológicas nacionales:

- Colección Nacional de Arácnidos (CNAN), Instituto de Biología (IBUNAM), UNAM, México; la CNAN alberga la mayor colección biológica de arañas del género *Loxosceles* en México. Responsable: Dr. Oscar F. Francke Ballvé.
- Laboratorio de Aracnología (LATLAX) del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), Instituto de Biología UNAM, sede Tlaxcala. Responsable: Dr. Alejandro Valdez Mondragón.
- Colección del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIBIC), Universidad Autónoma de Estado de Morelos (material de donación).

6.2 Trabajo de campo

Se realizaron recolectas de ejemplares en localidades registradas en la literatura y en las colecciones: CNAN (UNAM), LATLAX (UNAM) y CIBIC (UAEM) (Cuadro 3), aunado a varias localidades nuevas donde se realizaron muestreos recientemente. Dicho material fue utilizado tanto para análisis moleculares como morfológicos. Debido a que el grupo de estudio es de importancia médica, para los estudios morfológicos, los ejemplares se recolectaron cuidadosamente de forma manual con pinzas aracnológicas, depositándolos en viales y frascos con alcohol etílico al 80% con sus datos correspondientes de recolecta (localidad de colecta, fecha, latitud, longitud, altitud, colectores y tipo de vegetación). Para estudios moleculares, los ejemplares se depositaron en viales con alcohol etílico al 96% y se refrigeraron a -20 °C. El tejido almacenado para extracción de ADN se depositó en ultra-congelación a -70 °C en el Laboratorio de Aracnología (LATLAX) del Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), Instituto de Biología UNAM, sede Tlaxcala. En total se realizaron 14 eventos de recolecta en diferentes localidades, en las cuales se visitaron las localidades tipo de las siguientes especies: *L. malintzi* de Acatlán de Osorio, Puebla; *L. jaca* de Jacala, Hidalgo; *L. nahuana* de Zimapán, Hidalgo; *L. tenango* de Chapulhuacan, Hidalgo; *L. misteca* de Taxco de Alarcón, Guerrero; *L. zapoteca* de Iguala de la Independencia, Guerrero y *L. colima* de Coquimatlán, Colima. También se visitaron otras localidades adicionales para las siguientes especies: *L. tenochtitlan*, de Tepeyanco y Huamantla, Tlaxcala; *L. sp. 1* de Tolantongo, Hidalgo; *L. zapoteca* y *L. malintzi* de Taxco de Alarcón y Pilcaya, Guerrero; y *L. misteca* de Pilcaya, Guerrero (Cuadro 2).

6.3 Revisión e identificación de material

La identificación de las especies se llevó a cabo en el Laboratorio de Aracnología (LATLAX) del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), Instituto de Biología UNAM, sede Tlaxcala. Se revisaron e identificaron ejemplares del género *Loxosceles* de las recolectas realizadas y de las colecciones científicas que se mencionan en la siguiente sección, realizando disecciones de pedipalpos y receptáculos seminales para

identificar a nivel de especie (Figuras 41-101), utilizando la clave de identificación para *Loxosceles* de Norte América de Gertsch y Ennik (1983).

Cuadro 2. Localidades muestreadas en 2017- 2019 de las especies de *Loxosceles* de la Región Centro-Occidente de México. M= machos, H= hembras, J= juveniles.

Colecta No.	Mes/año de colecta	Estado	Localidades muestreadas	No. ejemplares identificados			Especies
				M	H	J	
1	Marzo/2017	Puebla	6	4	6	49	<i>L. malintzi</i>
2	Marzo/2017	Hidalgo	9	7	14	90	<i>L. jaca</i> <i>L. nahuana</i> <i>L. tenango</i>
3	Abril/2017	Tlaxcala	1	0	0	1	<i>L. tenochtitlan</i>
4	Abril/2017	Tlaxcala	1	1	4	17	<i>L. tenochtitlan</i>
5	Mayo/2017	Puebla	3	6	10	91	<i>L. malintzi</i>
6	Julio/2017	Puebla-Oaxaca	23	6	7	40	<i>L. malintzi</i> <i>L. tehuana</i>
7	Septiembre/2017	Guerrero	8	8	30	112	<i>L. misteca</i> <i>L. malintzi.</i> <i>L. zapoteca</i>
8	Marzo/2018	Oaxaca	10	3	7	99	<i>L. chinateca</i>
9	Mayo/2018	Tlaxcala	1	0	24	2	<i>L. tenochtitlan</i>
10	Mayo/2018	Hidalgo	11	27	68	153	<i>L. jaca</i> <i>L. nahuana</i> <i>L. tenango</i> <i>L. sp. 1</i>
11	Junio/2018	Tlaxcala	1	2	0	50	<i>L. tenochtitlan</i>
12	Octubre/2018	Guerrero	16	39	107	207	<i>L. misteca</i> <i>L. zapoteca</i> <i>L. malintzi</i>
13	Enero/2019	Hidalgo	1	1	6	4	<i>L. sp. 1</i>
14	Junio/2019	Jalisco/Colima	15	1	21	137	<i>L. aff. colima</i>
Total:			90	75	208	829	11

Se contó con un total de 85 frascos con ejemplares del género *Loxosceles* de las tres colecciones: LATLAX, CNAN y CIBIC, de los cuales se revisaron 130 machos, 261 hembras y 1072 juveniles, dando un total de 1463 ejemplares y se registraron en total 22 especies (Cuadro 3). Para la región de estudio (Figura 30), se revisaron 113 machos, 268 hembras y 980 juveniles de un total de ocho especies.

Cuadro 3. Material revisado de las especies del género *Loxosceles* del Centro-Occidente de México en colecciones nacionales.

Colección científica	Sede	Material revisado	Especies registradas
Laboratorio de Aracnología (LATLAX)	Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), Instituto de Biología UNAM, Tlaxcala	975 ejemplares	22 especies
Colección Nacional de Arácnidos (CNAN)	Instituto de Biología (IBUNAM), UNAM, México	476 ejemplares	18 especies
Colección del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIBIC)	Universidad Autónoma de Estado de Morelos	12 ejemplares	Una especie
Total		1463 ejemplares	22 especies

6.4 Muestreo taxonómico

Las especies utilizadas en los análisis moleculares se enlistan en el Cuadro 6. Se incluyen nueve especies del género *Loxosceles*, siete especies descritas anteriormente y dos nuevas especies para México. Se utilizaron tres matrices para los análisis moleculares, una para CO1 (674pb) con 39 terminales, una para ITS2 (435pb) con 42 terminales y una matriz concatenada de ambos genes CO1+ITS2 (1109pb) con 50 terminales.

6.4.1 Elección del grupo externo

Se utilizó el criterio de comparación con el grupo externo solamente para enraizar los árboles resultantes, ya que no se pretendió probar la monofilia del género debido a que no fue uno de

los objetivos (Morrone, 2001; Valdez-Mondragón, 2009). Para ITS2 se utilizó un grupo interno: *Loxosceles rufescens* (KR864735) y para CO1 como grupo externo: *Scytodes thoracica* (KR864739). La elección del grupo externo se basó en análisis previos sobre las relaciones filogenéticas del género *Loxosceles* y las subfamilias pertenecientes al clado Synspermiata (Ubick y cols. 2017; Wheeler y cols. 2017). Las secuencias de los grupos interno y externo se obtuvieron de GenBank (Cuadro 8).

6.4.2 Marcadores moleculares

Un marcador molecular se define como fragmento de ADN polimórfico con una ubicación física identificable en un cromosoma el cual nos permite distinguir entre diferentes grupos taxonómicos (hasta nivel de especie o subespecie) poblaciones, familias o individuos (Ríos y cols. 2009; FAO, 2010). Un marcador puede ser un gen o un fragmento de ADN sin función conocida (Franco, 2019). Para fines de este trabajo se eligieron los genes CO1 e ITS2 con base en trabajos con arañas y debido a las características de cada marcador (Cuadro 4). La subunidad 1 del Citocromo *c* Oxidasa mitocondrial (COI) es el marcador de código de barras más utilizado para animales (Kress y Erickson, 2012) y también en arañas (Barret y Hebert, 2005; Maddison y cols. 2008; Hamilton y cols. 2011; Hamilton y cols. 2014; Maddison y cols. 2014; Hendrixson y cols. 2015; Aguilera-Ardiles 2016; Ortiz y Francke, 2016; Astrin y cols. 2016; Akpınar, 2017; Naseem y Tahir, 2018; Piacentini y Ramírez, 2019), así como en arañas del género *Loxosceles* (Binford y cols. 2008; Ribera y Planas, 2009; Planas y Ribera, 2014; Planas y Ribera, 2015; Tahami y cols. 2017). Además de CO1 también se han probado los espaciadores internos transcritos nucleares (ITS) como un marcador de código de barras en arañas (Agnarsson, 2010; Ortiz y Francke, 2016, Cao y cols. 2016) y en el género *Loxosceles* (Planas y Ribera, 2014, 2015). En el Cuadro 4 se enumeran las características referentes a cada marcador molecular utilizado.

Cuadro 4. Características de los marcadores moleculares utilizados en este trabajo.

Características	Marcadores moleculares	
	COI	ITS2
Abreviación		
Nombre	Citocromo <i>c</i> oxidasa I	Espaciador transcrito interno 2
Origen	Mitocondrial	Ribosómico nuclear (nrADN)
Estructura y organización	El ADN mitocondrial codifica 37 genes que corresponden a dos ARN ribosómicos (rARN) componentes de los ribosomas mitocondriales (rARNs 12S y 16S), 22 ARNs de transferencia (tARNs), y 13 polipéptidos componentes de los complejos respiratorios de la membrana interna mitocondrial (sistema OXPHOS). COI; COII y COIII corresponden al complejo IV (Pérez y Montoya, 2012).	El ADN ribosomal (rADN) se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rADN, 5.8 rADN y 28 rADN), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). ITS2 se encuentra entre los genes 5.8S y 28S (Alcántara, 2007).
Secuencias informativas	Nivel de especies y niveles taxonómicos más altos (Hebert y cols. 2003).	Variabilidad de secuencia significativa a nivel de género y especie (Yao y cols. 2010).
Tamaño de secuencia	De 648 pb a 710 pb	De 342 pb
Tasa de evolución	La evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación no solo de las especies estrechamente aliadas, sino también de los grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Cox y Hebert 2001; Wares y Cunningham 2001)	Por la baja tasa de sustitución que presentan, son extremadamente útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas de taxa con tiempos de divergencia muy antiguos (Hillis y cols. 1991).
Ventajas	Se considera que el genoma mitocondrial de los animales es un mejor objetivo para el análisis que el genoma nuclear debido a su falta de intrones, su exposición limitada a recombinación y su modo de herencia haploide (Saccone y cols. 1999; Hebert y cols. 2003). Además, COI parece poseer suficiente divergencia de secuencia para permitir regularmente la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas (Hebert y cols. 2003; Prendini, 2005)	Disponibilidad de regiones conservadas para diseñar cebadores universales, la facilidad de su amplificación y variabilidad suficiente para distinguir incluso especies estrechamente relacionadas (Yao y cols. 2010).

6.4.2 Criterios para la delimitación de especies

Se seleccionó el criterio de integración por congruencia para la delimitación de las especies, el cual se basa en la congruencia de los distintos métodos y evidencias utilizadas (morfología, molecular) para generar hipótesis robustas de especies (Fonseca y cols. 2008; Padial y cols. 2010).

Para los caracteres morfológicos se seleccionaron caracteres como estructuras sexuales pedipalpos en machos y receptáculos seminales en hembras, los cuales se utilizan en la taxonomía tradicional de arañas para la determinación a nivel específico (Cuadro 5).

En cuanto a los métodos moleculares de delimitación, estos fueron establecidos en distancias genéticas (Neighbor Joining (NJ) basado en el umbral de distancia promedio > 2% del código de barras estándar, entre individuos de diferentes especies putativas (Hebert y cols. 2003; Ball y cols. 2005; Zhou y cols. 2009), Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)), en métodos de descubrimiento sin particiones a priori (Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC)) y en árboles filogenéticos bajo el criterio de monofilia (Maximum Likelihood (ML), Bayesian Inference (BI), Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP)) (Padiá y cols. 2010; Carstens y cols. 2013; Bagley y cols. 2019).

Cuadro 5. Caracteres morfológicos utilizados para la delimitación de las especies del género *Loxosceles* del Centro-Occidente de México. x: presente, - ausentes.

Caracteres diagnósticos			
No.	Especie	Caracteres morfológicos	
		Machos (pedipalpos)	Hembras (Receptáculos seminales)
1	<i>L. aff. colima</i>	-	x
2	<i>L. jaca</i>	x	x
3	<i>L. malintzi</i>	x	x
4	<i>L. misteca</i>	x	x
5	<i>L. nahuana</i>	x	x
6	<i>L. tenango</i>	x	x
7	<i>L. tenochtitlan</i>	x	x
8	<i>L. sp. 1</i>	x	x
9	<i>L. zapoteca</i>	x	x

6.5 Trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular

La separación de tejido, las extracciones de ADN, y las amplificaciones por PCR se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del LBCTV, Instituto de Biología UNAM, sede Tlaxcala. La secuenciación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM, en Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

6.5.1 Separación de tejido

Se separó tejido de 207 ejemplares de nueve especies del género *Loxosceles* de la Región Centro-Occidente (Cuadro 6). De cada localidad se tomaron muestras de cinco o seis ejemplares cuando fue posible, pero en algunos casos solo se tuvo un ejemplar por localidad (Cuadro 6).

En cuanto a la cantidad de tejido seleccionado, para ejemplares adultos se disectaron dos patas y en juveniles dependiendo su tamaño se tomaba todo el ejemplar en los más pequeños o de tres a cuatro patas en los medianos (Bruvo-Madarić y cols. 2005). Una vez separado el tejido, se almacenó en etanol al 96% en un refrigerador a -20°C, para posteriormente utilizarlo en la extracción de ADN. A cada muestra se le asignó un código (p. ej. Ara 0001 hasta Ara 0207) y se anexaron a una base de datos en Excel (Molecular IBUNAM-LATLAX), donde se utilizaron los siguientes campos: Código Base LATLAX, FRASCO, No. Caja-tejido, Code LATLAX-DNA (Ara-0001), tejido seleccionado, tejido para extracción, sexo, concentración DNA (ng/μL), phylum, clase, orden, familia, género, especie, autor y año, fecha determinación, país, estado, municipio, localidad, fecha de colecta, colectores, latitud, longitud, altitud (msnm), GPS, hábitat, notas, capturista, fecha de captura, extracción ADN, electroforesis ADN, PCR, CO1, ITS2.

6.5.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit de extracción Qiagen DNeasy Tissue para tejido animal (No. catalogo: 69504), el cual fue modificado para obtener un volumen final de 50 microlitros.

Cuadro 6. Especies de *Loxosceles* del Centro-Occidente de México utilizados en la separación de tejido para extracción de ADN.

Especie	No. ejemplares	Estado	Localidades
<i>L. colima</i>	4	Jalisco	3
	1	Nayarit	1
	1	Michoacán	1
	9	Colima	3
<i>L. aff. colima</i>	6	Jalisco	5
	11	Guerrero	3
	3	Colima	3
	1	Nayarit	1
	1	Michoacán	1
	1	Edo. México	1
<i>L. jaca</i>	15	Hidalgo	1
<i>L. malintzi</i>	44	Puebla	6
	12	Guerrero	2
	1	Morelos	1
<i>L. misteca</i>	1	Michoacán	1
	16	Guerrero	3
<i>L. nahuana</i>	14	Hidalgo	4
<i>L. tenango</i>	11	Hidalgo	2
<i>L. tenochtitlan</i>	7	Ciudad de México	4
	16	Tlaxcala	2
<i>L. sp.1</i>	14	Hidalgo	14
<i>L. zapoteca</i>	18	Guerrero	2
Total	207 ejemplares	12 estados	64 localidades

Se realizaron 283 extracciones en total del género *Loxosceles*, de las cuales 176 fueron para las especies de la región Centro-Occidente pertenecientes a nueve especies: *L. colima*, *L. aff. colima*, *L. jaca*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango*, *L. tenochtitlan*, *L. sp. 1* y *L. zapoteca* de las diferentes localidades de recolecta (Cuadro 6). Cabe destacar que de manera inicial las extracciones no presentaron buena calidad, lo cual se corroboró con lecturas en el

espectrofotómetro y geles de electroforesis, por lo que algunas muestras fueron reconcentradas en la centrifugadora de vacío y en ocasiones fue necesario repetir el proceso de extracción de ADN.

6.5.3 Cuantificación de ADN

Después de la extracción de ADN, se realizó la cuantificación de ADN por medio de un espectrofotómetro Colibri Microvolume Spectrometer-Titertek Berthold, en el cual colocamos 1 µL de extracción ADN para saber la concentración que tenemos en nuestra muestra y su pureza. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230 de la absorbancia en nm, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Velázquez y cols. 2014).

6.5.4 Amplificación por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron dos marcadores moleculares, uno mitocondrial: CO1 de aproximadamente 650 pb (Folmer y cols. 1994; Astrin y Stüben, 2008) y uno nuclear: ITS2 de aproximadamente 350 pb (Ji y cols. 2003; Planas y Ribera, 2014) (Cuadro 7).

Se prepararon alícuotas de los primers a utilizar: CO1 e ITS2, el volumen final fue de 50 µl (10 µM). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti Applied-Biosystems 96 Well Thermal Cycler, en un volumen total de 25 µl: 3 µl de ADN, 8.7 de H₂O inyectable, 12.5 µl de Multiplex-Mix un kit de QIAGEN, 0.4 µl de oligonucleótido (forward y reverse), para CO1 e ITS2 (Cuadro 6). El programa de PCR para CO1 (HCO- LCO y HCO-JJ y LCO-JJ) fue el siguiente: un ciclo de 35 repeticiones; paso inicial a 95° C (1 min), desnaturalización a 95° C (30 s), alineamiento a 48° C (30 s), amplificación a 72°C (1 min),

amplificación final a 72° C (5 min), mantenimiento: 4° C durante tiempo indefinido (∞), siguiendo los protocolos de Folmer y cols. (1994) y Astrin y cols. (2006). El programa de PCR para ITS2 fue el siguiente: por 40 ciclos, desnaturalización inicial: 94° C (3 min), desnaturalización: 94° C (30 s), alineamiento: 53° C (1 min), extensión: 72° C (1 min), extensión final: 72° C (5 min), mantenimiento: 4° C durante tiempo indefinido (∞) siguiendo los protocolos de Ji y cols. (2003).

Cuadro 7. Marcadores moleculares y sus secuencias utilizados para la amplificación por medio de PCR.

Marcador	Nombre de Oligos	Secuencia de Oligos 5'-3'	Referencias
CO1	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Folmer y cols. 1994
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	
	LCO1490-JJ	CHA CWA AYC ATA AAG ATA TYG G	Astrin y Stüben, 2008
	HCO2198-JJ	AWA CTT CVG GRT GCV CAA ARA ATC A	
ITS2	5.8SF CAS28sB1d	CAC GGG TCG ATG AAG AAC GC TTC TTT TCC TCC SCT TAY TRA TAT GCT TAA	Ji y cols. 2003; Planas y Ribera, 2014

6.5.5 Electroforesis de extracción de ADN y de PCR

Para analizar la calidad de la extracción de ADN y la amplificación por medio de PCR, se corrieron geles de agarosa por medio de electroforesis, esto para separar moléculas y determinar la concentración de ADN de los productos amplificados por medio de PCR. Para la preparación del gel se utilizaron 50 ml de TBE, 0.5 gr de agarosa y 0.5 μ l Red gel. Para la preparación de cada una de las muestras, se colocaron 1.75 μ l de Buffer de carga Loading Dye, agregándole 3 μ l de ADN o 1.75 μ l de la muestra amplificada dependiendo el caso, y en el último pocillo del gel agregamos 1.75 μ l del marcador de 100pb Perfect DNA 100 bp Ladder Novagen. Para el caso de los geles de PCR, se agregó un control negativo y uno positivo en este caso de un ejemplar de *Loxosceles malintzi* para corroborar las amplificaciones. Los geles de electroforesis y PCR se corrieron a 100 V por 30 min y se utilizó un transluminador BioDoc-It² Imager 315 Imaging System LMS-20 Transilluminator para ver el gel bajo luz UV y poder observar el

tamaño de los fragmentos de ADN que conforman la muestra, así como su concentración y grado de entereza; y además establecer si hubo amplificación del fragmento o amplicón requerido en PCR (Fierro, 2014).

6.6 Secuenciación, edición y alineamiento de secuencias

Para la secuenciación por método de Sanger, se utilizó el secuenciador Genetic Analyzer 3730xL de 96 capilares, a cargo de la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, Técnico Académico Titular B, responsable del Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM en Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Cada una de las secuencias obtenidas (forward y reverse) se revisaron en el programa en línea BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para verificar que las secuencias pertenecen al género *Loxosceles* que se encuentran en la base de datos de GenBank y para corroborar que no estuvieran contaminadas con ADN exógeno.

La edición de secuencias se realizó con el programa BioEdit Versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y Geneious Versión 10.2.3 (Kearse y cols. 2012). Para el alineamiento de secuencias, se utilizó el programa computacional de alineamiento múltiple MAFFT (Multiple sequence Alignet based on Fast Fourier Transform) Versión 7 (Katoh y Toh, 2008) versión en línea, con una penalización por apertura de 1.53, utilizando la siguiente estrategia de alineación: Automático (FFT-NS-1, FFT-NS-2, FFT-NS-i o L-INS-i; depende del tamaño de los datos. Las secuencias generadas fueron depositadas en el GenBank (www.ncbi.nih.gov) con sus números de acceso (Cuadro 8).

Cuadro 8. Especímenes secuenciados para cada especie del género *Loxosceles* del Centro-Occidente de México, código de ADN, localidades y números de acceso de GenBank.

Especie	Código ADN LATLAX	Localidad	Números de acceso GenBank	
			CO1	ITS2
<i>Loxosceles colima</i>	Ara0115	México: Colima	MK936303	MK957224
<i>Loxosceles colima</i>	Ara0280	México: Colima	MN512430	MN525282
<i>Loxosceles colima</i>	Ara0281	México: Colima	–	MN525283
<i>Loxosceles colima</i>	Ara0282	México: Colima	MN512431	–
<i>Loxosceles colima</i>	Ara0283	México: Colima	MN512432	MN525284
<i>Loxosceles jaca</i>	Ara0186	México: Hidalgo	MK936292	MK957194
<i>Loxosceles jaca</i>	Ara0048	México: Hidalgo	MK936293	–
<i>Loxosceles jaca</i>	Ara0046	México: Hidalgo	MN512427	MK957192
<i>Loxosceles jaca</i>	Ara0047	México: Hidalgo	MN512428	MK957193
<i>Loxosceles jaca</i>	Ara0183	México: Hidalgo	MN512429	MK957199
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0100	México: Guerrero	MK936282	MK957220
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0001	México: Puebla	MK936283	MK957218
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0002	México: Puebla	MK936284	–
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0025	México: Puebla	MK936285	MK957219
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0072	México: Puebla	MK936286	MK957222
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0074	México: Puebla	MK936287	MK957223
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0101	México: Guerrero	MK936288	–
<i>Loxosceles malintzi</i>	Ara0004	México: Puebla	MK936289	MK957221
<i>Loxosceles misteca</i>	Ara0082	México: Guerrero	MK936272	MK957212
<i>Loxosceles misteca</i>	Ara0089	México: Guerrero	MK936273	MK957215
<i>Loxosceles misteca</i>	Ara0090	México: Guerrero	MK936274	MK957214
<i>Loxosceles misteca</i>	Ara0084	México: Guerrero	MK936275	MK957213
<i>Loxosceles misteca</i>	Ara0236	México: Guerrero	MK936276	MN525280
<i>Loxosceles misteca</i>	Ara0237	México: Guerrero	MK936277	MN525281
<i>Loxosceles nahuana</i>	Ara0076	México: Hidalgo	MK936297	MK957216
<i>Loxosceles nahuana</i>	Ara0077	México: Hidalgo	MK936298	–
<i>Loxosceles nahuana</i>	Ara0079	México: Hidalgo	MK936299	MK957217
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0191	México: Hidalgo	MK936290	–
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0192	México: Hidalgo	MK936291	MK957201
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0045	México: Hidalgo	–	MK957195
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0189	México: Hidalgo	–	MK957196
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0190	México: Hidalgo	–	MK957197
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0193	México: Hidalgo	–	MK957198
<i>Loxosceles tenango</i>	Ara0188	México: Hidalgo	–	MK957200
<i>Loxosceles tenochtitlan</i>	Ara0146	México: Ciudad de México	MK936278	MK957209

<i>Loxosceles tenochtitlan</i>	Ara0161	México: Ciudad de México	MK936279	–
<i>Loxosceles tenochtitlan</i>	Ara0173	México: Tlaxcala	MK936280	MK957210
<i>Loxosceles tenochtitlan</i>	Ara0164	México: Tlaxcala	MK936281	MK957211
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0175	México: Hidalgo	MK936294	MK957208
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0181	México: Hidalgo	MK936295	MK957206
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0182	México: Hidalgo	MK936296	MK957207
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0174	México: Hidalgo	–	MK957202
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0176	México: Hidalgo	–	MK957203
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0177	México: Hidalgo	–	MK957204
<i>Loxosceles</i> sp. 1	Ara0178	México: Hidalgo	–	MK957205
<i>Loxosceles zapoteca</i>	Ara0094	México: Guerrero	MK936300	MK957224
<i>Loxosceles zapoteca</i>	Ara0220	México: Guerrero	MK936301	MN525285
<i>Loxosceles zapoteca</i>	Ara0227	México: Guerrero	MK936302	MN525286
<i>Loxosceles rufescens</i>	–	Grecia: Peloponeso	–	KR864735
<i>Scytodes thoracica</i>	–	Turquía: Antalya	KR864739	–

6.7 Análisis de datos moleculares para delimitación de especies

Para los análisis y la delimitación de las especies con datos moleculares, se utilizaron cuatro métodos diferentes: 1) distancias (p) genéticas con Neighbor Joining (NJ) usando MEGA v. 7.0, 2) Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre y cols. 2012), usando matrices de distancia K2P no corregidas a través de la versión en línea (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>), 3) General Mixed Yule Coalescent Model (GMYC) (Pons y cols. 2006) utilizando el servidor web GMYC (<https://species.h-its.org/gmyc/>), y 4) Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) (Zhang y cols. 2013) utilizando el servidor web (<https://species.h-its.org/ptp/>).

Se realizó una matriz concatenada con los dos genes CO1 + ITS2 (1109 caracteres), el modelo seleccionado para ambos genes fue GTR + I + G. Los modelos de evolución se seleccionaron utilizando jModelTest v. 2.1.10 utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) (Posada y Buckley, 2004). Los modelos seleccionados para CO1 e ITS2 para cada bloque de partición fueron: GTR + G + I (primera y segunda posición de codones) y GTR + G (tercera posición).

Los valores de Bootstrap en el análisis de NJ se calcularon con los siguientes comandos: Número de réplicas = 1000, Valores de soporte de Bootstrap = 1000 (Ribera y Planas, 2009)

(valores significativos $\geq 50\%$), Tipo de sustitución = nucleótido, Modelo = Kimura 2 parámetros, Sustitución para incluir = d: Transiciones + Transversiones, Tasas entre sitios = Distribución Gamma (G), Tratamiento de datos faltantes = Eliminación por pares, Seleccionar posición de codón = 1ra + 2da + 3ra + Sitios no codificados.

Los enfoques para la delimitación basada en árboles de código de barras de ADN utilizan explícitamente el concepto de especie filogenética. Se ingresa un árbol inicial de Máxima Verosimilitud (ML) usando MEGA v. 7.0, también se implementó un análisis de Inferencia Bayesiana (BI) usando MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003), el análisis reconoce el grupo monofilético mediante la búsqueda diferencial intra- y patrones de ramificación interespecíficos (Ortiz y Francke 2016).

El análisis de ML se calculó con los siguientes parámetros para CO1, ITS2 y la matriz concatenada: número de repeticiones = 1000, valores de soporte de Bootstrap = 1000 (valores significativos $\geq 50\%$). Los modelos de evolución de secuencia fueron seleccionados utilizando jModelTest = GTR, tasas entre sitios = G + I, No. de categorías gamma discretas = 6, tratamiento de datos de brechas = eliminación completa, selección de posición de codón = 1er + 2do + 3er + Sitios no codificados, método heurístico ML = Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive (SPR nivel 5), Árbol inicial para ML = Crear el árbol inicial automáticamente (Predeterminado - NJ / BioNJ). Los análisis de IB se realizaron con cuatro cadenas de Markov paralelas con los siguientes parámetros: generaciones de MCMC (Markov Chain Monte Carlo) = 20 000 000, frecuencia de muestreo = 1000, frecuencia de impresión = 1000, número de corridas = 2, número de cadenas = 4, MCMC burnin = 2500, sumt burnin = 2500, sump burnin = 2500, Los modelos de evolución de secuencia fueron seleccionados utilizando jModelTest = GTR, Tasas entre sitios = G + I, Seleccionar posición de codón = 1er, 2do y 3er. Se utilizó TRACER versión 1.6 (Rambaut y cols. 2018) para analizar los parámetros y el tamaño de muestreo efectivo (ESS) del método MCMC para garantizar que las pruebas convergieran. Se utilizó FigTree versión 1.4.3 para visualizar la topología del árbol con los valores de probabilidad posterior (PP) del soporte de rama. Los árboles generados se editaron utilizando Adobe Photoshop CS6.

El método de delimitación de especies Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre y cols. 2012; Ortiz y Francke, 2016) utiliza una partición recursiva con un rango de

divergencia intraespecífica previa y ancho de brecha relativa, estimando el umbral entre la variación genética intra e interespecífica, generando agrupaciones a nivel de especies (Ortiz y Francke, 2016). Los análisis ABGD se realizaron con matrices de distancia K2P no corregidas con opciones predeterminadas: $P_{min} = 0.001$, $P_{max} = 0.1$, Pasos = 10, Ancho de espacio relativo (X) = 1, Nb bins = 20.

El método de delimitación de especies GMYC aplica umbrales de tiempo únicos (Pons y cols., 2006) o múltiples (Monaghan y cols., 2009) para delimitar especies en un contexto de Máxima Probabilidad, utilizando árboles ultramétricos (Ortiz y Francke 2016). Los análisis filogenéticos se realizaron en BEAST 2.6.0 (Drummond y cols., 2012) utilizando Coalescent (constant population). Se aplicó un reloj relajado independiente (lognormal relaxed clock) a cada partición, los análisis se corrieron a 20×10^6 generaciones. La convergencia se evaluó con TRACER 1.6 (Rambaut y Drummond 2014). TREEANNOTATOR 2.6.0 (paquete BEAST) se usó para construir árboles de máxima credibilidad de clado, después de descartar el primer 25% de las generaciones por quemado. Tras la inferencia del árbol de genes, GMYC se implementó en la interfaz web para GMYC de umbral único y múltiple (<https://species.h-its.org/gmyc/>). El servidor de este servidor web ejecuta la implementación R original del modelo GMYC creado por Fujisawa y Barraclough (2013). Se usó un único umbral para CO1, ITS2 y la matriz concatenada.

El método de delimitación de especies PTP (Zhang y cols. 2016) es similar a GMYC, sin embargo, PTP utiliza arboles calibrados por sustitución (no ultramétricos), para evitar posibles fallas en la construcción de filogenias calibradas en el tiempo (Zhang y cols. 2013, Ortiz y Francke 2016). Para este análisis se empleó la variante bayesiana del modelo de Procesos de árbol de Poisson (Yao y cols. 2016) bPTP el cual utiliza un árbol filogenético de entrada, por ejemplo, de inferencia bayesiana (Zhang y cols. 2013) este se basa en sustitución de nucleótidos e implementa un modelo que supone longitudes de rama de árbol filogenético generadas por dos clases de procesos de Poisson (eventos de ramificación intra e interespecíficos). El método produce valores de soporte bayesiano (BS) para delimitar especies en el árbol de entrada (Yao y cols. 2016). Los análisis se realizaron utilizando la versión en línea (<https://species.h-its.org/>) con opciones predeterminadas: árbol enraizado, generaciones MCMC = 10 0000, Thinning= 100, Burn-in= 0.1, Seed= 123.

6.8 Estudios morfológicos y descripciones de especies

Las observaciones de los especímenes se realizaron en un microscopio estereoscópico marca Zeiss modelo Stemi 508. Los ejemplares fueron sumergidos en alcohol etílico al 80% para su observación. Se llevaron a cabo disecciones de pedipalpos de los machos y de receptáculos seminales de las hembras en alcohol etílico al 80%, digiriendo el tejido de los receptáculos seminales con hidróxido de potasio (KOH-10%) por 1 minuto para limpiar tejido blando y de esta manera observar estructuras internas como los receptáculos seminales. Se utilizó la clave de identificación para *Loxosceles* de Norte América de Gertsch y Ennik (1983) para la identificación a nivel de especie. En cuanto a la descripción de las especies nuevas se siguió a Valdez-Mondragón y cols. (2018b). Para la toma de fotografías para descripciones taxonómicas, se utilizó un microscopio estereoscópico marca Zeiss AXIO Zoom V16 que incluye una cámara Zeiss Axiocam 506 y un software llamado z-stack para el de apilado y procesamiento de imágenes, mismas que se guardaron en formato TIFF con un tamaño de 300 dpi, para la edición de las fotografías se utilizó el programa Photoshop CS6.

7. RESULTADOS

CAPÍTULO 1. TAXONOMÍA: ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

7.1 Variación intraespecífica de estructuras sexuales primarias en el género *Loxosceles*

Con base en los caracteres morfológicos sexuales de hembras (receptáculos seminales) y machos (pedipalpos) se lograron identificar nueve especies: *L. aff. colima*, *L. jaca*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango*, *L. tenochtitlan*, *L. sp. 1* y *L. zapoteca*, las cuales se describen a continuación.

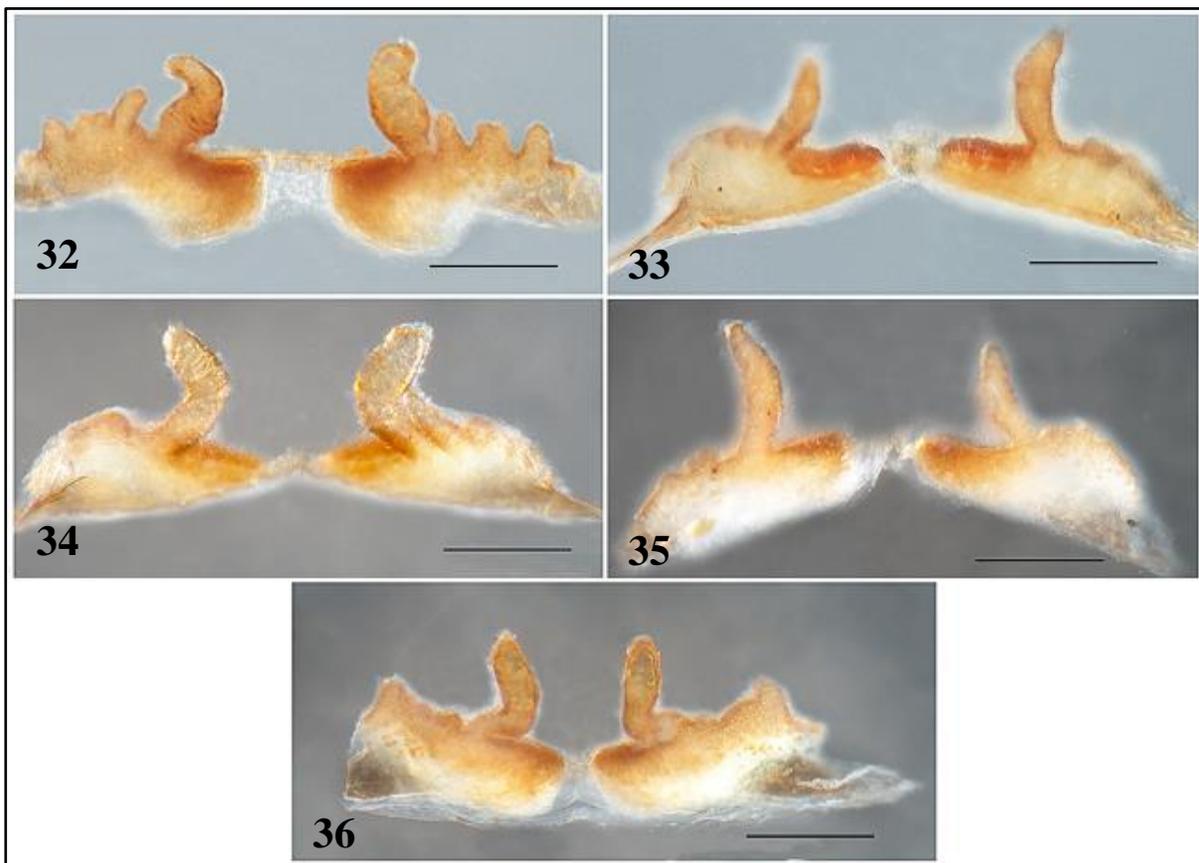
Debido a la amplia variación intraespecífica presente en las hembras, nos basamos principalmente en las estructuras sexuales de los machos (Figuras 37-44, 64-69, 74-79, 84-87, 94-97, 102-104, 110-115, 120-123), debido a que la forma de estas estructuras es más conservada y presentan poca variación intraespecífica, incluso perteneciendo a localidades diferentes. A pesar de esto, se muestra la variación que hubo en los receptáculos seminales de las hembras para las especies estudiadas (Figuras 32-36, 45-59, 60-63, 70-73, 80-83, 88-93, 98-101, 105-109, 116-119), para reforzar lo expresado anteriormente con respecto a estas estructuras.

7.1.1 *Loxosceles malintzi* Valdez-Mondragón, Cortez-Roldán, Juárez-Sánchez y Solís-Catalán, 2018.

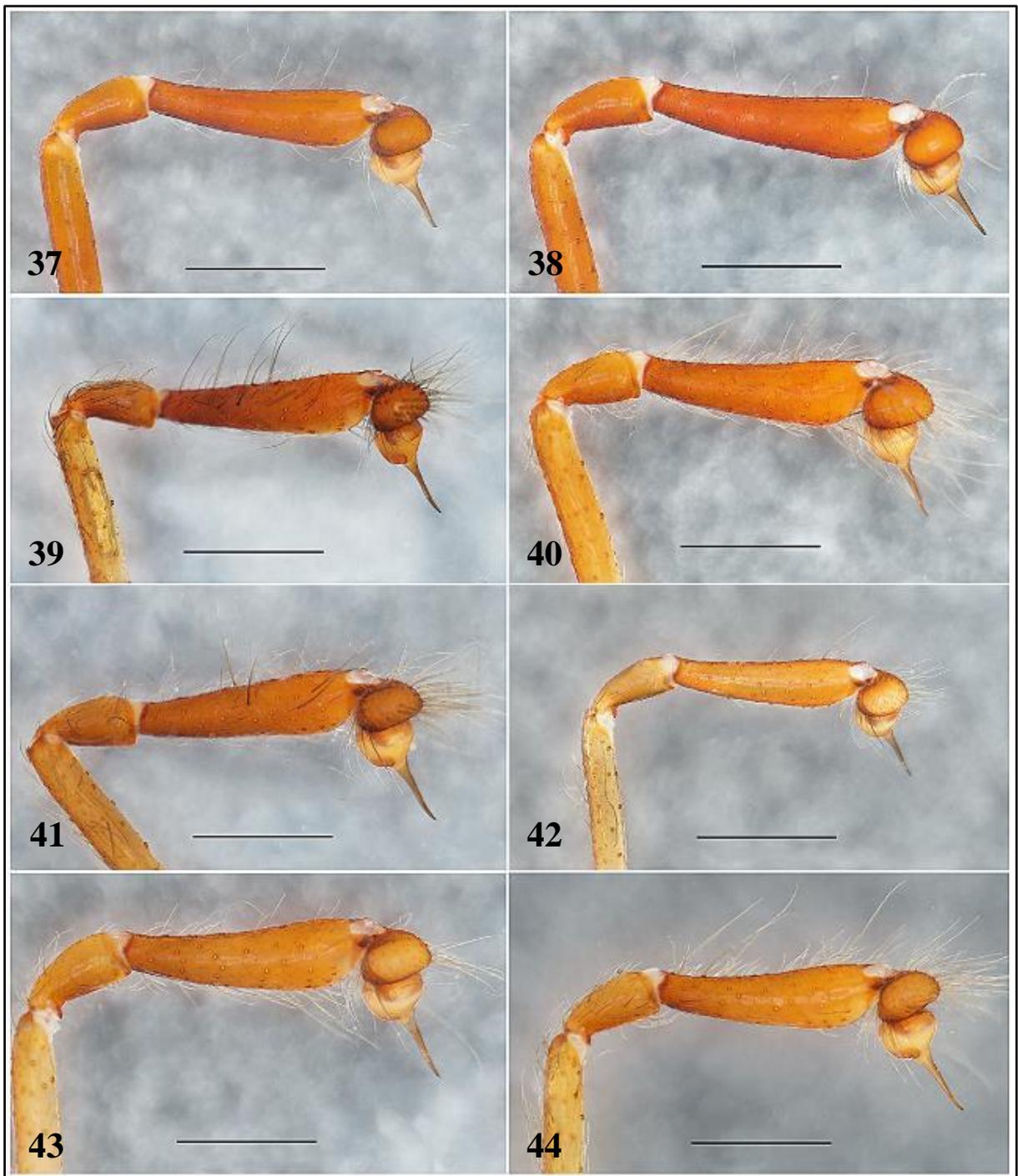
La variación en los receptáculos seminales de las hembras es notoria para una misma especie, en este caso *L. malintzi* (Figuras 32-36), incluso dentro de una misma población (Figuras 32-35), con algunos ejemplares presentando receptáculos seminales asimétricos (Figuras 32-35), algunos más curvos (Figuras 32, 34), otros presentan bordes con lóbulos dentados (Figuras 32, 34), y otros son lisos, sin ningún lóbulo presente (Figura 35). Asimismo, para *L. malintzi* Valdez-Mondragón y cols. (2018b) mencionan que la base de los receptáculos seminales de esta especie presenta algunas diferencias, en algunos especímenes es más ancha y esclerosada y en otros es más delgada (Figuras 33, 35). Esta variación en receptáculos seminales la encontramos en la mayoría de las especies de *Loxosceles* que se han observado hasta el

momento, lo cual complica la identificación de las hembras solamente con taxonomía tradicional.

La variación que existe en los pedipalpos de los machos es menor, presentan tibias largas y delgadas, cuatro veces más largas que anchas, al igual que émbolos largos y en forma de aguja (Figuras 37-44), son muy similares intraespecíficamente aun perteneciendo a localidades diferentes, lo cual nos habla de la poca variación y de su utilidad taxonómica (Valdez-Mondragón y cols. 2018b).



Figuras 32-36. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. malintzi*, vista dorsal, de dos localidades. 32-35) San Pablo Anicano, Puebla. 36) Taxco de Alarcón, Guerrero. Tomada de Valdez-Mondragón y cols. (2018b). Escala 0.2 mm.

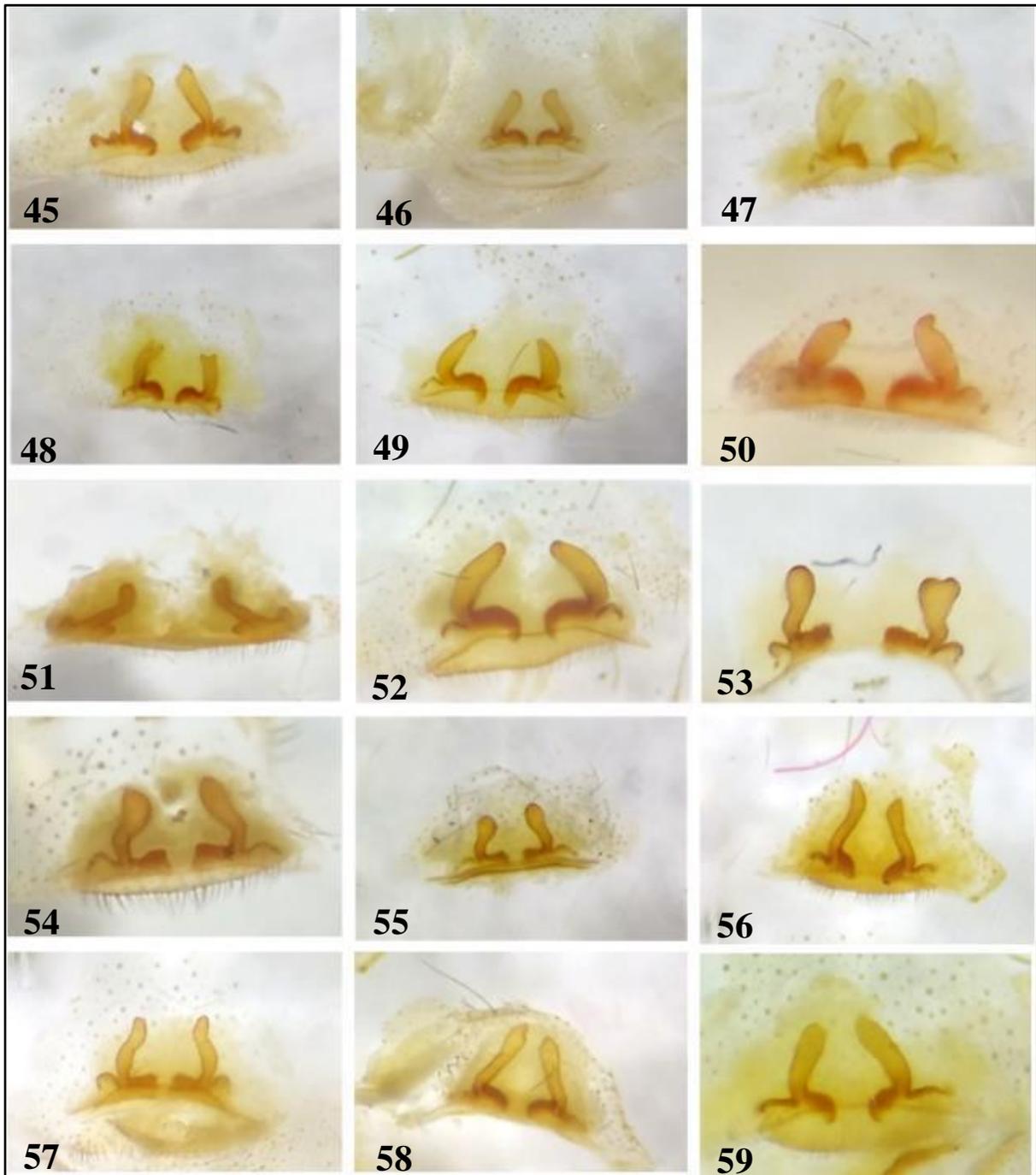


Figuras 37-44. Variación intraespecífica reducida de los pedipalpos de los machos de *L. malintzi*, palpo izquierdo, vista prolateral, de seis localidades. 37-38) San Pablo Anicano, Puebla. 39) Izúcar de Matamoros, Puebla. 40-41) Tepalcingo, Morelos. 42) Taxco de Alarcón, Guerrero. 43) Tlaltizapán, Morelos. 44) Tepecuacuilco de Trujano, Guerrero. Tomada de Valdez-Mondragón y cols. (2018b). Escala 0.5 mm.

7.1.2 *Loxosceles* aff. *colima*

Estos ejemplares hembra presentan una amplia variación en la forma de los receptáculos seminales, incluso dentro de una misma localidad (Figuras 46-49, 53-58). Algunas presentan receptáculos más largos (Figuras 55-58), con terminación bifurcada (Figuras 56, 57) y otros son más curvos (Figuras 57, 59). Sin embargo, a pesar de esta variación, la distancia en la base de los receptáculos seminales se mantiene, lo que tal vez nos estaría indicando que se trata de un carácter informativo, a excepción de un espécimen de Nayarit *L.* morfo “Nayarit 2” (Figura 51), en el cual la distancia de la base es más amplia. Este espécimen se identificó como *Loxosceles* aff. *colima*, por su distribución geográficamente cercana a Colima, sin embargo, no presenta ningún parecido con los receptáculos seminales de esta especie, por lo cual se optó por nombrarlos como *L.* morfo “Nayarit 2” hasta que no se recolecte más material de esas localidades para análisis moleculares y corroborar.

Para las poblaciones de *L.* morfo “Nayarit 1” de Colorado de la Mora, Nayarit; *L.* morfo “Nayarit 2” de Reacomodo Los Sabinos, Nayarit; *L.* morfo “Vallarta” de Puerto Vallarta, Jalisco y *Loxosceles* aff. “colima 2” de Comala, Colima, no se tienen machos, por lo cual no podemos confirmar las especies ya que como se mencionó anteriormente, el pedipalpo del macho es un carácter conservado y robusto para la separación de las especies.



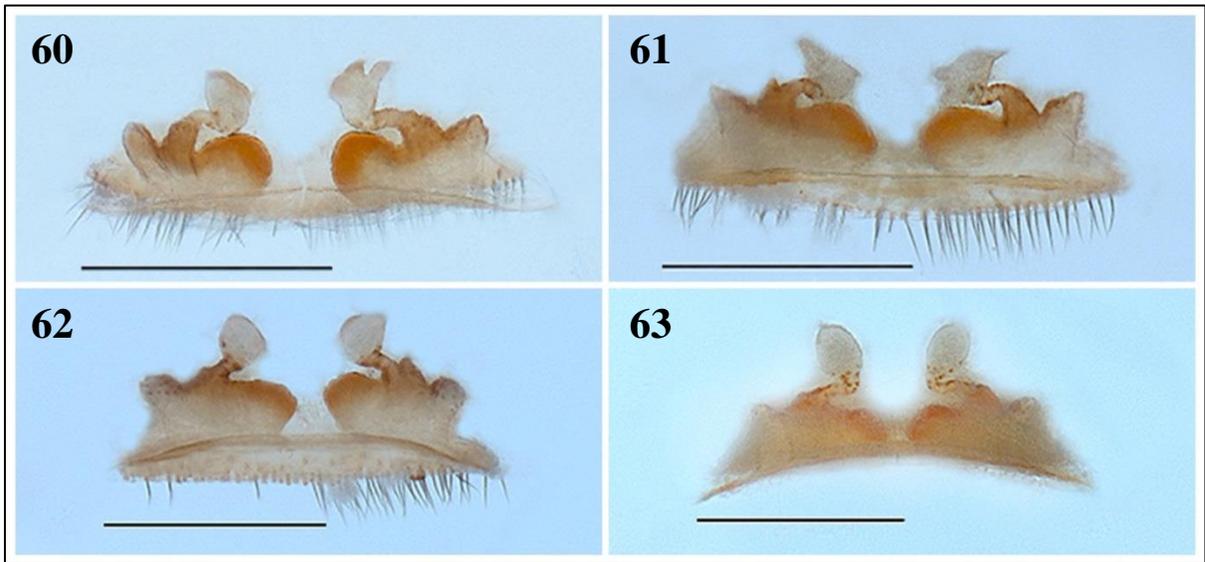
Figuras 45-59. Variación morfológica de los receptáculos seminales en hembras de *Loxosceles* aff. *colima* de distintos estados del país de la región Centro-Occidente. 45) *Loxosceles* morfo “Nayarit 1”, Colorado de La Mora, Nayarit; 46, 47, 48 y 49) *Loxosceles* m. “quechu”, Quechultenango, Guerrero; 50) *Loxosceles* morfo “Vallarta”, Puerto Vallarta, Jalisco; 51) *Loxosceles* morfo “Nayarit 2”, Reacomodo Los Sabinos, Nayarit; 52) *Loxosceles* morfo “Fogos”, Microondas Fogos, Guerrero; 53, 54, 55, 56, 57, 58) *Loxosceles* aff. *colima* 1, Coquimatlán, Colima; y 59) *Loxosceles* aff. *colima* 2, Comala, Colima.

7.1.3 *Loxosceles misteca* Gertsch, 1958

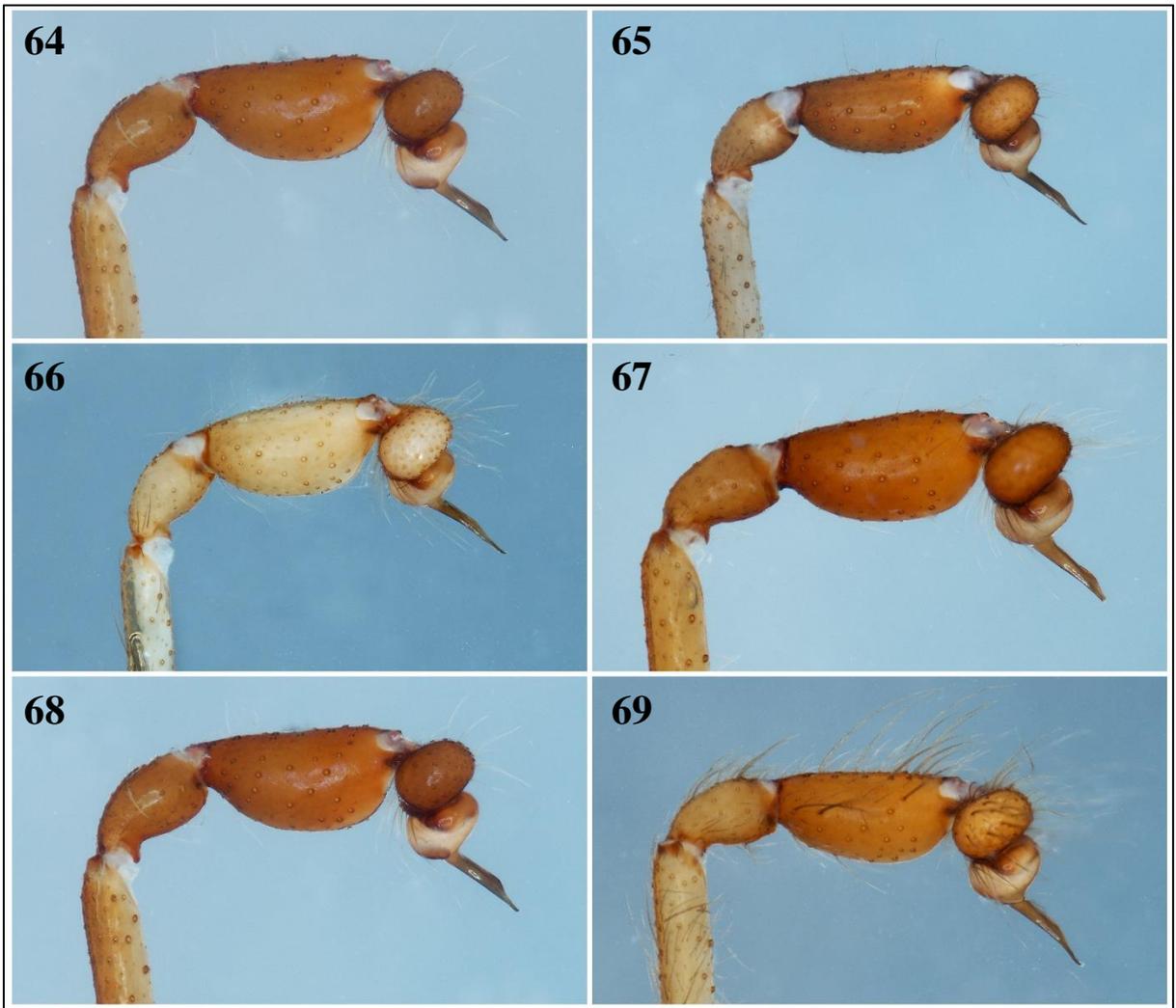
Los receptáculos seminales de las hembras de *L. misteca* (Figuras 60-63) presentan un lóbulo curvo grueso que surge cerca del medio y se curva hacia el lado interno (Gertsch y Ennik 1983). La base de los receptáculos en algunas es ancha y esclerosada en la parte interna (Figuras 60-62) y en otras es más delgada y menos esclerosada (Figura 63), además presentan una protuberancia en la parte externa de la base, que varía en su terminación; redondeado (Figura 60, 62), en punta (Figura 61) e incluso menos notorio en otras (Figura 63). La variación existente entre los receptáculos seminales de esta especie es notoria y se vuelve más evidente cuando analizamos a detalle cada uno de los receptáculos seminales.

La variación en los pedipalpos de los machos es más conservada, presentan una tibia dos veces más larga que ancha (Gertsch y Ennik 1983), con una curvatura ventral ligeramente marcada, el émbolo es más largo que ancho y tiene forma espatulada con una terminación delgada en la punta (Figuras 64-69). La variación dentro de la especie es casi nula, ya que la similitud de la tibia, bulbo y émbolo es conservada. La presencia de machos en las muestras estudiadas nos permitió asignar a las hembras de dichas poblaciones a esta especie, ya que como se mencionó en el párrafo arriba, la variación en los receptáculos seminales es muy amplia.

Esta especie se asemeja morfológicamente con *L. tenochtitlan*, sin embargo, el pedipalpo de la nueva especie presenta una curvatura menos marcada en la tibia, el émbolo es ligeramente más ancho que el de *L. misteca*. Además, los receptáculos seminales en *L. tenochtitlan* presentan una distancia mayor en la base que en *L. misteca* (Valdez-Mondragón y cols. 2019).



Figuras 60-63. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. misteca*, vista dorsal, de dos localidades: 60, 61) Cueva Agustín Lorenzo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón, Guerrero. 62, 63) Cueva del Jardín Botánico, Parque Nacional Grutas de Cacahuamilpa, Pilcaya, Guerrero. Escala 0.5 mm.

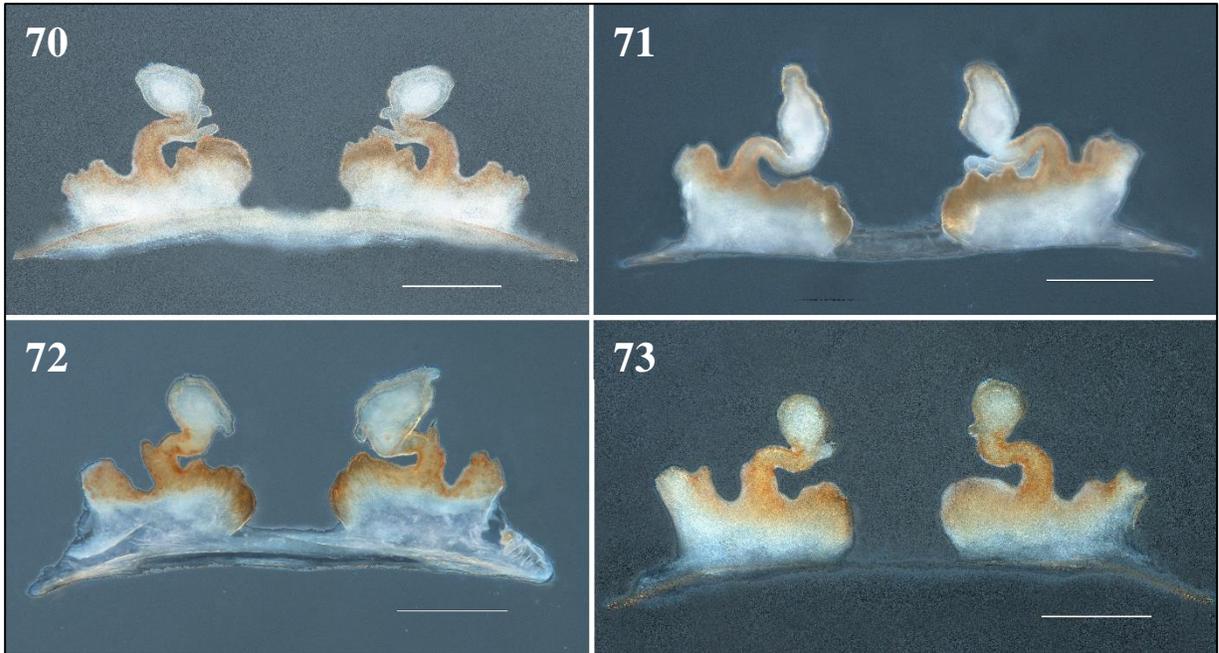


Figuras 64–69. Variación intraespecífica reducida de los pedipalpos de los machos de *L. misteca*, palpos izquierdos, vista prolateral, de cinco localidades: 64) Jardín Botánico, Parque Nacional Grutas de Cacahuamilpa, Pilcaya, Guerrero. 65) Grutas General Carlos Pacheco, Cacahuamilpa, Pilcaya. Guerrero. 66) Cueva del diablo, Acuitlapán, Taxco, Guerrero. 67) Cuernavaca, Morelos. 68) Tlaltenango, Cuernavaca, Morelos. 69) Lomas de Cortes, Cuernavaca, Morelos. Fotos 64-66 por Alma R. Juárez Sánchez (2019).

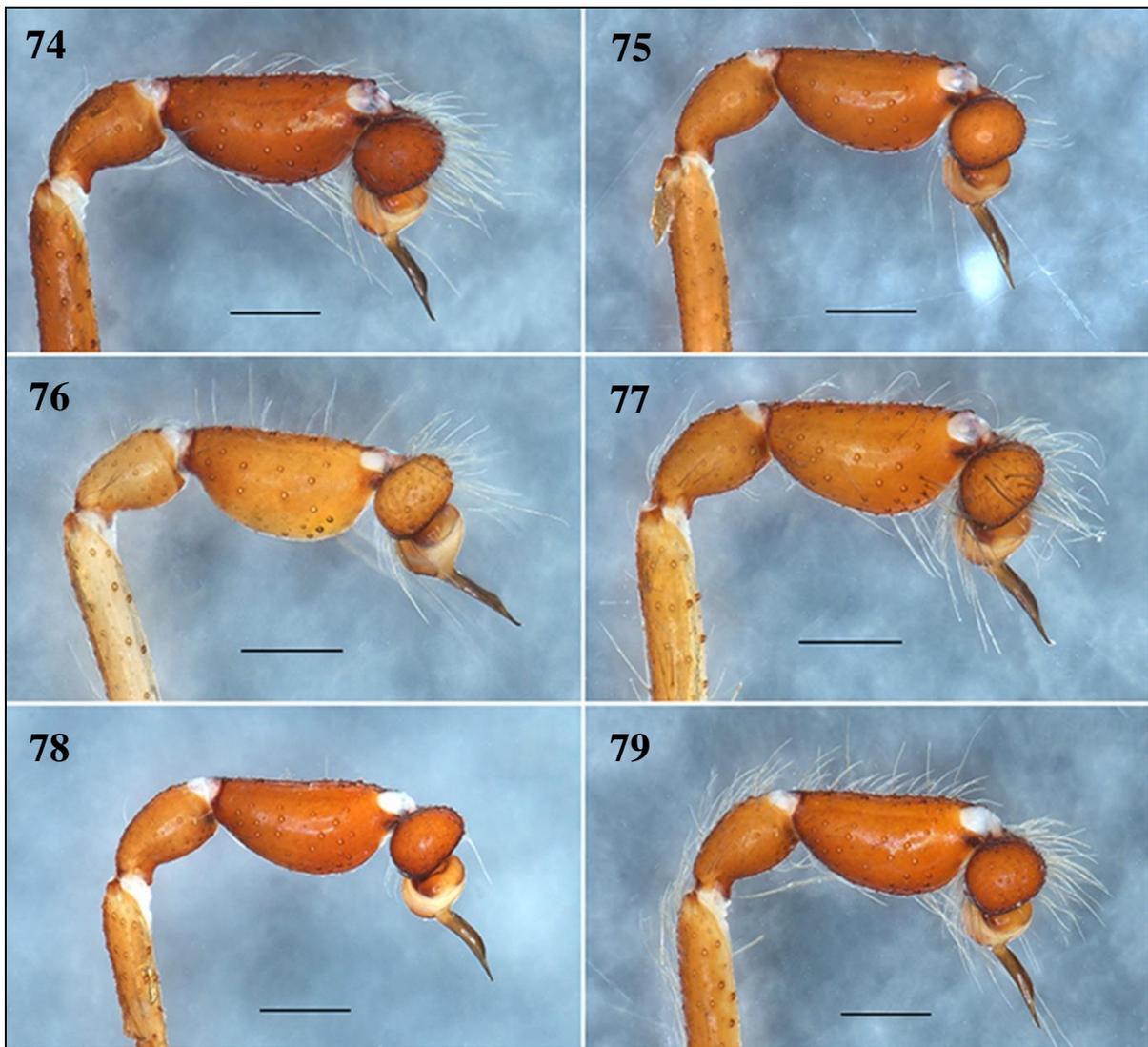
7.1.4 *Loxosceles tenochtitlan* Valdez-Mondragón y Navarro-Rodríguez, 2019

Los receptáculos seminales de las hembras de *L. tenochtitlan* (Figuras 70-73) presentan lóbulos delgados, curvos en forma de “s”, la terminación del lóbulo es más ancha de forma circular en algunos (Figuras 70, 73), y en forma de “gota” en otros ejemplares (Figuras 71, 72). La cara interna de la base es ancha y esclerosada. En la cara externa, en la parte terminal presenta una terminación elevada. Cabe resaltar que los receptáculos seminales de esta especie presentan similitud con *L. misteca* principalmente en la terminación de los lóbulos (circulares y en forma de “gota”), también en la cara interna esclerosada de estos y de igual manera presentan una protuberancia en la parte externa de la base. Sin embargo, la distancia en la base de los receptáculos seminales presenta diferencias, es mayor en *L. tenochtitlan* que en *L. misteca*, lo cual como se mencionó arriba podría ser un carácter informativo para algunos casos en las hembras. La asignación específica correcta de estos ejemplares fue posible debido a la presencia de machos en las localidades muestreadas.

La variación intraespecífica en los pedipalpos de los machos es conservada (Figuras 74-79), presentan una tibia casi dos veces más larga que ancha, con una curvatura ventral marcada, el émbolo se asemeja al de *L. misteca* con una forma espatulada, sin embargo, en *L. tenochtitlan* es más delgado y curvo (Valdez-Mondragón y cols. 2019).



Figuras 70-73. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. tenochtitlan* vista dorsal, de cuatro localidades: 70) Cruz Verde #132, Tlalpan, Ciudad de México. 71) Calle Tepocatl #6, Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán, Ciudad de México. 72) Turiello Guerra, calle Cuitláhuac S/N, Tlalpan, Ciudad de México. 73) Juárez #23, San Mateo Ixtacalco, municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Fotos por Mayra R. Cortez Roldan (2019). Escala 0.5 mm.

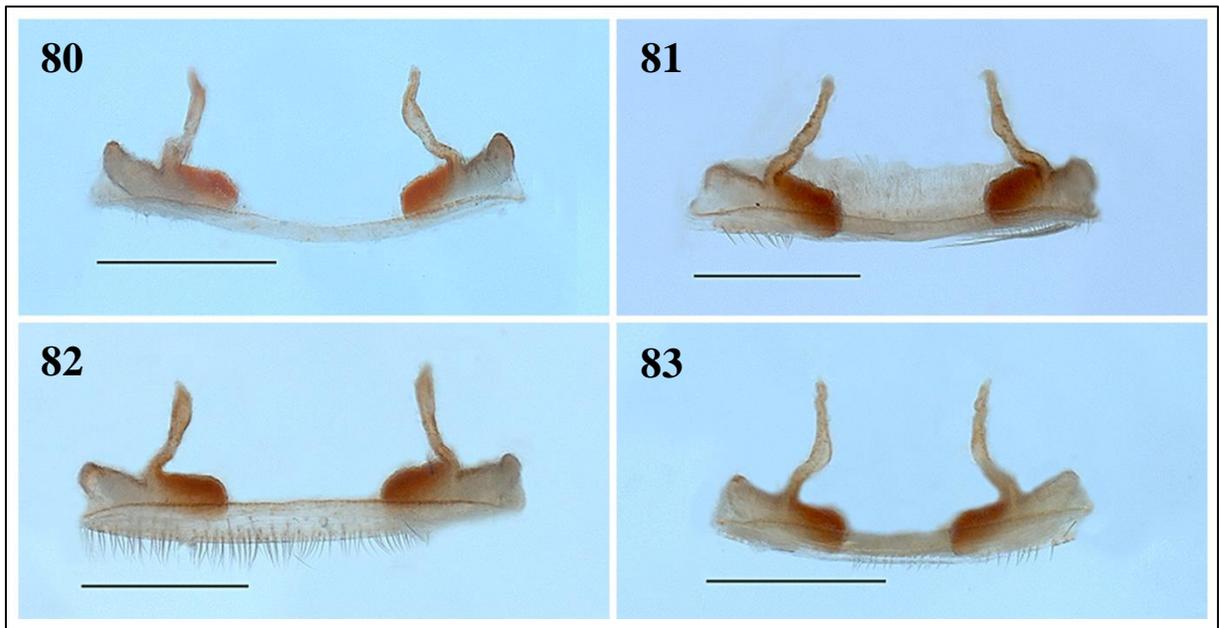


Figuras 74–79. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. tenochtitlan* palpos izquierdos, vista prolateral, de cinco localidades: 74) Turiello Guerra, Calle Cuitlahuac S/N, Tlalpan, Ciudad de México. 75) Cruz Verde #132, Tlalpan, Ciudad de México. 76) Calle Tepocatl #61, Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán, Ciudad de México. 77) Los Reyes Copilco, Frac. Areada Dpto. 102-A, Coyoacán, Ciudad de México. 78, 79) Calle Reforma #5, Santiago Tlacoachcalco, Municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Fotos por Mayra R. Cortez Roldan (2019). Escala 0.5 mm.

7.1.5 *Loxosceles zapoteca* Gertsch, 1958

Receptáculos seminales transversales, estrechos, separados aproximadamente por su anchura basal, cada uno con un lóbulo tubular delgado inclinado hacia el lado interno (Gertsch y Ennik 1983). En el caso de esta especie los receptáculos pertenecen a hembras de dos localidades, y se puede observar que, aunque se conserva una forma general, en algunos casos los lóbulos delgados son más inclinados hacia la parte interna (Figura 80) y otros son más largos (Figuras 81, 83).

En cuanto a la variación en los pedipalpos de los machos (Figuras 84-87), estos presentan una tibia dos veces más larga que ancha, el émbolo curvado, delgado y ligeramente más largo que el ancho del bulbo (Gertsch y Ennik 1983). De igual manera que en la mayoría de las especies revisadas, los pedipalpos de *L. zapoteca* presentan una forma conservada intra-específicamente.



Figuras 80-83. Variación intraespecífica de los receptáculos seminales de las hembras de *L. zapoteca*, vista dorsal, de dos localidades de Guerrero: 80-82) Cueva Agustín Lorenzo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón. 83) Camino hacia Mexcaltepec el Viejo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón. Escala 0.5 mm.

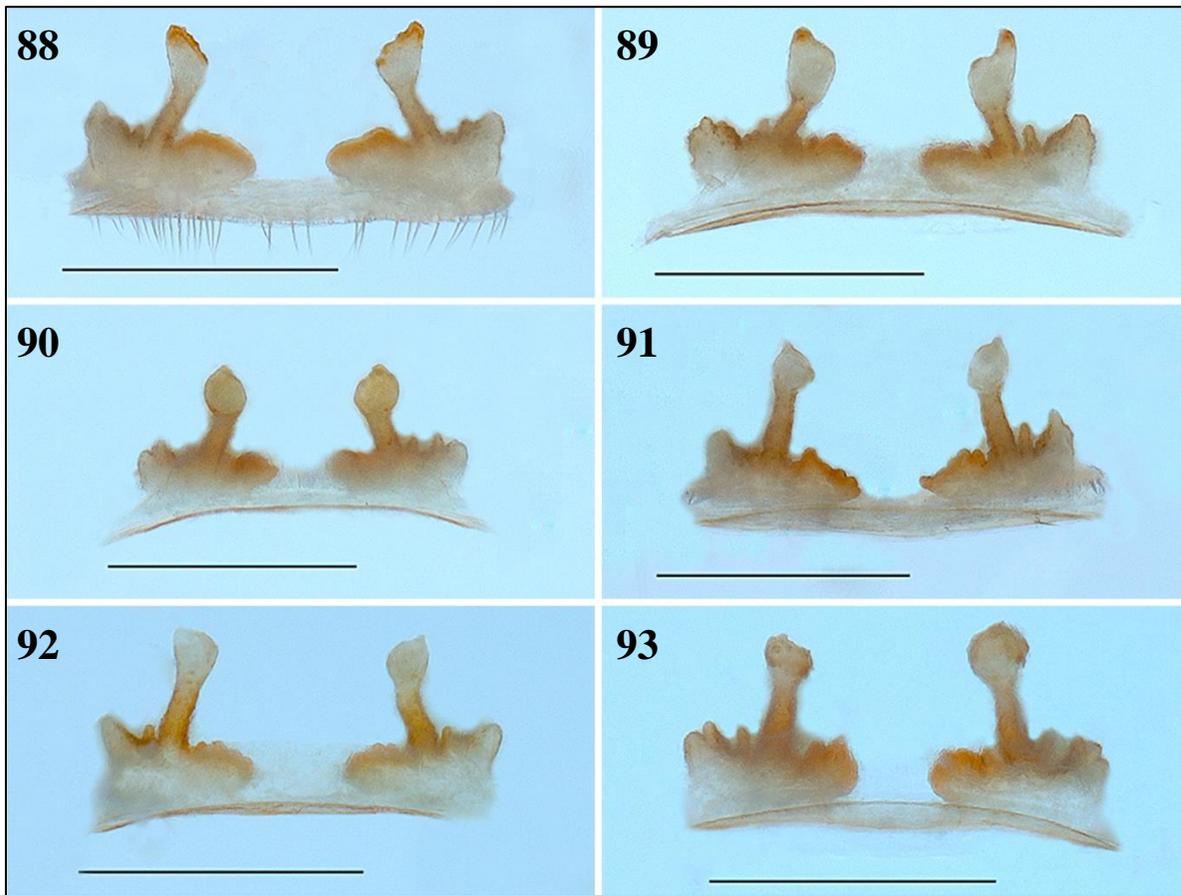


Figuras 84–87. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. zapoteca*, palpos izquierdos, vista prolateral, de dos localidades de Guerrero: 84-86) Cueva Agustín Lorenzo, Mexcaltepec, Taxco de Alarcón. 87) Jardín Botánico en Parque Nacional Grutas de Cacahuamilpa, Pilcaya. Escala 0.5 mm.

7.1.6 *Loxosceles nahuana* Gertsch, 1958

Receptáculos seminales con lóbulos prominentes que surgen del medio (Gertsch y Ennik 1983), bases cortas pero robustas, con la presencia o ausencia de pequeños lóbulos secundarios. Los lóbulos principales son amplios y con una terminación ancha en la punta. La base interna de los receptáculos es más esclerosada y delgada (Figuras 88-93). Las tres localidades muestreadas están relativamente cerca entre ellas y la aparente naturaleza conservadora de la morfología en las hembras estudiadas podría no ser real.

Los pedipalpos de los machos (Figuras 94-97) presentan la tibia es dos veces más larga que ancha, el émbolo es recto con la base que sale del bulbo más ancha, con una terminación curvada en la punta. Para esta especie a pesar de ser de localidades diferentes la forma de los pedipalpos, tiene un patrón conservado.



Figuras 88-93. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. nahuana*, vista dorsal, de tres localidades: 88, 89) 2.9 km al S de Tasquillo, Zimapán. 90, 91) 1 km al E de Zimapán, Hidalgo 92, 93) Comunidad Cruz Pinta, 2 km al SE de Zimapán, Hidalgo. Escala 0.5 mm.



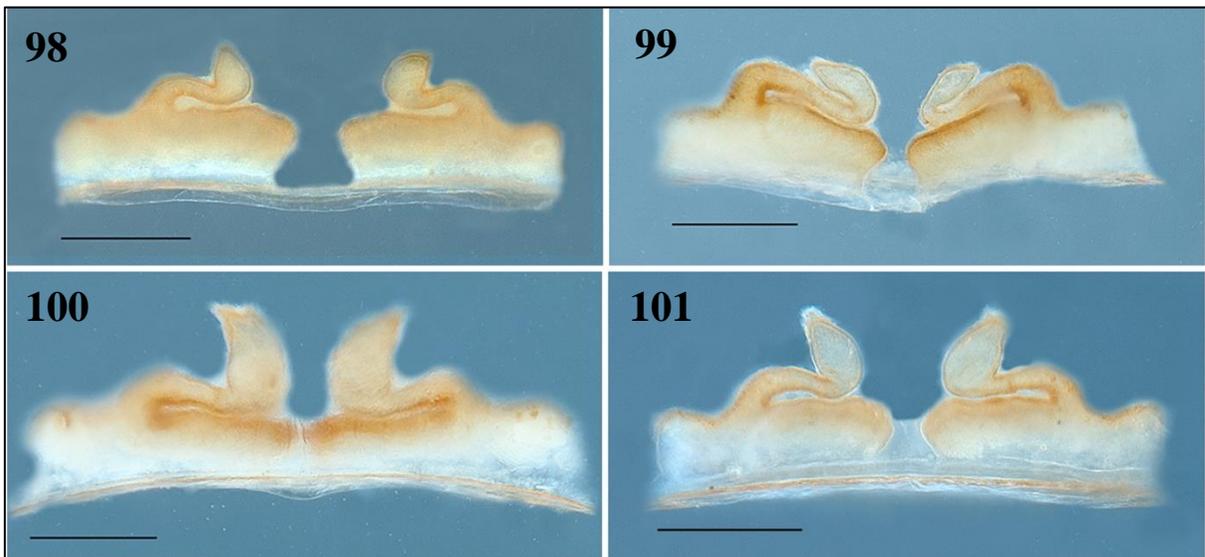
Figuras 94–97. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. nahuana*, palpos izquierdos, vista prolateral, de tres localidades: 94, 95) 1 km al E de Zimapán, Hidalgo. 96) Comunidad Cruz Pinta, 2 km al SE de Zimapán, Hidalgo. 97) 8 km al S de Zimapán, Hidalgo. Escala 0.5 mm.

7.1.7 *Loxosceles jaca* Gertsch y Ennik, 1983

Receptáculos seminales de las hembras subovales, grandes, cada uno con un lóbulo delgado en forma de “s” acostada, con o sin agrandamiento apical (Gertsch y Ennik 1983). Terminación de los lóbulos más anchas en unas (Figuras 100, 101), lóbulos pegados a la base del receptáculo en otras (Figura 99), lóbulos cortos (Figura 100), lóbulos largos (Figuras 99, 101), base del receptáculo más angosta (Figuras 100, 101), parte interna de los receptáculos más esclerosada (Figuras 99, 100).

Pedipalpos masculinos (Figuras 102-104) con segmentos cortos y émbolo más grueso en la base (Gertsch y Ennik 1983), tibia 1.3 veces más larga que ancha, embolo con terminación curvada en la punta. Intra-específicamente esta especie, al igual que las anteriores, presenta caracteres muy conservados.

Esta especie podría llegar a confundirse con *L. nahuana* por la forma de la tibia corta y ancha. Sin embargo, la manera de diferenciarlas es checando el embolo, ya que en *L. nahuana* es más delgado y recto, mientras que en *L. jaca* es más ancho en la base.



Figuras 98-101. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. jaca*, vista dorsal, de una localidad 98-101) 2.5 Km al N de Jacala de Ledezma, Hidalgo. Escala 0.2 mm.

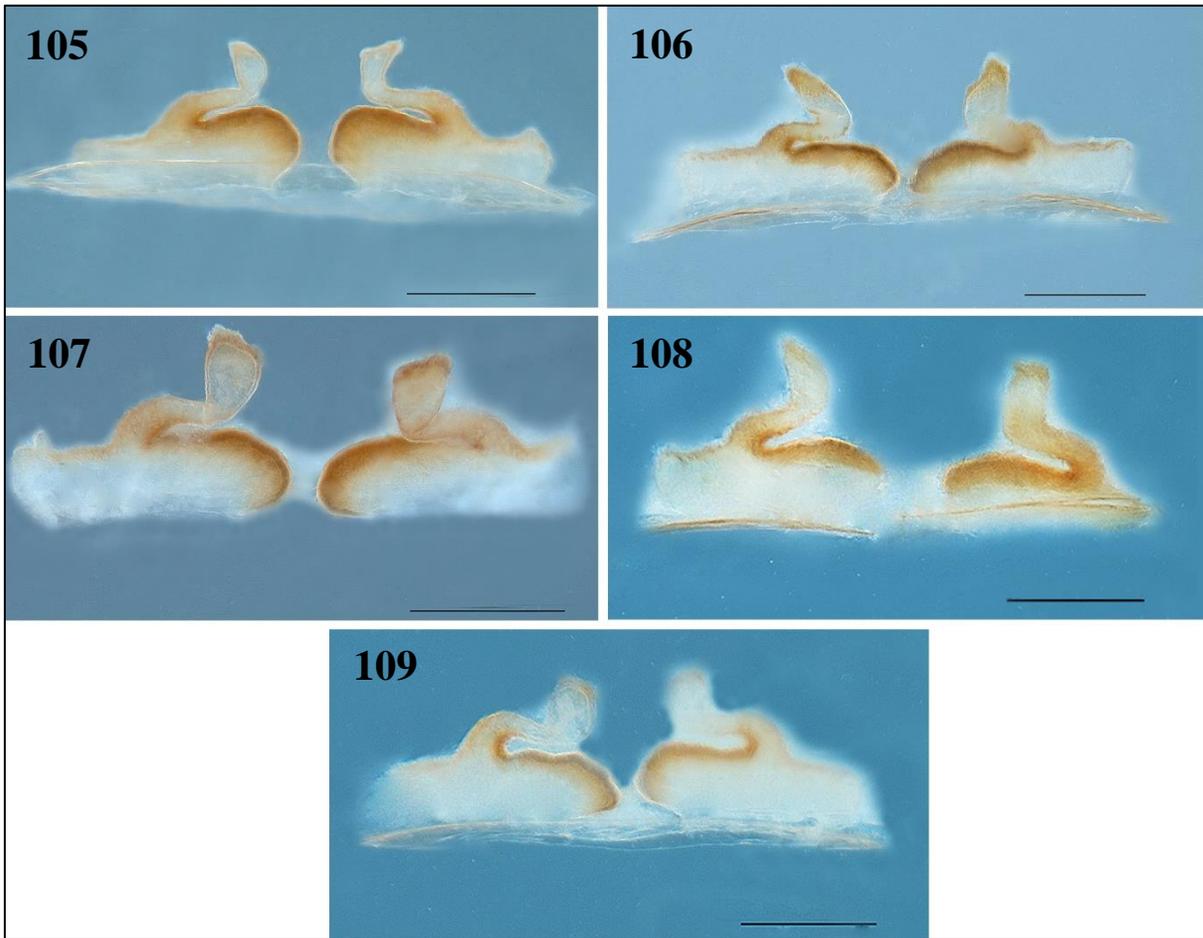


Figuras 102–104. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. jaca*, palpos izquierdos, vista prolateral, de una localidad 102-104) 2.5 Km al N de Jacala de Ledezma, Hidalgo. Escala 0.5 mm.

7.1.8 *Loxosceles* sp. 1.

Receptáculos seminales de las hembras en forma de “s” (Fig. 105-109) Lóbulos curvados, más anchos apicalmente. Los receptáculos seminales de esta especie son muy similares a los de *L. jaca*, una de las diferencias es en la base interna de los receptáculos seminales es más redondeada y esclerosada en *L. sp. 1* (Figs. 105-107).

Los pedipalpos presentan una tibia 1.5 veces más larga que ancha. Tarso ovalado, émbolo corto, grueso en la base y estrecho en la punta (Figs. 110-115). En el caso de pedipalpos de machos (Figuras 110-115), estos también presentan similitud con los de *L. jaca*, sin embargo, existen diferencias, en *L. jaca* (Figura 102-104) la tibia es más corta, 1.3 veces más larga que ancha (Figura 105-108), el émbolo también presenta diferencias en cuanto al largo y ancho, es 1.2 veces más largo que ancho en *L. sp. 1*, mientras que en *L. jaca* es 1 vez más largo que ancho (Figuras 110-115).



Figuras 105-109. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L.* sp. 1 vista dorsal de una localidad 105-109) Grutas de Tolantongo, Municipio de Cardonal, Hidalgo. Escala 0.2 mm.

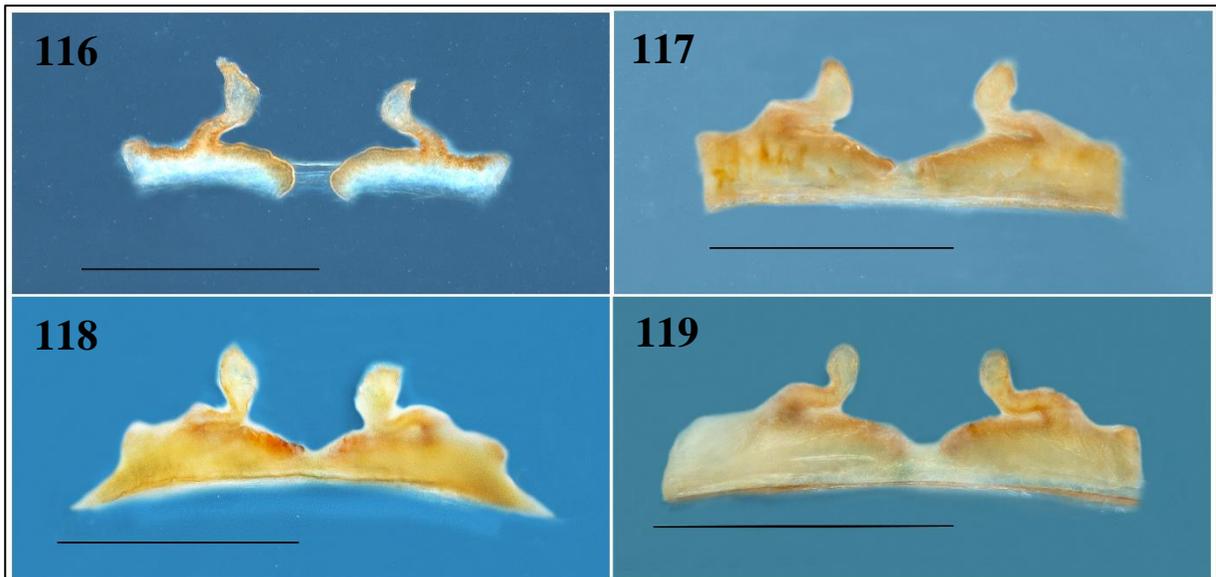


Figuras 110–115. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. sp.* 1 palpos izquierdos, vista prolateral, de dos localidades 110-112, 115 Grutas de Tolantongo, Cardonal, Hidalgo. 113, 114 500 m al Oeste de la entrada No.5 de Grutas de Tolantongo, Cardonal, Hidalgo. Escala 0.5 mm.

7.1.9 *Loxosceles tenango* Gertsch, 1973

Receptáculos seminales de las hembras (Figuras 116-119) con lóbulos cortos, inclinados hacia la cara interna de la base; en algunos las bases de un lado y otro están tocándose o muy próximas entre sí (Figuras 117-119) y la separación en otros si es marcada (Figura 116).

Los pedipalpos de machos (Figuras 120-123), presentan una tibia aproximadamente dos veces más larga que ancha, gruesa (Gertsch y Ennik 1983) embolo casi recto y esbelto, más ancho en la base y con terminación en punta, tan largo como el ancho del bulbo (Gertsch y Ennik 1983).



Figuras 116-119. Variación intraespecífica marcada de los receptáculos seminales de las hembras de *L. tenango*, vista dorsal de dos localidades 116, 117) Grutas El Carrizal de Tenango, Chapulhuacán, Hidalgo. 118, 119) Cueva del Caracol, 1.5 km al SE de la comunidad El Caracol, Písaflres, Hidalgo. Escala 0.5 mm.



Figuras 120–123. Variación intraespecífica de los pedipalpos en machos de *L. tenango*, palpos izquierdos, vista prolateral, de dos localidades 120-122. Cueva del Caracol, 1.5 km al SE de la comunidad El Caracol, Pisaflores, Hidalgo. 123. Grutas El Carrizal de Tenango, Chapulhuacán, Hidalgo. Escala 0.5 mm.

Toda la variación referida anteriormente en machos y hembras se describió también en los trabajos de Brignoli, (1969) y de Gertsch y Ennik (1983). Brignoli (1969) analizo caracteres somáticos y sexuales de *L. rufescens* y encontró que existe de poca a considerable variación intraespecífica dependiendo del sexo y carácter estudiado, por lo cual concluyo que debido a la variación presente en el género *Loxosceles* la determinación a nivel específico es un tanto difícil.

Gertsch (1958), reconoció esta variabilidad morfológica dentro del género e insistió en que incluso los caracteres de los genitales debían ser utilizados con precaución. Sin embargo, Gertsch y Ennik (1983), mencionaron que la variabilidad morfológica dentro de *L. rufescens* es moderada y se puede considerar dentro de los rangos de variabilidad normal intraespecífica, tanto para pedipalpos como para receptáculos seminales. No obstante, Gertsch y Ennik (1983), también mencionaron que esta variabilidad es más amplia en las especies americanas, por lo cual recomiendan tener cuidado a la hora de reconocer a las especies.

Los mismos autores mencionan que la morfología de algunos de los receptáculos seminales que se salen del rango de variación normal podría deberse a que pertenecen a ejemplares subadultos (Gertsch y Ennik, 1983). También se ha propuesto que pudiera tratarse de hembras que no han copulado (hembras vírgenes); sin embargo, estudios adicionales son necesarios para poner a prueba esta hipótesis (Valdez-Mondragón *com. pers.*).

CAPÍTULO 2. ESTUDIOS MOLECULARES

7.2 Taxonomía integradora: análisis de delimitación de especies y evidencia morfológica

7.2.1. Secuencias de ADN

En total se obtuvieron 39 secuencias de buena calidad para CO1 que pertenecen a nueve especies y 42 para ITS2 pertenecientes a nueve especies de *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México. Para el caso de las secuencias de ITS2, algunas estaban contaminadas y otras no reflejaban ninguna similitud con ninguna secuencia encontrada en GenBank, lo cual podría deberse a la región del gen que se utilizó para esas especies, ya que es su mayoría las especies encontradas en GenBank son especies europeas.

Se consultó la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para obtener las secuencias de especies mexicanas del género *Loxosceles*, donde se tienen registradas siete secuencias de cuatro especies para CO1. Se realizó un alineamiento entre las secuencias de GenBank y las secuencias obtenidas en este trabajo del gen CO1, como resultado se obtuvo que la región del gen utilizado para las secuencias de GenBank no corresponde con la región del gen utilizado en este trabajo, por lo tanto, no se incluyeron estas secuencias en los análisis.

7.2.2 Análisis de distancias (*p*) genéticas

Los análisis de distancias (*p*) genéticas para CO1 mostraron nueve agrupamientos con soportes robustos del 100% de Bootstrap correspondientes a las siguientes especies: *L. colima*, *L. jaca*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango*, *L. tenochtitlan*, *L. sp. 1* y *L. zapoteca* (Figura 124), mientras que para ITS2 se recuperan igualmente nueve clados (Figura 125), correspondientes a las mismas especies que CO1, de los cuales *L. colima*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango*, *L. tenochtitlan* y *L. zapoteca* presentan un soporte de Bootstrap arriba del 80%, sin embargo, las especies *L. jaca* y *L. sp. 1* presentaron un soporte de Bootstrap bajo; 50% y 74% (valor menos significativo) respectivamente con este marcador.

Loxosceles colima se agrupa con *L. zapoteca* con un valor de bootstrap bajo para CO1 del 39% y más alto del 80% para ITS2, con medias de distancias (*p*) genéticas del 16.4% entre estas especies con CO1 y del 8.8% con ITS2 (Figura 124, 125).

Loxosceles misteca de Guerrero se agrupa con *L. tenochtitlan*, de Tlaxcala y Ciudad de México, con soportes altos de bootstrap para CO1 98% y con el 73% para ITS2 (Figuras 124, 125). Para el caso de estas especies la morfología es muy similar, sin encontrar diferencias marcadas en la forma de los pedipalpos, sin embargo, a través de análisis moleculares como en este caso se logró determinar que se trata de especies diferentes encontrado una media de distancia (*p*) genética del 13.8% para CO1 y del 4% para ITS2 (Figuras 124, 125).

Loxosceles nahuana es otro clado bien soportado con un valor de Bootstrap *d*, el 100% para CO1 y para ITS2 del 82% de bootstrap (Figuras 124, 125), corroborado además por la morfología tan diferente de las otras especies en estructuras sexuales: pedipalpos (Figuras 94-97) y receptáculos seminales (Figuras 88-93), en particular comparándola con las especies de Hidalgo (*L. tenango*, *L. jaca* y *L. sp. 1.*) presenta distancias (*p*) genéticas del 12.6% con *L. tenango*, del 16.3% con *L. jaca* y del 13.6% con *L. sp. 1* (Apéndice 1).

Loxosceles malintzi con un soporte de Bootstrap del 100% para CO1 y 99% ITS2, se agrupa con tres especies de Hidalgo; *L. sp. 1* *L. tenango*, *L. jaca*, con distancias (*p*) genéticas para CO1 del 15.5%, 15.6% y 15.2% respectivamente.

Loxosceles tenango se agrupa con *L. jaca* y estas dos especies a su vez con *L. sp. 1*. Los soportes de bootstrap para cada uno de estos clados son del 100% con el gen CO1; los cuales son corroborados además por las distancias (*p*) genéticas; entre *L. tenango* y *L. jaca* del 7.3% (Apéndice 1), entre *L. tenango* y *L. sp. 1* del 9.6% y entre *L. jaca* y *L. sp. 1* 10.5% con el gen CO1. Las últimas dos especies presentan una morfología muy similar, lo cual complico su diferenciación solo con evidencia morfológica.

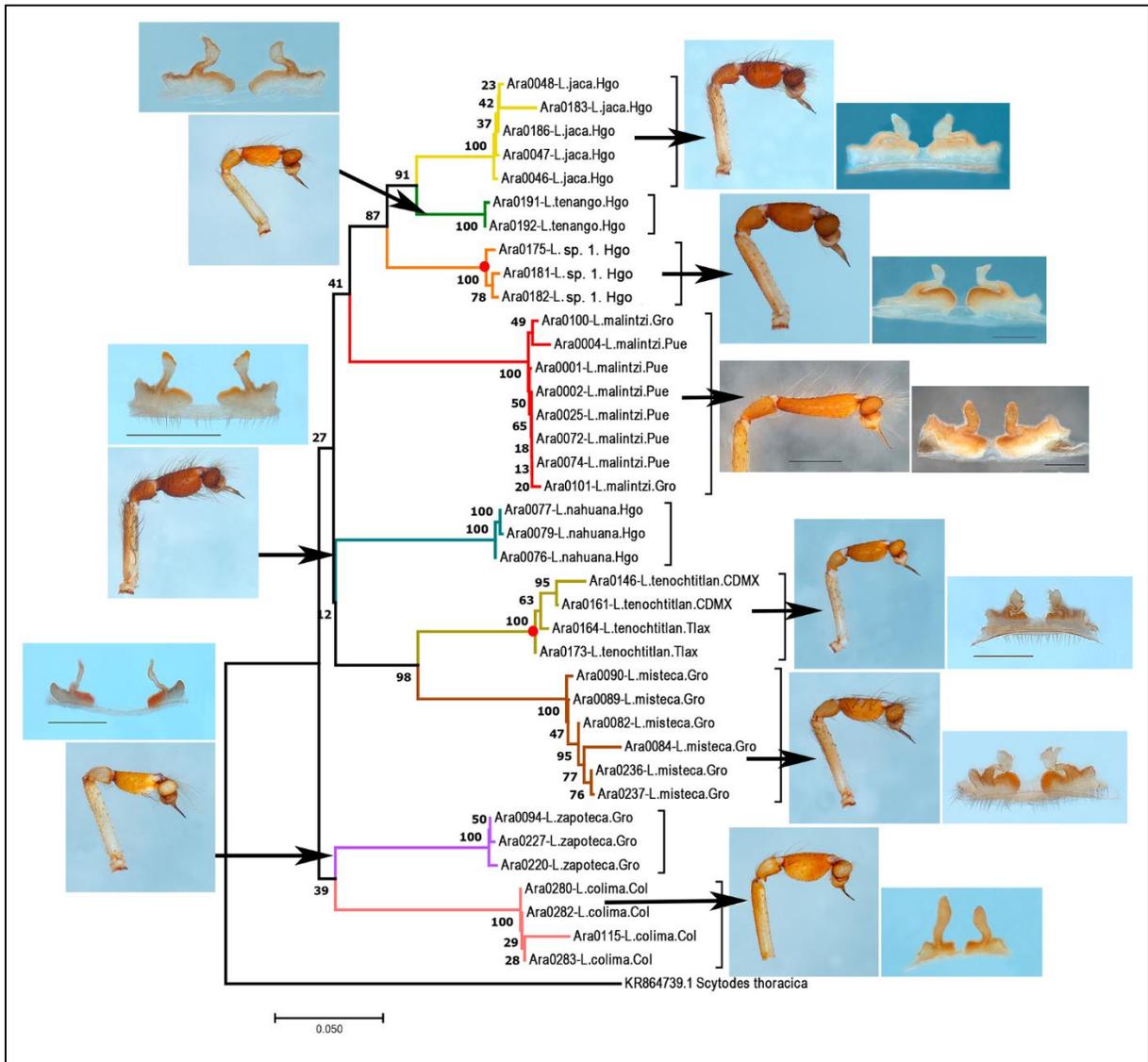


Figura 124. Análisis de distancias (p) genéticas con Neighbor Joining (NJ) para CO1 de nueve especies del género *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (valores significativos $> 50\%$). Los colores de las ramas representan cada una de las especies delimitadas. Los círculos rojos representan las especies nuevas.

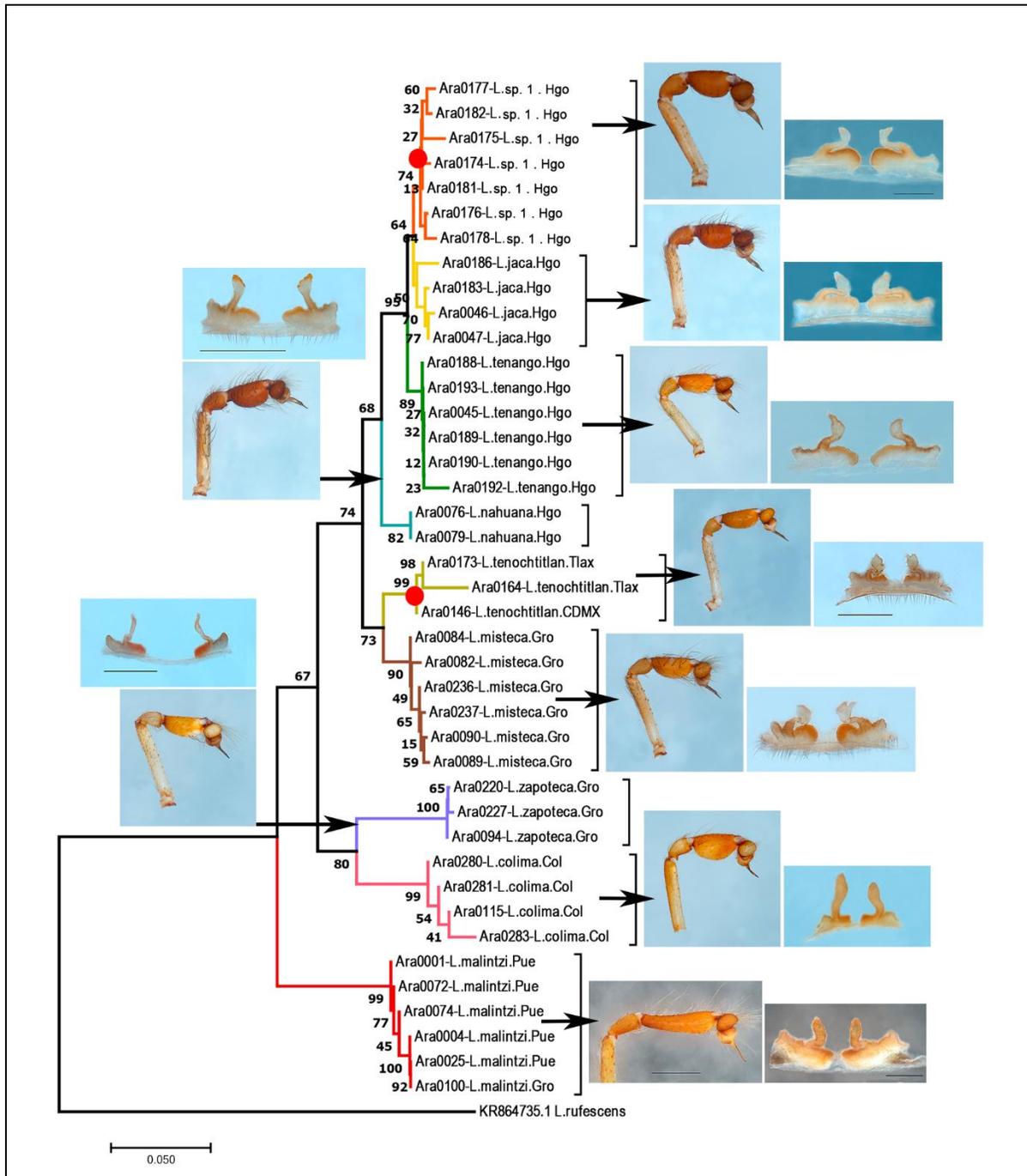


Figura 125. Análisis de distancias (p) genéticas con Neighbor Joining (NJ) para ITS2 de nueve especies del género *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (valores significativos de $>55\%$). Los colores de las ramas representan cada una de las especies delimitadas. Los círculos rojos representan las especies nuevas.

7.2.3. Delimitación de especies con métodos moleculares

Al igual que el análisis de clustering realizado con distancias (p) genéticas con NJ, los análisis de delimitación de especies basados en árboles bajo el concepto de especie filogenética con Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (ML) delimitaron nueve especies para CO1, ITS2 y el análisis concatenado (CO1+ITS2) (Figuras 126, 127, 128). Con probabilidades posteriores del 100% para cada clado con CO1 y arriba del 90% con ITS2. Del mismo modo, la evidencia morfológica para algunas especies como: *L. malintzi*, *L. nahuana*, *L. tenango* y *L. zapoteca*, nos corrobora los grupos monofiléticos basado en los pedipalpos de los machos presentando poca variación aun entre ejemplares de localidades diferentes (Figuras 37-44, 84-87, 120-123, 94-97). Sin embargo, para algunas especies como: *L. jaca*, *L. sp. 1* *L. misteca* y *L. tenochtitlan* la evidencia morfológica complica la determinación de las especies aun utilizando los pedipalpos de los machos. *L. misteca* y *L. tenochtitlan* presentan una morfología similar (Figuras 124, 125) a pesar de que la evidencia molecular (IB, ML, NJ, ABGD, GMYC y bPTP) nos delimita dos especies distintas (Figuras 126, 128). Esta similitud en la forma del pedipalpo también se observa entre *L. sp. 1* y *L. jaca*, ya que a pesar de ser especies distintas presentan una morfología muy similar (Figuras 102-104, 110-115); sin embargo, la evidencia molecular y los distintos análisis las recuperan también como dos especies distintas (Figuras 126, 128).

Posteriormente se utilizaron tres métodos más para los análisis moleculares y la delimitación de las especies del género *Loxosceles*, el método de delimitación de especies basado en distancias: ABGD con particiones recursivas (RP) e iniciales (IP) (Puillandre y cols. 2012), GMYC utilizando árboles ultramétricos y bPTP por medio de un árbol de inferencia bayesiana, además de evidencia morfológica (M) (Figuras 126-128). Como resultado para CO1, los cuatro métodos de delimitación (NJ, ABGD (IP), GMYC y bPTP) recuperan nueve especies: *L. colima*, *L. jaca*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango*, *L. tenochtitlan*, *L. sp. 1* y *L. zapoteca* (sin incluir el grupo externo) (Figura 126). Para ITS2 solo NJ y la evidencia morfológica recuperan nueve especies (sin incluir el grupo externo) (Figura 127) mientras que los demás métodos de delimitación como ABGD nos arrojan desde cinco hasta 17 especies, en cambio GMYC y bPTP son más estables arrojando de siete a 10 especies (Figura 127). Respecto a la matriz concatenada se recuperan las mismas nueve especies que con el gen CO1, a excepción del método GMYC (Coal) el cual recupera 10 especies.

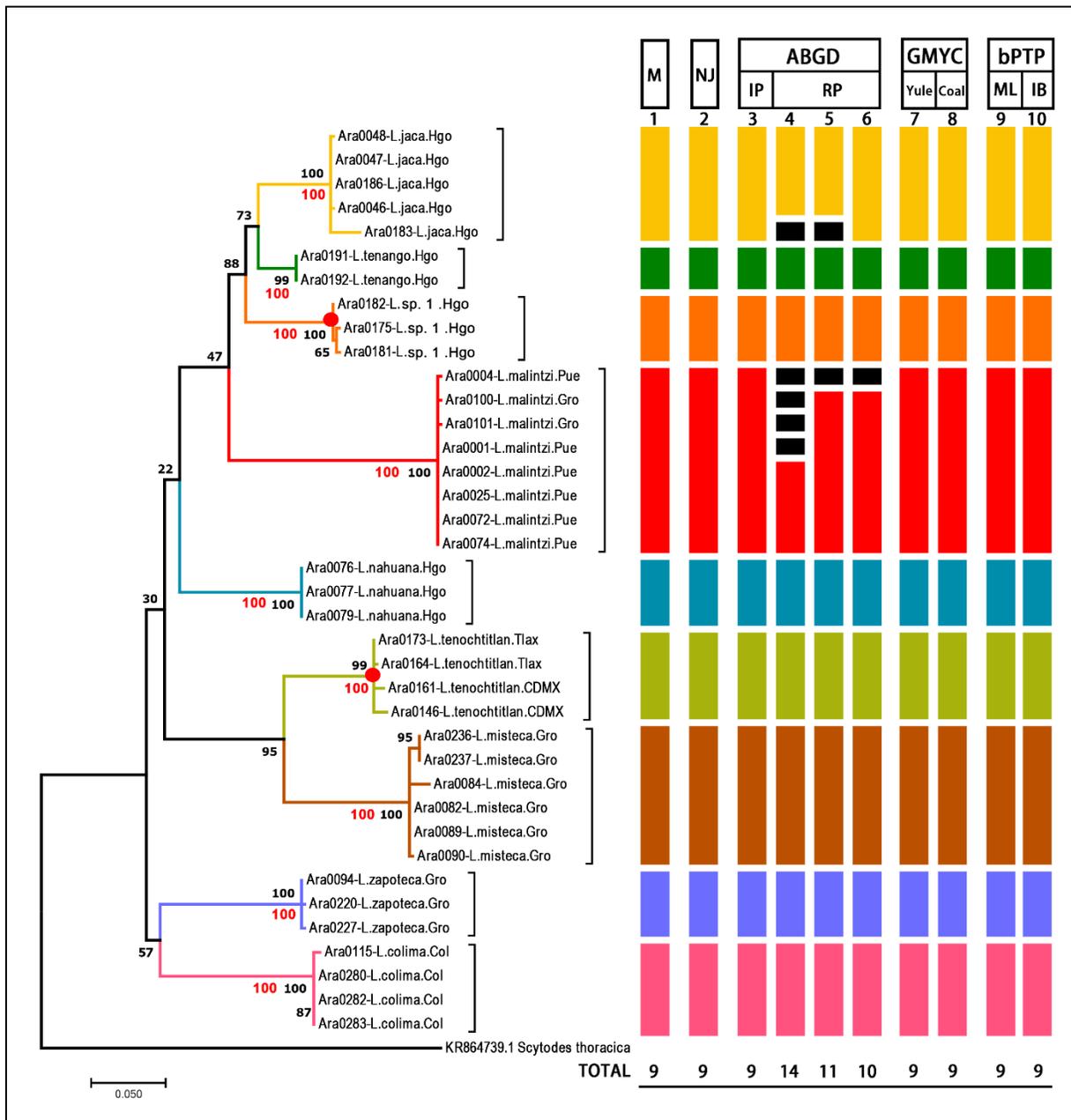


Figura 126. Delimitación de especies basadas en un árbol de Máxima Verosimilitud inferido a partir de un fragmento de CO1 de especies de *Loxosceles* de México (ramas y barras en colores). Los números en las barras a la derecha representan los métodos de delimitación: 1: Morfología (M). 2: Neighbor-Joining (NJ). 3: ABGD, con particiones iniciales (PI). 4, 5, 6: ABGD con particiones recursivas (PR). 7: GMYC análisis de Yule. 8: GMYC análisis de Coalescent. 9: bPTP con ML y 10: bPTP con IB. Los números debajo de las barras representan las especies recuperadas para cada método de delimitación. Los círculos rojos representan las especies nuevas. Los números rojos en las ramas representan valores de probabilidades posteriores bajo IB, los números negros representan valores de soporte de Bootstrap bajo ML.

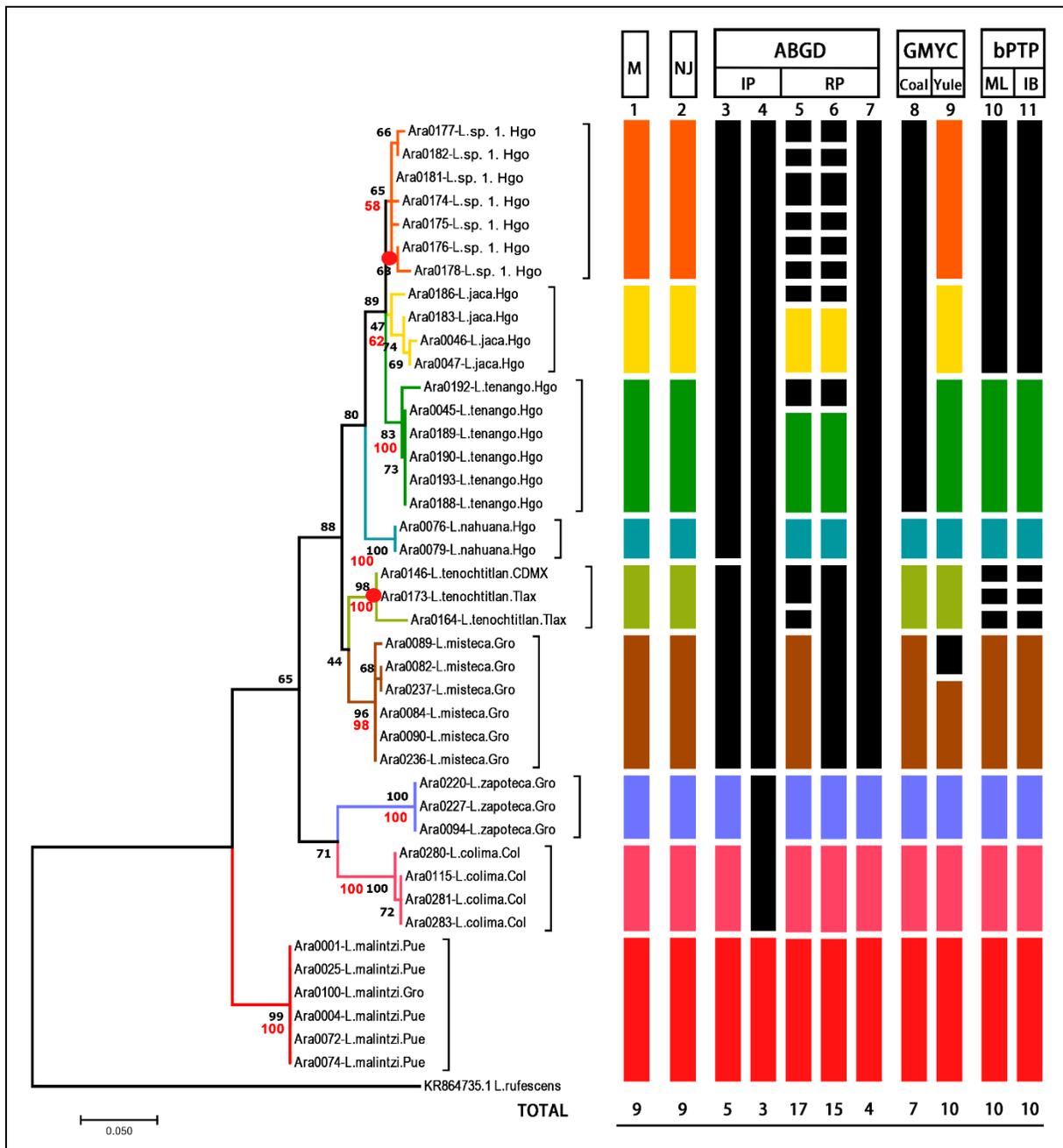


Figura 127. Delimitación de especies basadas en un árbol de Máxima Verosimilitud inferido a partir de un fragmento de ITS2 de especies de *Loxosceles* de México (ramas y barras en colores). Los números en las barras a la derecha representan los métodos de delimitación: 1: Morfología (M). 2: Neighbor-Joining (NJ). 3: ABGD, con particiones iniciales (PI). 4, 5, 6: ABGD con particiones recursivas (PR). 7: GMYC análisis de Yule. 8: GMYC análisis de Coalescent. 9: bPTP con ML y 10: bPTP con IB. Los números debajo de las barras representan las especies recuperadas para cada método de delimitación. Los círculos rojos representan las especies nuevas. Los números rojos en las ramas representan valores de probabilidades posteriores bajo IB, los números negros representan valores de soporte de Bootstrap bajo ML.

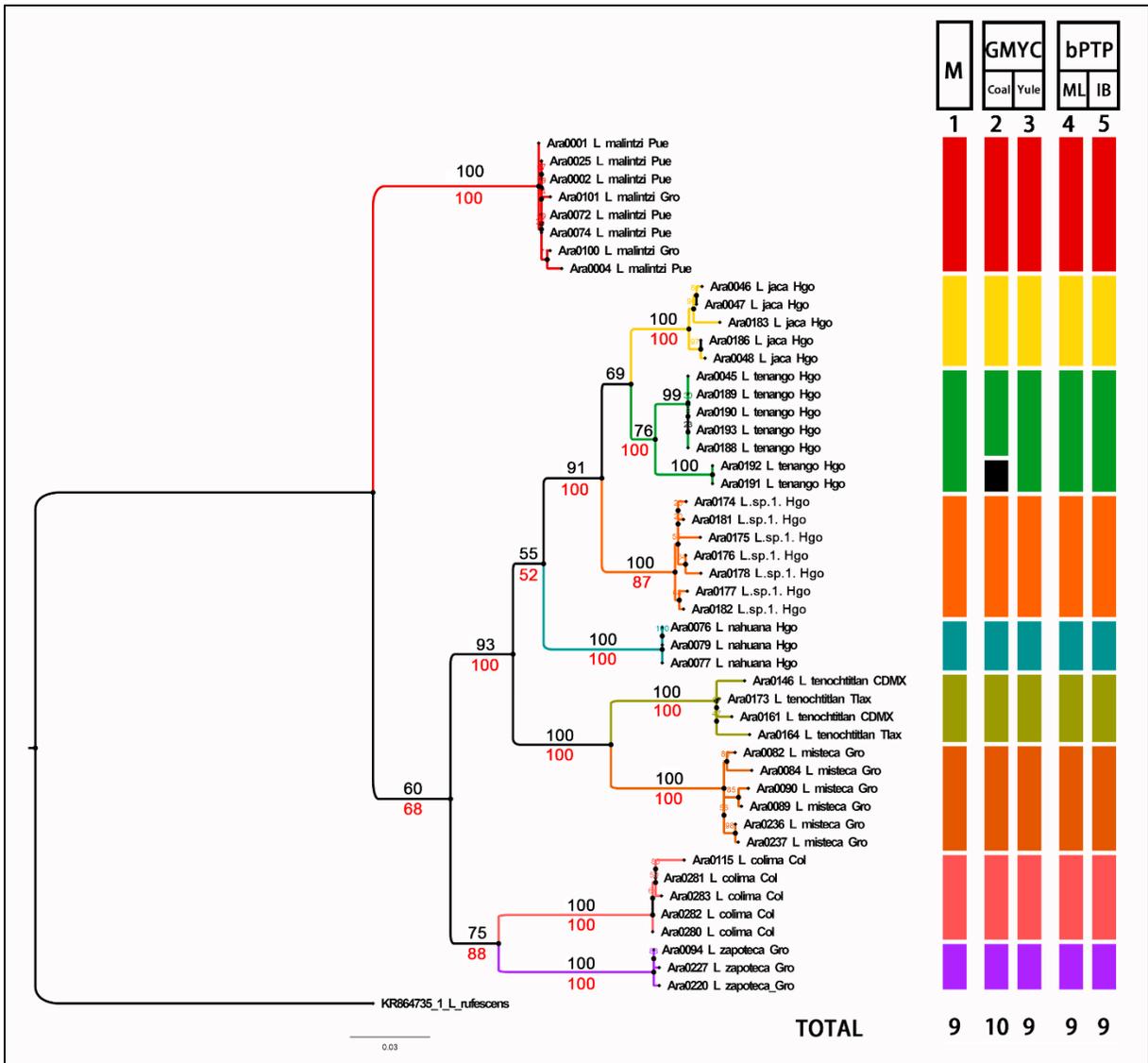


Figura 128. Delimitación de especies basadas en un árbol de Máxima Verosimilitud inferido a partir de una matriz concatenada de fragmentos de los genes CO1 e ITS2 de especies de *Loxosceles* de México (ramas y barras en colores). Los números en las barras a la derecha representan los métodos de delimitación: 1: Morfología (M). 2: GMYC análisis de Yule. 3: GMYC análisis de Coalescent. 4: bPTP con ML y 5: bPTP con IB. Los números debajo de las barras representan las especies recuperadas para cada método de delimitación. Los círculos rojos representan las especies nuevas. Los números rojos en las ramas representan valores de probabilidades posteriores bajo IB, los números negros representan valores de soporte de Bootstrap bajo ML.

8. DISCUSIÓN

8.1 Taxonomía: Estudios Morfológicos

Gertsch (1958) mencionó que la identificación de las especies de *Loxosceles* puede resultar un tanto complicada debido a la variación considerable presente en los receptáculos seminales de las hembras, por lo cual sugiere revisar una serie de hembras correspondientes a la misma especie para estar seguros del patrón que corresponde esta. Ese fue el caso de este estudio donde se encontró una amplia variación intraespecífica en los receptáculos seminales de ocho especies: *L. aff. colima*, *L. jaca*, *L. malintzi*, *L. misteca*, *L. nahuana*, *L. tenango*, *L. tenochtitlan* y *L. sp. 1*. Asimismo, menciona que algunas especies pueden ser más estables en cuanto a la forma de los receptáculos seminales que otras, como se encontró en este estudio para la especie *L. zapoteca* donde la forma de los receptáculos seminales fue conservada a diferencia del resto de especies estudiadas.

De igual manera Gertsch (1973 y 1983) mencionó que, a pesar de la amplia variación ya mencionada, los receptáculos seminales de las hembras resultan más útiles que los pedipalpos de los machos a la hora de identificar a las especies. Sin embargo, en este estudio los pedipalpos mostraron características morfológicas robustas para delimitar e identificar a las especies, ya que presentan una forma más conservada intraespecíficamente, como es el caso de cuatro especies: *L. malintzi*, *L. nahuana*, *L. tenango*, y *L. zapoteca*. En algunas especies: *L. misteca*, *L. tenochtitlan*, *L. jaca* y *L. sp. 1* la morfología de los pedipalpos es poco variable intra- e inter-específicamente, donde presentan similitud morfológica unas con otras especies y se dificulta la correcta identificación usando esta estructura exclusivamente.

Valdez-Mondragón y cols. (2018b) también reportan para *L. malintzi* que hay poca variación en la forma de los pedipalpos masculinos, mientras que los receptáculos seminales de las hembras son asimétricos y tienen una forma ampliamente variable, incluso en los especímenes de la misma localidad.

Asimismo, Valdez-Mondragón y cols. (2019) mencionan que, a pesar de la variación en receptáculos seminales, al menos para *L. tenochtitlan* y *L. misteca*, la distancia encontrada entre la base de los receptáculos seminales se mantiene, por lo que se toma como un carácter para

diferenciar entre estas dos especies.

Hasta el momento, no se sabe a qué se deba tal grado de variación de la forma de los receptáculos seminales de las hembras, por lo que se necesitan estudios adicionales para explicar este grado de variación tanto intra como interespecífica. Con base en lo anterior se puede hipotetizar que la variación en la forma de los receptáculos seminales se debe a lo siguiente: 1) variación debido al desarrollo ontogenético (diferentes estadios de las hembras), 2) hembras que han copulado vs. hembras vírgenes, 3) hembras que han puesto ovisacos y hembras que no, y 4) número de cópulas de las hembras.

8.2 Delimitación de especies (taxonomía integradora)

Respecto a la delimitación de especies con base en evidencia morfológica y molecular, *L. misteca* con *L. tenochtitlan*, y *L. jaca* con *L. sp. 1* por otro presentaron similitud morfológica interespecífica, pero la evidencia molecular nos permitió delimitar estas especies con ayuda de los marcadores CO1 e ITS2, con una media de distancia (p) genética del 13.8% para CO1 y del 4% para ITS2 en el caso de *L. misteca* con *L. tenochtitlan* y para *L. jaca* con *L. sp. 1* la media de distancia (p) genética fue de 10.5% para CO1 y de 1.8% para ITS2 entre ambas especies. Para el caso de estas especies a pesar de la morfología muy similar, existen diferencias morfométricas lineales y geométricas en el largo de las patas, en la forma de las tibias y los émbolos, que permiten diagnosticarlas y separarlas como especies diferentes (Solís-Catalan y Valdez-Mondragón, *en prep.*) dentro de un contexto de taxonomía integradora, sin ser consideradas especies crípticas estrictamente (Blagoev y cols. 2015). Dichas especies no pueden ser consideradas crípticas debido a que ambas pueden ser diagnosticadas morfológicamente (Valdez-Mondragón y cols. 2019). Asimismo, se delimitó a estas especies con la evidencia biogeográfica utilizando Modelaje de Nicho Ecológico (MNE) (Cortez-Roldán, 2018; Valdez-Mondragón y cols. 2019), siendo la biogeografía un factor importante que determina los límites de las especies al restringir las oportunidades de entrecruzamiento (Hamilton y cols. 2011). Como fue demostrado por Valdez-Mondragón y cols. (2019), para las especies *L. misteca* y *L. tenochtitlan* un factor importante para delimitar a estas especies fue el tipo de vegetación y altitud; aunque *L. tenochtitlan* no fue encontrada en hábitat natural, la

predicción del MNE indica que su distribución se ve influida por climas templados con bosques de pino y encino (Neártico), mientras que para *L. misteca* predice en bosques secos y tropicales, incluido el bosque tropical caducifolio (región Neotropical) (Valdez-Mondragón y cols. 2019).

Así como en este trabajo, Ribera y Planas (2009) encontraron dos especies: *L. mrazig* de Túnez, y *L. gaucho* de Brasil, difíciles de reconocer y de separar morfológicamente debido a su similitud, sin embargo, con ayuda del gen CO1 revelan que se trata de especies diferentes con una distancia genética mayor al 20% entre ambas.

De manera similar, Ribera y Planas (2015) con ayuda de los genes CO1 e ITS2 realizan la descripción de seis nuevas especies crípticas de *Loxosceles* de las Islas Canarias, reportando distancias (*p*) genéticas mayores al 12% entre las distintas especies. Dichos autores mencionan que fue complicado determinar las especies solo con evidencia morfológica debido a la simplicidad de las estructuras sexuales, como es el caso de las especies estudiadas en el presente trabajo.

Como mencionan Hamilton y cols. (2011) rara vez podemos delimitar especies basados únicamente en datos moleculares, es por eso que además de la evidencia molecular la evidencia geográfica aporta información para delimitar estas especies (*L. jaca* y *L. sp 1*), ya que se encontraron en localidades diferentes (Cardonal y Jacala, Hidalgo, respectivamente) separadas por una distancia relativamente larga (85 km) la cual puede fungir como una barrera para estas especies de arañas, ya que suelen tener dispersiones limitadas (Sandidge y Hopwood, 2005; Binford y cols. 2008; Vetter, 2008, Foelix, 2011). Además, ambas especies se encontraron a diferentes tipos de vegetación, *L. sp. 1*. en selva baja entre los 1,315 y 1,481 msnm bajo rocas, saguaros, opuntias y plantas de secas; y *L. jaca* en matorral xerófilo a 1,290 msnm entre hojas de agave seco con humedad intermedia relativa. Las diferencias en hábitat y distribución de estas especies se corroboran también con la morfología, para *L. jaca* (Figuras 102-104, 129) la tibia es más ancha y corta que en *L. sp. 1* (Figuras 110-115), y el émbolo también presenta diferencias siendo más largo y delgado en *L. sp. 1* (Figuras 110-115). Adicionalmente, los receptáculos seminales presentan diferencias en la esclerotización en la base interior (Figuras 98-101, 105-109), aunado a las distancias (*p*) genéticas encontradas entre estas especies del 10.5% con el gen CO1.

De igual modo, la evidencia molecular, con distancias (*p*) genéticas obtenidas con los

genes CO1 e ITS2 < 0.5% intra-específicamente, junto con la evidencia morfológica corrobora la delimitación de *L. malintzi* especie que originalmente fue descrita solo con morfología por Valdez-Mondragón y cols. 2018b.

En cuanto a las distancias (p) genéticas con ambos marcadores, CO1 nos da una mejor resolución que ITS2 (Figura 125), ya que con el gen nuclear ITS2 la variación es mínima con distancias que no rebasan del 2% al 17% entre diferentes especies y 8.4% entre grupos de especies, como se puede observar en la tabla de distancias (p) genéticas; en cambio CO1 nos da unas distancias mayores, del 9% al 19% entre diferentes especies, con un promedio entre grupos de especies del 15.9% (Apéndices 1, 2). Esto, además, se observó en los distintos métodos moleculares de delimitación de especies, donde ITS2 dependiendo del método utilizado nos arroja diferentes especies en comparación con CO1 (Figuras 126, 127, 128), lo que nos indica que el marcador “universal” CO1 presenta una tasa de sustitución adecuada que nos permite delimitar especies como se ha demostrado en trabajos previos con arañas (Ribera y Planas, 2009; Hamilton y cols. 2011; Hamilton y cols. 2014; Planas y Ribera, 2014; Planas y Ribera, 2015; Hendrixson y cols. 2015; Ortiz y Francke, 2016; Aguilera-Ardiles 2016; Tahami y cols. 2017).

La delimitación de especies del género *Loxosceles*, en los trabajos de Ribera y Planas (2009) y Planas y Rivera (2014), utilizaron también un análisis de distancias (p) genéticas y el gen mitocondrial CO1, a la par de la evidencia morfológica, para corroborar la existencia de dos especies distintas, que presentan una morfología conservada. Ellos encontraron distancias (p) genéticas mayores al 20% y 11% entre las especies analizadas (*L. gaucho* y *L. mrazig*), y en nuestro caso las distancias (p) genéticas son mayores al 15% entre las diferentes especies. También reportaron distancias (p) genéticas promedio bajas dentro de la misma especie (0.26% y menores al 1%), y en este estudio las distancias (p) genéticas intraespecíficas son bajas (<1%).

Así mismo, Planas y Ribera (2015), realizaron la descripción de seis nuevas especies cripticas de arañas del género *Loxosceles* con ayuda de evidencia molecular y morfológica, ya que con el análisis de distancias con NJ obtuvieron distancias (p) genéticas mayores al 12% entre las especies encontradas, similar a lo encontrado en el presente estudio. La morfología conservada es usual en de las arañas del clado Synspermiata, dentro del cual encontramos al género *Loxosceles*, que debido a las genitalias relativamente simples de machos y hembras

(Gertsch y Ennik, 1983), se complica la identificación y delimitación de las especies, teniendo que recurrir así a otros métodos como los datos moleculares (Planas y Ribera, 2015) para poder delimitar a las especies.

Finalmente, con la taxonomía integradora, de las nueve especies delimitadas para CO1 siete coinciden con todos los métodos de delimitación molecular implementados: 1. *L. colima*, 2. *L. misteca*, 3. *L. nahuana*, 4. *L. tenango*, 5. *L. tenochtitlan*, 6. *L. sp. 1* y 7. *L. zapoteca* (Figura 126) y para ITS2 solo *L. malintzi* se recupera con todos los métodos de delimitación molecular implementados (Figura 127). Para ambos genes (CO1+ITS2) las especies recuperadas con todos los métodos de delimitación molecular implementados en la matriz concatenada fueron ocho: 1. *L. colima*, 2. *L. jaca* 3. *L. malintzi*, 4. *L. misteca*, 5. *L. nahuana*, 6. *L. tenochtitlan*, 7. *L. sp. 1* y 8. *L. zapoteca* (Figura 128).

Cabe resaltar que a través del método ABGD con ITS2 se delimitaron hasta 17 especies, en donde cada secuencia fue tomada como si fuera una especie diferente aun perteneciendo a una sola localidad; con este método solo delimitó una especie que corresponde con la evidencia morfológica: *L. malintzi* (Figura 127), mientras que con CO1 las nueve especies fueron delimitadas correctamente (Figura 126). Esto también se encontró en el trabajo de Ortiz y Francke (2016) con tarántulas, donde mencionan que CO1 es un buen marcador de código de barras, sin descartar que podría conducir a resultados inexactos. Sin embargo, para ITS1 destacaron que no fue un marcador confiable para la delimitación de sus especies. De la misma forma, Agnarsson (2010) mencionó que ITS2 fue insuficiente para resolver las relaciones entre especies estrechamente relacionadas, aunque también indicó que ITS2 es un marcador de fácil secuenciación y amplificación, que se ha utilizado en la filogenia de arañas, sin embargo, presenta un uso limitado en los niveles taxonómicos más bajos.

No obstante, Cao y cols. (2016) los cuales trabajaron con un género de arañas *Pseudopoda* Jäger, 2000, sugirieron utilizar una combinación de fragmentos de CO1 + ITS2, como se realizó en este estudio, ya que identifica y diagnostica especies de manera más adecuada que los códigos de barras mitocondriales solos.

Debido a las diferencias que se presentan con los distintos métodos de delimitación y la morfología en algunos casos para las arañas del género *Loxosceles*, se recomienda utilizar distintos enfoques y evidencias de manera integradora: biogeográficos, ecológicos, además de

los datos moleculares para la delimitación de especies y así obtener resultados más robustos para la delimitación de linajes (Dayrat, 2005; DeSalle y cols. 2005).

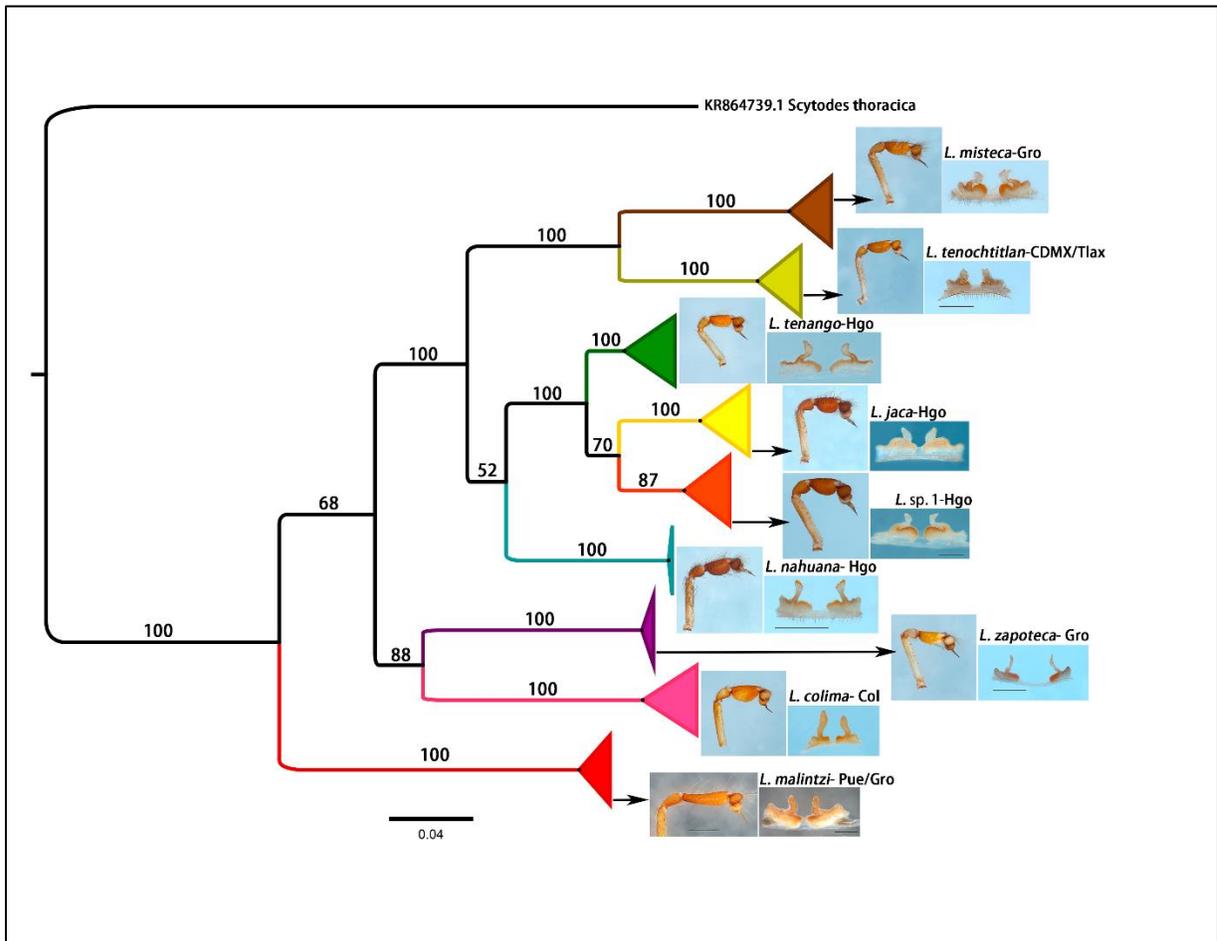


Figura 129. Topología sintetizada de los resultados de una matriz concatenada de fragmentos de los genes CO1 e ITS2 de las nueve especies de *Loxosceles* recuperadas del Centro-Occidente de México recuperadas bajo los distintos métodos moleculares de delimitación de especies y morfología (taxonomía integradora). Los números sobre las ramas representan valores de probabilidades posteriores (PP).

9. CONCLUSIONES

1. La variación morfológica en los receptáculos de las hembras de las especies de *Loxosceles* del grupo *reclusa* complica su identificación y delimitación, por lo que la evidencia combinada (morfología de ambos sexos y molecular) dentro de un contexto de taxonomía integradora son evidencia suficiente para la delimitación de especies.
2. Los pedipalpos de los machos presentan caracteres taxonómicamente robustos para la identificación de especies de la región Centro-Occidente de México, al presentar poca variación intraespecífica lo que permite una precisa diagnosis e identificación a nivel específico.
3. CO1 mostró ser un marcador con tasa de sustitución suficiente para la delimitación de especies de *Loxosceles* de la región Centro-Occidente en comparación con ITS2, cuyo aporte para la delimitación de especies fue menos informativo; sin embargo, ambos genes concatenados presentan evidencia robusta para delimitación de especies.
4. La taxonomía tradicional basada en evidencia morfológica, no es evidencia suficiente para la delimitación, diagnosis e identificación de las especies de *Loxosceles* en la mayoría de las especies, por lo que es necesario el uso de varias evidencias al momento de realizar taxonomía con este grupo de arañas.
5. Con este enfoque de taxonomía integradora, se infiere que la diversidad de arañas del género *Loxosceles* de la región Centro-Occidente de México esta subestimada aún, por lo que el uso de diferentes líneas de evidencia permitirá conocer a ciencia cierta los límites y la diversidad de este grupo de arañas no solo para la región, sino para el resto del país.

10. PERSPECTIVAS

Se debe realizar un esfuerzo adicional para recolectar la especie de *Loxosceles boneti*, de Acapulco, Guerrero, ya que pesar de que se fue a la localidad tipo no se recolectaron ejemplares de esta especie. Es necesaria una revisión taxonómica del género *Loxosceles* en todo México utilizando un enfoque integrador, ya que el último trabajo fue de hace 35 años utilizando solo morfología y las estructuras importantes para determinar las especies se representan con dibujos no muy detallados y no siempre de ambos sexos.

Se recomienda también buscar más genes mitocondriales adicionales que permitan una resolución más robusta a nivel específico para la delimitación de las arañas del género *Loxosceles*.

Es necesario recolectar ejemplares frescos del género *Loxosceles* de las distintas partes del país, para estudiar la variación morfológica y molecular que existe en estas especies presentes en México.

Se recomienda ampliar los muestreos para la Región Centro-Occidente en los estados de: Aguascalientes, Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Querétaro y Veracruz

Indudablemente, aún existen especies nuevas de *Loxosceles* por descubrir en el país, como fue el caso en este trabajo. Mejorar el conocimiento de la biodiversidad en México es el principal objetivo de la taxonomía integradora.

11. REFERENCIAS

- Aguilera-Ardiles, MA. 2016. Delimitación de especies del género *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) a partir de evidencia molecular y morfológica Tesis Doctoral, Universidad de Concepción.
- Agnarsson, I. 2010. The utility of ITS2 in spider phylogenetics: notes on prior work and an example from *Anelosimus*. *JoA* 38: 377-383.
- Agnarsson I., Coddington J.A y Kuntner M. 2013. Systematics: progress in the study of spider diversity and evolution. En: *Spider Research in the 21st Century*. D. Penney (Ed.) Editorial: Siri Scientific Press. Manchester. pp 58
- Akpınar, A. 2017. Phylogenetic Analysis of the *Alopecosa* Spiders (Lycosidae) from Gaziantep Based on Mitochondrial *Coi* Gene Sequences. *Entomol. news* 127: 273-283.
- Alcántara, MR. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: *Ecología molecular*. Eguiarte Fruns L. E, Souza V, Aguirre X (comp.). Editorial. CONABIO. México. Pp 541
- Astrin JJ. y Stueben PE .2008. Phylogeny in cryptic weevils: molecules, morphology and new genera of western Palaearctic Cryptorhynchinae (Coleoptera: Curculionidae). *Invertebr. Syst* 22: 503–522.
- Astrin, JJ., Höfer, H., Spelda, J., Holstein, J., Bayer, S., Hendrich, L., y Monje, JC. 2016. Towards a DNA barcode reference database for spiders and harvestmen of Germany. *PLoS One* 11: 1-24
- Arisqueta-Chablé, C., Pinkus-Rendón, M., Manrique-Saide, P., Delfín-González, H. y Meléndez-Ramírez, V. 2015. Colección Aracnológica. *Bioagrocencias* 8: 9–15.
- Bagley, JC., De Podestà Uchôa de Aquino, P., Breitman, MF., Langeani, F., y Colli, GR. 2019. DNA barcode and mini-barcode identification of freshwater fishes from Cerrado headwater streams in central Brazil. *J. Fish Biol.* 1: 1-15.
- Ball SL., Hebert PDN., Burian SK y Webb., JM. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *JN AM Benthol Soc.* 24: 508-524.
- Ballesteros, JA., y Sharma, PP. 2019. A critical appraisal of the placement of Xiphosura (Chelicerata) with account of known sources of phylogenetic error. *Syst Biol* 10: 1-14

- Barbaro, KC., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C. y K. Winkel. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45: 489-499.
- Barrett, RD., y Hebert, PD. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool* 83: 481-491.
- Beccaloni, J. 2009. Arachnids. Natural History Museum, London.
- Bickford, D., Lohman, DJ., Sodhi, NS., Ng, PK., Meier, R., Winker, K., y Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evolut* 22: 148-155.
- Binford, GJ., Callahan, MS., Bodner, MR., Rynerson, MR., Núñez, PB., Ellison, CE., y Duncan, RP. 2008. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Mol Phylogenet Evol* 49: 538-553.
- Binford, GJ., Cordes, MH., y Wells, MA. 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* 45: 547-560.
- Bizuet-Flores, MY., Jiménez-Jiménez, ML., Zavala-Hurtado, A. y Corcuera, P. 2015 Diversity patterns of ground dwelling spiders (Arachnida: Araneae) in five prevailing plant communities of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. *Rev Mex Biodivers* 86: 153-163.
- Blagoev, GA., Sones, JE., deWaard, JR., y Hebert, PD. 2015. Cryptic speciation among the spiders (Araneae) of North America: insights from barcoding 2000 species. *Genome* 58: 197-197
- Blaxter, M., y Floyd, R. 2003. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends Ecol Evolut* 18: 268-269.
- Bond JE., Garrison, NL., Hamilton, CA., Goodwin, R.L., Hedin, M., y Agnarsson, I. 2014. Phylogenomics Resolves a Spider Backbone Phylogeny and Rejects a Prevailing Paradigm for Orb Web Evolution. *Curr Biol* 24: 1765-1771.
- Bradley, RA. 2013. Common Spiders of North America. University of California Press, Berkeley, California.
- Brescovit, AD., Francke, O., Laborda, Á., Parra, GM., Scioscia, C., Simó, M., y Núñez, CV.

2017. Neotropical Arachnological Collections: Basic Tools for the Development of Spider Research. In Behaviour and Ecology of Spiders. Montevideo, Uruguay: Springer. pp. 55-84.
- Brescovit, AD., Taucare-Ríos, A., Magalhaes, IL., y Santos, AJ. 2017. On Chilean *Loxosceles* (Araneae: Sicariidae): first description of the males of *L. surca* and *L. coquimbo*, new records of *L. laeta* and three remarkable new species from coastal deserts. Eur J Taxon 388: 1–20
- Brignoli, PM. 1969. Note sugli Scytodidae d'Italia e Malta (Araneae). Fragm. Entomol. 6: 121-166
- Briones-Osorno. 2018. Comparación altitudinal de la diversidad y abundancia de arañas (Arachnida: Araneae) de suelo en dos tipos de vegetación de la zona noreste del Parque Nacional La Malinche (PNLM), Tlaxcala, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Bruvo-Madaric, B., Huber, BA., Steinacher, A. y Pass G. 2005. Phylogeny of pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): combined analysis using morphology and molecules. Mol Phylogenet Evol 37: 661-673.
- Cadena Mendoza, GDL. 2016. Eliminación de impedimentos taxonómicos y ecológicos en "hot-spots" de biodiversidad mediante herramientas moleculares: los Chrysomelidae y sus asociaciones tróficas en el bosque seco tropical de Nicaragua. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
- Campuzano, EF., Ibarra-Núñez, G., Chamé-Vázquez, E. y Montaña Moreno, H. 2016. Understory spider assemblages from a cloud forest in Chiapas, Mexico, and their relationships to environmental variables. Arthropod-Plant Inte10: 237-248.
- Canals, M., Taucare-Rios, A., Solis, R., y Moreno, L. 2016. Dimorfismo sexual y morfología funcional de las extremidades de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849). Gayana 80: 161-168.
- Candía-Ramírez, DT. y Valdez-Mondragón, A. 2017. Spiders of the Orbiculariae clade (Araneae: Araneomorphae) from Calakmul municipality, Campeche, Mexico. Rev Mex Biodivers 88: 154-162.
- Cao, X., Liu, J., Chen, J., Zheng, G., Kuntner, M., y Agnarsson, I. 2016. Rapid dissemination of taxonomic discoveries based on DNA barcoding and morphology. Sci. Rep. 6: 37066.

- Carstens, BC., Pelletier, TA., Reid, NM., y Satler, JD. 2013. How to fail at species delimitation. *Mol Ecol* 22: 4369-4383.
- Chaim, OM., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, AC. M., Ferrer, VP., Matsubara, FH., y Senff-Ribeiro, A. 2011. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins* 3: 309-344.
- Chamberlin, RV. y Ivie, W. 1938. Araneida from Yucatan. *Publ. - Carnegie Instit. Wash.* 491: 123-136.
- Coddington, JA. 1990. Ontogeny and Homology in the Male Palpus of Orb Weaving Spiders and their relatives, with Comments on Phylogeny (Araneoclada: Araneoidea, Deinopidae). *Smithson. Contr. Zool.* 496: 1-52
- Coddington, JA. y Levi, HW. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annu Rev Ecol Syst* 22: 565–592.
- Coddington, JA. 2005. Phylogeny and classification of spiders En Ubick, D.; Paquin, P.; Cushing, PE. y Roth, V. *Spiders of North America: an identification manual.* American Arachnological Society. pp. 18–24.
- CONEVyT. 2018. Comisión Nacional de Educación para la Vida y Trabajo. Regiones de México. Ciencias Sociales. Secretaría de Educación Pública pp. 73-95.
- Corcuera, P., Valverde, PL., Jiménez, ML., Ponce-Mendoza, A., De la Rosa, G. y Nieto, G. 2016. Ground spider guilds and functional diversity in native pine woodlands and eucalyptus plantations. *Environ. Entomol.* 45: 292-300.
- Cortez-Roldán, MR. 2018. Arañas de importancia médica: Distribución y Modelaje de Nicho Ecológico de las especies de arañas violinistas del género *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832 (Araneae, Sicariidae) de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Da Silva, PH., Da Silveira, RB., Appel, MH., Mangili, OC., Gremski, W., y Veiga, SS. 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44: 693-709.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol J Linnean Soc* 85: 407–415.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 56: 879-886.
- De Roodt, AR., Salomón, OD., Lloveras, CS. y Orduña, AT. 2002. Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*. *Medicina (Buenos Aires)* 62: 83-94.

- DeSalle, R., Egan, MG., y Siddall, M. 2005. The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1905–1916.
- Desales-Lara, M. A., Francke, O. y Sánchez, P. 2013. Diversidad de Arañas (Arachnida: Araneae) en Hábitats Antropogénicos. *Rev Mex Biodivers* 84: 291-305.
- Desales-Lara, MA., Jiménez, ML., y Corcuera, P. 2018. Nuevos registros de arañas (Arachnida: Araneae) para México y listado actualizado de la araneofauna del estado de Coahuila. *Acta Zool. Mex.* 34: 1-14.
- Domingos, MO., Barbaro, KC., Tinan, W., Penny, J., Lewis, DJM. y New, RRC. 2003. Influence of sphingomyelin and TNF- α release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. *Toxicon* 42: 471-479
- Duncan, RP., Rynerson, MR., Ribera, C., y Binford, GJ. 2010. Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage. *Mol Phylogenet Evol* 55: 234-248.
- Durán-Barrón, CG., Montiel-Parra, G., Valdez-Mondragón, A., Villegas-Guzmán, GA., Paredes-León, R. y Pérez, TM. 2016. Arácnidos (Arachnida). Pp. 229-238. In: La biodiversidad en la Ciudad de México, Vol. II. CONABIO/SEDEMA, México.
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>)
- Fierro, FF. 2014. Electroforesis de ADN. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., y Rocha-Munive, MG (eds). Pp. 27-51
- Fischer, ML., y Vasconcellos-Neto, J. 2005. Development and life tables of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitao 1934 (Araneae, Sicariidae). *J. Arachnol.* 33: 758-766.
- Foelix, RF. 1996. *Biology of Spiders*: Oxford University Press. New York.
- Foelix, RF. 2011. *Biology of Spiders*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3: 294- 299.
- Flores, RC. 2007. La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su

- reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. En: Ecología molecular. Eguiarte Fruns L. E, Souza V, Aguirre X (comp.). Editorial. CONABIO. México. Pp 325
- Fonseca, G., Derycke, S., y Moens, T. 2008. Integrative taxonomy in two free-living nematode species complexes. *Biol J Linnean Soc* 94: 737-753.
- Francke, OF. 2014. Biodiversidad de Arthropoda (Chelicerata: Arachnida ex Acari) en México. *Rev Mex Biodivers* 85: 1-11.
- Franco, JL. Sin fecha. Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano. Definición de marcador genético. Disponible en: https://webs.um.es/jalozate/recursos-docentes/Areas/General/Ayudas_docentes/Glosario/Glosario/43.htm. Consulta: 02 de septiembre del 2019.
- Friedel, T. 1987. Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Spinnengift auf Insekten. Diplom-Arbeit Universität Regensburg.
- Friedel, T., y Nentwig, W. 1989. Immobilizing and lethal effects of spider venoms on the cockroach and the common mealbeetle. *Toxicon* 27: 305–316.
- Gertsch, WJ. 1958. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and the West Indies. *Am. Mus. Novit.* 1907: 1-46.
- Gertsch, WJ. 1967. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 136: 117-174.
- Gertsch, WJ. 1973. A report on cave spiders from Mexico and Central America. *AMCS Bulletin* 5: 141-163.
- Gertsch, WJ. y Ennik, F. 1983. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and the West Indies (Araneae, Loxoscelidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 175: 264-360.
- Giribet, G., Edgecombe, GD., Wheeler, WC., y Babbitt, C. 2002. Phylogeny and Systematic Position of Opiliones: A Combined Analysis of Chelicerate Relationships Using Morphological and Molecular Data 1. *Cladistics* 18: 5-70.
- González-Sponga, MA. 2010. Biodiversidad. Arácnidos de Venezuela. Descripción de seis especies nuevas del género *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae: Scytodidae: Loxoscelinae). *Boletín, Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales de*

Venezuela 68: 31-49

- Guerrero-Fuentes, DR. 2017. Revisión taxonómica del género *Anicius* Chamberlin, 1925 (Araneae: Salticidae). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guerrero-Fuentes, DR., y Francke, OF. 2019. Taxonomic revision of *Anicius* Chamberlin, 1925 (Araneae: Salticidae), with five new species of jumping spiders from Mexico. *Zootaxa* 4638: 485-506.
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hamilton, CA., Formanowicz, DR. y Bond, JE. 2011. Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): cryptic diversity in North American tarantulas. *PLoS one.* 6: e26207.
- Hamilton, CA, Hendrixson, BE., Brewer, MS. y Bond, JE. 2014. An evaluation of sampling effects on multiple DNA barcoding methods leads to an integrative approach for delimiting species: A case study of the North American tarantula genus *Aphonopelma* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). *Mol Phylogenet Evol.* 71: 79–93.
- Hamilton, CA., Hendrixon, BE y Bond, JE. 2016. Taxonomic revision of the tarantula genus *Aphonopelma* Pocock, 1901 (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae) within the United States. *ZooKeys* 560:1-340.
- Hebert, PD., Cywinska, A., Ball, SL., y deWaard, JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond [Biol]* 270: 313-322.
- Hénaut, YG. Ibarra-Núñez y López-Argoytia, L. 2012. Arañas las maestras de la seda. El colegio de la frontera sur (ECOSUR). Pp. 41.
- Hendrixson, BE., Guice, AV. y Bond, JE. 2015. Integrative species delimitation and conservation of tarantulas (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae) from a North American biodiversity hotspot. *Insect Conserv Divers* 4: 1-12.
- Hillis DM., y Dixon, MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* 66: 411-453.
- Hite, JM., Gladney, WJ., Lancaster JL. Jr., and Whitcomb, WH. 1966. Biology of the brown recluse spider. University of Arkansas Agricultural Experiment Station Bulletin 711: 26

pp.

- Hoffmann, A. 1976. Relación bibliográfica preliminar de las arañas de México (Arachnida: Araneae). Publicaciones especiales No. 3. Instituto de Biología, UNAM, México. Pp. 117.
- Hoffman, A. 1993. El maravilloso mundo de los arácnidos. Editorial Fondo de Cultura Económica, México. Pp. 166
- Horner, NV., y Stewart, KW. 1967. Life history of the brown spider, *Loxosceles reclusa* Gertsch and Mulaik. Tex J Sci 19: 334-347.
- Howarth, FG. 1972. Cavernicoles in lava tubes on the island of Hawaii. Science 175: 325-326.
- Huang, D., Hormiga, G., Cai, C., Su, Y., Yin, Z., Xia, F., y Giribet, G. 2018. Origin of spiders and their spinning organs illuminated by mid-Cretaceous amber fossils. Nat. Ecol. Evol. 623-627.
- Huber, BA. 2003. Rapid evolution and species-specificity of arthropod genitalia: fact or artifact?. Org Divers Evol. 3: 63-71.
- Huber, BA. 2005. Sexual selection research on spiders: progress and biases. Biol Rev 80: 363-385.
- Huber, BA., y Gonzalez, AP. 2001. A new genus of pholcid spider (Araneae, Pholcidae) endemic to western Cuba, with a case of female genitalic dimorphism. Am. Mus. Novit. 2001: 1-23.
- Ibarra-Núñez, G. 2013. Diversidad de las Arañas (Arachnida: Araneae). En: La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio) y Gobierno del Estado de Chiapas, México. pp. 191-196.
- Ji, YJ., Zhang, DX. y 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. Mol. Ecol. Notes 3: 581-585.
- Jiménez, ML. 1996. Araneae. JE. Llorente-Bousquets, A. N. García-Aldrete y E. González-Soriano (Eds.). Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. Pp. 83-101.

- Jiménez, ML. y Llinas, GJ. 2005. Description of male *Loxosceles mulege* Gertsch y Ennik 1983 (Araneae: Sicariidae) of Baja California. *J. Med. Entomol.* 42: 1082-1084.
- Jiménez, ML. e Ibarra-Nuñez, G. 2008. Arañas (Arácnidos). In Ocegueda, S. y Llorente Bousquets, J. (eds.) *Catálogo taxonómico de especies de México*. In *capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México, CD1.
- Jiménez, ML., Nieto-Castañeda, IG., Correa-Ramírez, MM. y Palacios-Cardiel, C. 2015 Las arañas de los oasis de la región meridional de la península de Baja California, México. *Rev Mex Biodivers* 86: 319–331.
- Jocque, R. 2002. Genitalic polyorphism a challenge for taxonomy. *J. Arachnol.* 30: 298–306.
- Juárez-Sánchez, AR. 2019. Arañas de importancia médica: Estudio ultra morfológico de estructuras somáticas y diagnósticas de arañas violinistas del género *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832 (Araneae, Sicariidae) de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Kaston, BJ. 1972. *How to Know the Spiders*. Browne, Dubuque, Iowa.
- Katoh, K. y Toh, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 4: 286-298. MAFFT Version 6 is available at <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., y Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Kress, WJ., Erickson, DL., 2012. DNA Barcodes: methods and protocols. In: Kress, W., Erickson, D. (Eds.). *Humana Press*, Totowa, NJ, pp. 3–8.
- León-Règagnon, V. 2018. Identificación y delimitación de especies desde la perspectiva del código de barras de DNA. En Mata López y cols. (Ed). *Sistemática molecular y bioinformática. Guía práctica*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 202-215.
- Levi, HW., Levi, LR., y Zim, HS. 1968. *A guide to spiders and their kin*. Golden Press. New York.

- Lotz, LN. 2012. Present status of Sicariidae (Arachnida: Araneae) in the Afrotropical region. *Zootaxa* 3522: 1–41.
- Lotz, LN. 2017. An update on the spider genus *Loxosceles* (Araneae: Sicariidae) in the Afrotropical region, with description of seven new species. *Zootaxa* 4341: 475-494.
- Lucio-Palacio, CR. e Ibarra-Núñez, G. 2015. Arañas arborícolas de cacaotales con diferente tipo de manejo en Chiapas, México. *Rev Mex Biodivers* 86: 143-152.
- Luo, A., Ling, C., Ho, SY., y Zhu, CD. 2018. Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. *Syst Biol* 67: 830-846.
- Maddison, WP., Bodner, MR., y Needham, KM. 2008. Salticid spider phylogeny revisited, with the discovery of a large Australasian clade (Araneae: Salticidae). *Zootaxa* 1893, 49-64.
- Maddison, WP., Li, D., Bodner, M., Zhang, J., Xu, X., Liu, Q., y Liu, F. 2014. The deep phylogeny of jumping spiders (Araneae, Salticidae). *ZooKeys* 440: 57–87.
- Magalhaes, I., Brescovit, A. y Santos, A. 2017. Phylogeny of Sicariidae spiders (Araneae: Haplogynae), with a monograph on Neotropical *Sicarius*. *Zool J Linnean Soc.* 179: 767-864.
- Maretić, Z. 1987. Spider venoms and their effect. In *Ecophysiology of spiders*. Springer Berlin, Heidelberg. Pp. 142-159.
- Masiac, Y. 1996. *Las arañas*. España: Editorial De Vecchi.
- Mata-López, R., Velarde-Aguilar, MG., y León-Règagnon, V. 2018. Identificación de especies por medio del código de barras de la vida. En Mata López y cols. (Ed). *Sistemática molecular y bioinformática. Guía práctica*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 225-228.
- Mayden RL, Claridge MF., Dawah HA., y Wilson, MR. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem, *Species: The units of biodiversity*, London, Chapman and Hall. Pp. 381-424.
- Mayden RL. 1999. Consilience and a hierarchy of species concepts: Advances toward closure on the species puzzle, *J. Nematol.* 31: 95-116
- Mendoza, JI., y Francke, OF. 2018. Five new cave-dwelling species of *Hemirrhagus* Simon 1903 (Araneae, Theraphosidae, Theraphosinae), with notes on the generic distribution and novel morphological features. *Zootaxa* 4407: 451-482.

- Michalik, P., y Ramírez, MJ. 2014. Evolutionary morphology of the male reproductive system, spermatozoa and seminal fluid of spiders (Araneae, Arachnida) Current knowledge and future directions. *Arthropod Struct Dev* 43: 291–322.
- Millot, J. 1949. *Ordre des Aranéides (Araneae)*, In: Grasse, P., ed.: *Traité de Zoologie* Masson, Paris, 6: 589–743.
- Morgan, JAT., y Blair, D. 1998. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology* 116: 289-297.
- Morrone, JJ. 2001. *Sistemática, Biogeografía, Evolución los patrones de la Biodiversidad en espacio-tiempo*. UNAM. México, Ciudad de México.
- Moye de Alba, CE. *Picaduras y mordeduras*. En: Aguilar, CS. y cols. Eds. 1997. *Manual de Terapéutica Médica y Procedimientos de Urgencias*. México. McGraw Hill-Interamericana Pp. 2835.
- Nentwig, W., Pantini, P., y Vetter, RS. 2017. Distribution and medical aspects of *Loxosceles rufescens*, one of the most invasive spiders of the world (Araneae: Sicariidae). *Toxicon* 132: 19–28.
- Naseem, S., y Tahir, HM. 2018. Use of mitochondrial COI gene for the identification of family Salticidae and Lycosidae of spiders. *Mitochondrial DNA A* 29: 96-101.
- Newlands, G., y Atkinson, P. 1990. Behavioural and epidemiological considerations pertaining to necrotic araneism in southern Africa. *S Afr Med J* 77: 92-95.
- Oliveira, KC., Gonçalves de Andrade, RM., Piazza, RMF., Ferreira Jr, JMC., van der Berg, CW. y Tambourgi, DV. 2005. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* 45: 421-429
- Ortiz, D. y Francke, OF. 2016. Two DNA barcodes and morphology for multi-method species delimitation in *Bonnetina* tarantulas (Araneae: Theraphosidae). *Mol Phylogenet Evol* 101: 176–193.
- Padial, JM., Miralles, A., De la Riva, I., y Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Front Zool* 7: 1-16.
- Peña, C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Rev. Peru. Biol.* 18: 265-267.
- Pérez, MJL., y Montoya, J. 2012. *Sistema genético mitocondrial humano*. Monografías de la

Real Academia Nacional de Farmacia. España.

- Pérez-Ponce de León, G. 2018. Reconocimiento y delimitación de especies crípticas. En Mata López y cols. (Ed). Sistemática molecular y bioinformática. Guía práctica. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 171-185.
- Piacentini, LN., y Ramírez, MJ. 2019. Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Mol Phylogenet Evol.* 136: 227-240.
- Prendini, L. 2005. Comment on “Identifying spiders through DNA barcodes”. *Can J Zool* 83: 498–504.
- Planas, E, y Ribera, C. 2014. Uncovering overlooked island diversity: colonization and diversification of the medically important spider genus *Loxosceles* (Arachnida: Sicariidae) on the Canary Islands. *J. Biogeogr.* 41: 1255–1266.
- Planas, E. y Ribera, C. 2015. Description of six new species of *Loxosceles* (Araneae: Sicariidae) endemic to the Canary Islands and the utility of DNA barcoding for their fast and accurate identification. *Zool J Linnean Soc* 174: 47–73.
- Posada, D. y Buckley, TR. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 50: 580–601.
- Potter, MF. 2005. Brown recluse spider. University of Kentucky College of Agriculture, Department of Entomology, <http://www.edu/Agriculture/Entomology/entfacts/struct/ef631.htm>.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., y Achaz, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21: 1864-1877.
- Rambaut A, Drummond AJ., Xie D., Baele, G. y Suchard, MA. 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol.* doi:10.1093/sysbio/syy032.
- Ramos-Cerrillo, BM. 2012. Comparación bioquímica, inmunológica y toxicológica de los venenos de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Ramos-Cerrillo. B., Olvera, A., Odell, GV., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A. y Stock, R. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles*

- reclusa*. *Toxicon* 44: 507-514.
- Regier, JC., Shultz, JW., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, JW., y Cunningham, CW. 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463:1079-1083.
- Ríos, E., Ruiz, HM., y Castañeda, ST. 2009. Marcadores moleculares: una revolución en la Zoología. Obtenido de http://www.Revista.ciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf.
- Ribera C, Planas E 2009. A new species of *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) from Tunisia. *ZooKeys* 16: 217–225.
- Rivera-Quiroz, FA., Garcilazo-Cruz, U. y Álvarez-Padilla, F. 2016. Spider cyber diversity (Araneae: Araneomorphae) in an ecotouristic tropical forest fragment in Xilitla, México. *Rev Mex Biodivers* 87: 1023-1032.
- Rodríguez-Rodríguez, SE., Solís-Catalán, KP. y Valdez-Mondragón, A. 2015. Diversity and seasonal abundance of anthropogenic spiders (Arachnida: Araneae) in different urban zones of the city of Chilpancingo, Guerrero, Mexico. *Rev Mex Biodivers* 86: 962-971.
- Ronquist, F. y JP. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., y Reyes, A. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195-209.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol* 4: 406–425.
- Satler, J. D., Carstens, B. C., y Hedin, M. 2013. Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Aliatypus*). *Syst. Biol.* 62: 805-823.
- Sandidge, JS. 2003. Scavenging by brown recluse spiders. *Nature* 426:30-31.
- Sandidge, JS., y Hopwood, JL. 2005. Brown recluse spiders: a review of biology, life history and pest management. *Trans. Kans. Acad. Sci.* 108: 99-108.
- Sandidge, SJ. y Hopwood, J. 2009. Brown recluse spiders: A review of biology, life history and pest management. *Trans. Kans. Acad. Sci.* 108: 99-108.
- Sanocka, E. 1982. Eye regression in *Porrhoma moravicum* Mill. et Krat. (Aranei). *Zool. Pol.*

29: 13–21.

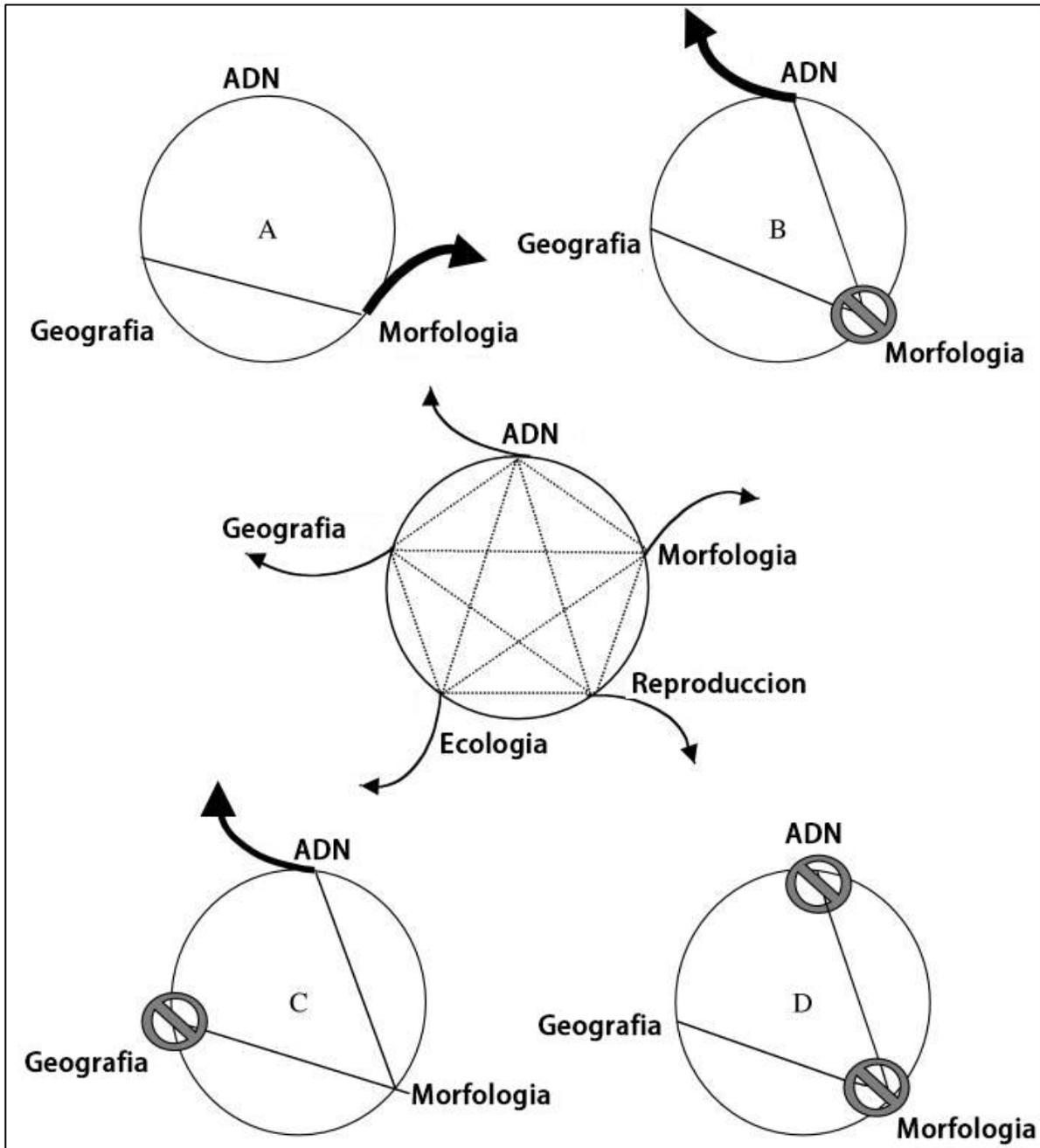
- Savolainen, V., Cowan, RS., Vogler, AP., Roderick, GK., y Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 360: 1805-1811.
- Schenone, HA. Rojas, H. Reyes, F. Villarroel, y Suarez, G. 1970. Prevalence of *Loxosceles laeta* in houses in Central Chile. *Am. J Trop Med Hyg* 19: 564-567.
- Schlick-Steiner, BC., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, RH., y Steiner, FM. 2007. Without morphology, cryptic species stay in taxonomic crypsis following discovery. *Trends Ecol Evol* 22: 391-392.
- Sharma, PP., Kaluziak, ST., Perez-Porro, AR., Gonzalez, VL., Hormiga, G., Wheeler, WC., y Giribet, G. 2014. Phylogenomic interrogation of Arachnida reveals systemic conflicts in phylogenetic signal. *Mol. Biol. Evol* 31: 2963-2984.
- Shultz, JW. 1990. Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics* 6: 1-38.
- Shultz, JW. 2007. A phylogenetic analysis of the arachnid orders based on morphological characters. *Zool J Linnean Soc* 150: 221-265.
- Smith, MA., Poyarkov Jr, NA., y Hebert, PD. 2008. DNA barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 235-246.
- Tambourgi, DV., Morgan, BP., de Andrade, RM., Magnoli, FC., y van den Berg, CW. 2000. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood* 95: 683-691.
- Tahami, MS., Zamani, A., Sadeghi, S. y Ribera, C. 2017. A new species of *Loxosceles* Heineken y Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) from Iranian caves. *Zootaxa* 4318: 377-387.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, RH., y Vogler, AP. 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature London*, 418: 479.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, RH., y Vogler, AP. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol* 18: 70-74.
- Téllez-Mazzocco, D. 2006. Delimitación de especies del género *Thalictrum* (Ranunculaceae) del centro de México con base en caracteres morfológicos y moleculares. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- Ubick, DP. Paquin, PE. Cushing y V. Roth (eds). 2005. Spiders of North America: an identification manual. American Arachnological Society, Keene, (New Hampshire), USA. 377p.
- Valdez-Mondragón, A. 2009. Revisión y análisis cladístico del género de arañas *Physocyclus* Simon, 1893 (Araneae: Pholcidae), con descripción de especies nuevas de México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Valdez-Mondragón, A. 2010. Revisión taxonómica del género de arañas *Physocyclus* Simon, 1893 (Araneae: Pholcidae), con la descripción de especies nuevas de México. *Rev Iber Aracnol* 18: 3-80.
- Valdez-Mondragón, A., y Francke, OF. 2015. Phylogeny of the spider genus *Ixchela* Huber, 2000 (Araneae: Pholcidae) based on morphological and molecular evidence (CO1 and 16S), with a hypothesized diversification in the Pleistocene. *Zool J Linnean Soc* 175, 20-58.
- Valdez-Mondragón, A., Cortez-Roldán, MR., Juárez-Sánchez, AR., Solís-Catalán, KP., y Navarro-Rodríguez, CI. 2018a. Arañas de Importancia Médica: Arañas violinistas del género *Loxosceles* en México, ¿qué sabemos acerca de su distribución y biología hasta ahora? *Boletín AMSA* 2: 14-24.
- Valdez-Mondragón, A., Cortez-Roldán, MR., Juárez-Sánchez, AR., y Solís-Catalán, KP. 2018b. A new species of *Loxosceles* Heineken y Lowe (Araneae, Sicariidae), with updated distribution records and biogeographical comments for the species from México, including a new record of *Loxosceles rufescens* (Dufour). *ZooKeys* 802: 1-39.
- Valdez-Mondragón, A., Navarro-Rodríguez, C. I., Solís-Catalán, K. P., Cortez-Roldán, M. R., y Juárez-Sánchez, A. R. (2019). Under an integrative taxonomic approach: the description of a new species of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) from Mexico City. *ZooKeys* 892: 93-133.
- Valencia, IL., Valle, FA., Cota, SL., y Hernández-Saavedra, NY. 2003. Marcadores moleculares para la identificación de la sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Velázquez, LPA., Martínez, MDCA., y Romero, AC. 2014. Extracción y purificación de ADN. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos.

- Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., y Rocha-Munive, MG (eds). Pp. 27-51
- Vetter, RS. y Barger, DK. 2002. An infestation of 2,055 brown recluse spiders (Araneae: Sicariidae) and no envenomations in a Kansas home: implications for bite diagnoses in nonendemic areas. *J. Med. Entomol.* 39: 948–951.
- Vetter, RS. 2008. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. *J. Arachnol.* 36: 150–163.
- Vetter, RS. 2015. *The Brown Recluse Spider*. Cornell University Press, Ithaca and London, Comstock Publishing Associates.
- Wang, B., Dunlop, JA., Selden, PA., Garwood, RJ., Shear, WA., Müller, P., y Lei, X. 2018. Cretaceous arachnid *Chimerarachne yingi* gen. et sp. nov. illuminates spider origins. *Nat. Ecol. Evol.* 2: 614–622.
- Wares, JP., y Cunningham, CW. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55: 2455-2469.
- Wheeler, WC., y Hayashi, CY. 1998. The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics* 14: 173-192.
- Wheeler, WC., Coddington, JA., Crowley, LM., Dimitrov, D., Goloboff, PA., Griswold, CE., Hormiga, G., Prendini, L., Ramírez, MJ., Sierwald, P., Almeida-Silva, L., Alvarez-Padilla, F., Arnedo, MA., Benavides Silva, LR., Benjamin, SP., Bond, JE., Grismado, CJ., Hasan, E., Hedin, M., Izquierdo, MA., Labarque, FM., Ledford, J., Lopardo, L., Maddison, WP., Miller, GA., Piacentini, LN., Platnick, NI., Polotow, D., Silva-Dávila, D., Scharff, N., Szűts, T., Ubick, D., Vink, CJ., Wood, HM. y Zhang, JX. 2017. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics* 33: 574-616.
- World Spider Catalog. 2019. The World Spider Catalog, versión 1.5. Disponible en: <http://www.wsc.nmbe.ch>. Consulta: 26 de octubre de 2019.
- Xu, X., Liu, F., Chen, J., Ono, H., Li, D. y Kuntner, M., 2015. A genus-level taxonomic review of primitively segmented spiders (Mesothelae, Liphistiidae). *ZooKeys* 488: 1-121.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., y Chen, S. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one* 5: e13102.

- Yao, Z., Dong, T., Zheng, G., Fu, J., y Li, S. 2016. High endemism at cave entrances: a case study of spiders of the genus *Uthina*. *Sci. Rep.* 6: 35757.
- Young, AR. y SJ. Pincus. 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotizing arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumma insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39: 391-400.
- Zamani, A., Mirshamsi, O., Savoji, A., y Shahi, M. 2014. Contribution to the distribution of spiders with significant medical importance (Araneae: *Loxosceles* and *Latrodectus*) in Iran, with a new record for the country. *Iran. J. Anim. Biosyst.* 10: 57-66.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., y Stamatakis, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29: 2869-2876.
- Zhou, X., Adamowicz, SJ., Jacobus, LM., DeWalt, E y Hebert, PDN. 2009. Toward a comprehensive barcode library for Arctic life Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Front. Zool.* 6: 30

Apéndice 3. Representación del círculo taxonómico, tomado y modificado de DeSalle y cols. 2005.



13. PUBLICACIONES

Título del artículo: “Under an integrative taxonomic approach: the description of a new species of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) from Mexico City”. Se describió una nueva especie del género *Loxosceles*: *L. tenochtitlan* con distribución en los estados de Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México, bajo un concepto de taxonomía integradora utilizando evidencia de morfología tradicional, morfología geométrica y lineal, evidencia molecular (CO1 e ITS2) y modelaje de nicho ecológico.

ZooKeys 892: 93–133 (2019)
doi: 10.3897/zookeys.892.39558
<http://zookeys.pensoft.net>

RESEARCH ARTICLE

 ZooKeys
A peer-reviewed open access journal
published for the International Biodiversity Science Society

Under an integrative taxonomic approach: the description of a new species of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) from Mexico City

Alejandro Valdez-Mondragón^{1,2}, Claudia I. Navarro-Rodríguez^{3,4},
Karen P. Solís-Catalán^{5,6}, Mayra R. Cortez-Roldán⁷, Alma R. Juárez-Sánchez⁸

1 CONACYT Research Fellow: Laboratory of Arachnology (LATLAX), Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), sede Tlaxcala, Ex-Fábrica San Manuel, San Miguel Conzá, C. P. 90640 Santa Cruz Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico **2** Laboratory of Arachnology (LATLAX), Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales (LBCTV), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), sede Tlaxcala, Mexico **3** Colección Nacional de Arácnidos (CNAN), Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Aparado Postal 04510, Coyocacán, Mexico City, Mexico **4** Posgrado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC), Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), Carretera Federal Tlaxcala-Puebla, Km. 1.5, C. P. 90062, Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

Corresponding author: Alejandro Valdez-Mondragón (lat_msc@unam.mx)

Academic editor: A. Pérez-González | Received 30 August 2019 | Accepted 4 October 2019 | Published 22 October 2019
<http://zoobank.org/E176337C-6F78-4462-8FD0-ACB727CD43E4>

Citation: Valdez-Mondragón A, Navarro-Rodríguez CI, Solís-Catalán KP, Cortez-Roldán MR, Juárez-Sánchez AR (2019) Under an integrative taxonomic approach: the description of a new species of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) from Mexico City. ZooKeys 892: 93–133. <https://doi.org/10.3897/zookeys.892.39558>

Abstract
A new species of the spider genus *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832, *Loxosceles tenochtitlan* Valdez-Mondragón & Navarro-Rodríguez, sp. nov., is described based on adult male and female specimens from the states of Mexico City, Estado de México and Tlaxcala. Integrative taxonomy including traditional morphology, geometric and lineal morphology, and molecules (DNA barcodes of cytochrome *c* oxidase subunit 1 (CO1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2)), were used as evidence to delimit the new species. Four methods were used for molecular analyses and species delimitation: 1) corrected *p*-distances under neighbor joining (NJ), 2) automatic barcode gap discovery (ABGD), 3) general mixed yule coalescent model (GMYC), and 4) poisson tree processes (bPTP). All molecular methods, traditional, geometric and lineal morphology were consistent in delimiting and recognizing the new species. *Loxosceles tenochtitlan* sp. nov. is closely related to *L. mixteca* based on molecular data. Although both species are morphologically similar, the average *p*-distance from CO1 data was 13.8% and 4.2% for ITS2 data. The molecular species

Copyright Alejandro Valdez-Mondragón et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

(Link: <https://doi.org/10.3897/zookeys.892.39558>)