



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

LA SELECCIÓN SEXUAL SOBRE EL CORTEJO
COMO POTENCIAL MOTOR DE ESPECIACIÓN Y
DIVERSIFICACIÓN EN *Pardosa sierra* Banks, 1989
(ARANEAE: LYCOSIDAE).

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

P r e s e n t a

Emiliano Méndez Salinas

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2013

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las horas del día del Mes de Septiembre del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"LA SELECCIÓN SEXUAL SOBRE EL CORTEJO COMO POTENCIAL MOTOR DE ESPECIACIÓN Y DIVERSIFICACIÓN EN *Pardosa sierra Banks*, 1989 (ARANEAE; LYCOSIDAE)"

Presentada por el alumno:

EMILIANO MÉNDEZ SALINAS

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **ECOLOGÍA DE ZONAS ÁRIDAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA DE LEÓN
DIRECTOR DE TESIS



DRA. MARÍA LUISA JIMÉNEZ JIMÉNEZ
CO-TUTOR



DR. ALEJANDRO MANUEL MAEDA MARTÍNEZ
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Francisco Javier García de León

Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México

Dra. María Luisa Jiménez Jiménez

Co-Tutora

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier García de León

Dra. María Luisa Jiménez Jiménez

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Dr. Francisco Javier García de León

Dra. María Luisa Jiménez Jiménez

Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez

Dr. Pedro Peña Garcillán (suplente)

RESUMEN

La península de Baja California ha sido un escenario geográfico ampliamente recurrido para realizar estudios filogeográficos, atendándose con particular interés el efecto de eventos vicariantes sobre los patrones actuales de estructuración genética y el proceso de especiación de diversos grupos biológicos, especialmente vertebrados. Sin embargo, no se han estudiado con igual interés, otras posibles explicaciones para estos patrones de diversificación biológica.

En el presente estudio se utilizó como modelo a la araña lobo *Pardosa sierra* y sus especies cercanamente emparentadas, *P. atromedia* y *P. sura*, para poner a prueba la hipótesis de que la selección sexual sobre el cortejo, dirige y mantiene la diversificación entre y dentro de estas especies. Para esto se obtuvieron muestras de *P. sierra* de 11 sitios y de un sitio de cada una de las otras dos especies; con este muestreo se plantearon los siguientes objetivos: 1) describir y comparar los cortejos de las tres especies; 2) determinar el grado y estructura de la diferenciación genética entre poblaciones de *P. sierra* y *P. atromedia* mediante marcadores microsatélites; 3) comparar espacial y temporalmente: a) los patrones filogenéticos de ADN mitocondrial reportados en la literatura para las tres especies, b) los patrones de variación genética actual obtenidos con los microsatélites para *P. sierra* y *P. atromedia*, c) los patrones de cortejo de las tres especies y d) los eventos vicariantes propuestos para varios taxa de distribución circundante al Golfo de California y 4) buscar evidencias conductuales y genéticas de hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia* y entre dos linajes mitocondriales dentro de *P. sierra*.

Se encontró que cada especie tiene un cortejo diferenciable por el tipo de movimientos del repertorio, y que dentro de *P. sierra* existen además dos patrones que varían significativamente en la frecuencia e intensidad de uso de los movimientos entre grupos de poblaciones. Se encontraron cinco poblaciones genéticamente homogéneas, una de *P. atromedia* y cuatro de *P. sierra*. Los patrones filogenético y de variación genética poblacional actual, en general, concuerdan entre sí pero no concuerdan con los patrones de cortejo. Los eventos vicariantes concuerdan relativamente bien con los patrones genéticos (filogenético y poblacional actual) y con los de cortejo. Además se encontraron evidencias genéticas de hibridación entre especies (*P. sierra* y *P. atromedia*); y evidencias genéticas y conductuales de hibridación entre los linajes mitocondriales en *P. sierra*. En general los resultados sugieren que, por sí solos, ni la selección sobre el cortejo, ni los eventos vicariantes, ofrecen una explicación satisfactoria de la diversificación genética entre las tres especies, y la existencia de una potencial zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia*, requiere ser confirmada porque aportaría información valiosa para identificar y ponderar los factores involucrados en la historia evolutiva de *P. sierra* y sus especies cercanas.

Palabras clave: *Pardosa sierra*, especiación, selección sexual, cortejo, vicarianza, hibridación.

ABSTRACT

The Baja California Peninsula has been a recurrent geographic setting for phylogeographic studies, which have mainly addressed the effect of past vicariant events on the present patterns of genetic structure and the speciation process of numerous biological groups, especially in vertebrates. However, other explanations for those patterns of biological diversification have not been addressed with the same interest.

The present study used the wolf spider *Pardosa sierra* along with its closely related species, *P. atromedia* and *P. sura*, as a model to test the hypothesis that sexual selection on male's courtship behavior drives and maintains the diversification among and within these species. To achieve this, specimens of *P. sierra* were obtained from 11 sampling sites, while the other two species were sampled each one, from one site. In order to test this hypothesis, the following objectives were proposed: 1) describe and compare the courtship behavior of the three species; 2) determine the amount and structure of genetic differentiation among populations of *P. sierra* and *P. atromedia* using microsatellite markers; 3) compare spatially and chronologically: a) the mitochondrial DNA phylogenetic patterns previously reported for the three species, b) the present genetic variation patterns obtained from microsatellite markers for *P. sierra* and *P. atromedia*, c) the courtship behavior patterns of the three species and d) the vicariant events proposed for various taxa which have distributions surrounding the Gulf of California and 4) search for genetic and behavioral evidence of hybridization between *P. sierra* and *P. atromedia* and between two mitochondrial lineages within *P. sierra*.

The findings of this study show that each species displays a particular courtship behavior discernible by the sort of movements that are included in each repertoire; furthermore, within *P. sierra* there are two courtship patterns that vary significantly in intensity and frequency of use of the movements among groups of populations. There are five genetically homogeneous populations, one of *P. atromedia* and four of *P. sierra*. There is broad concordance between the mitochondrial phylogenetic pattern with respect to the present population genetic variation pattern, but deep discordance between these two with respect to the courtship behavior pattern. There is relatively equal concordance between both genetic (phylogenetic and present population) and courtship behavior patterns with respect to proposed vicariant events. Additionally, genetic evidence was found for hybridization between species (*P. sierra* and *P. atromedia*) and between mitochondrial lineages within *P. sierra*, as well as behavioral evidence for the latter.

In general, these results suggest that, neither sexual selection on male's courtship nor vicariance, by their own offer a satisfying explanation for the genetic diversification of the three species. Moreover, they suggest the existence of a potential hybrid zone between *P. sierra* and *P. atromedia* that should be confirmed and analyzed to get valuable insight on the factors that have taken place in the evolutive history of *P. sierra* and its sister species.

Key words: *Pardosa sierra*, speciation, sexual selection, courtship behavior, vicariance, hybridization.

DEDICATORIA

A quienes han estudiado, estudian o estudiarán la evolución biológica, porque no es una tarea fácil, pero sin duda es de las más hermosas.

A los dos Fernandos más importantes de mi vida, porque los amo y para pedirles que tampoco dejen de perseverar jamás.

AGRADECIMIENTOS

Aunque debe presentarse a título personal, la culminación de este trabajo de tesis es en realidad el resultado del esfuerzo de muchas personas. Siento que, si llevar a cabo un proyecto de investigación y escribir una tesis son cosas complicadas, más aún lo es escribir la sección de agradecimientos, pues se cae en la inevitable condición de ser incapaz de mencionar y ponderar justamente a todas las personas que se debería, por insuficiencia, tanto de espacio, como de memoria. Al menos es mi deseo, que todo aquel que lea este trabajo y recuerde haber participado directa o indirectamente en él, lo sienta también como suyo y sepa que le estoy muy agradecido.

Agradezco al CIBNOR como institución receptora de mis estudios de maestría y al CONACyT por las becas otorgadas bajo el número de registro CVU 358447, durante la maestría y durante la estancia de investigación. Al proyecto “Filogeografía Comparada en el Noroeste de México” y al laboratorio “EVOLAB” de la Universidad de California en Berkeley por la co-financiación de este estudio.

Agradezco al Dr. Francisco Javier García de León por aceptarme como parte de su equipo de trabajo y ofrecerme un tema de tesis en el tema que me apasiona, y por dirigir este trabajo y cumplir el rol principal en mi proceso de formación académica.

Agradezco a la Dra. Rosemary G. Gillespie y el Dr. George K. Roderick por recibirme con brazos y corazón abierto en su grupo de trabajo y su laboratorio durante mi estancia en la Universidad de California.

Agradezco a la Dra. María Luisa Jiménez Jiménez por aceptar formar parte de mi Comité Tutorial, por su rol formativo tanto en el aula como fuera de ella y por contagiarme su admiración por el maravilloso mundo de las arañas.

También agradezco al Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez por aceptar formar parte de mi Comité Tutorial, por su siempre oportuna invitación y fomento a la lectura y la reflexión y por sus retroalimentaciones tanto en el aula como fuera de ella.

Agradezco a la Dra. María del Carmen Blázquez Moreno y el Dr. Eduardo Romero Vivas, que a pesar de no formar parte de mi Comité Tutorial, participaron con enorme entusiasmo en esta investigación y su colaboración y ayuda fueron absolutamente imprescindibles para sacar adelante este trabajo.

Agradezco al Dr. Pedro Peña Garcillán por formar parte del Jurado de Examen y por su disposición a ayudarme en todo momento con un excelente trato y una gran empatía pero sin perder nunca el rigor científico.

Agradezco al Dr. Miguel Mauricio Correa Martínez por todas las enseñanzas prácticas y teóricas sobre aracnología y biología molecular, que fueron los pilares sobre los que se construyó este trabajo de tesis.

Agradezco al Dr. José Andrés Alvarado Castro por su excelente orientación sobre literatura y métodos de mantenimiento de arañas en cautiverio.

Agradezco a todos los que colaboraron en la realización o planeación de las recolectas y/o en el mantenimiento de las arañas en cautiverio, Dr. Francisco J. García de León, Dr. Miguel Correa, Dra. Carmen Blázquez, Dra. Rosemary Gillespie, Dr. Marshall Hedin, Dr. Gil Rosenthal, Dr. Peter Oboyski, Dr. Peter Croucher, Dra. Verónica Castañeda, Adrián Lozano, Braulio León, Geroge Philips, David Vega, Andrés Aguiar, Ana Bricia

Guzmán, Marisol Lares, Marcela Baldominos, Miguel Matus, etc. Estoy seguro de que estoy olvidando a muchos y les ruego me disculpen la involuntaria omisión.

Agradezco a mis compañeros de los laboratorios de Genética para la Conservación del CIBNOR, Saraí, Carina, Tania, Cristina, Claudia, Carolina, Paulina, Paulina, Elfilia, Tzitziqui, Daniela, Daniela, Ilse, Fernanda, Tania, Miguel, Fausto, Rubén, Alain, Adrián, David, Andrés, Quinatzin y de EVOLAB de UC Berkeley, Lauren, Athena, Natalia, Misha, Jennifer, Alexia, Kristina, Susan, Leslie, Pete, Darko, Michael, Andy, Brad, Pete, Guillaume, Matt, Ian, por su inestimable ayuda y su amistad. Aquí también me disculpo por cualquier omisión involuntaria.

A todos mis compañeros del posgrado e investigadores del CIBNOR que nunca escatimaron en sonrisas, pláticas, consejos, compañía y amistad.

Agradezco a todo el personal del CIBNOR, en especial de la Dirección de Posgrado, del Laboratorio de Cómputo, del Departamento Jurídico, del Taller de Maquinados y a los guardias de seguridad, por su eternamente amable atención, por su disposición, su accesibilidad y su eficiencia.

Agradezco a la Dra. Libertad Leal Lozano y al Dr. Jesús Ángel de León González por estimularme a contactar al Dr. Francisco Javier García de León y realizar la maestría bajo su tutela.

Agradezco a la Dra. Libertad Leal Lozano y Juan Luis Cifuentes Lemus y al Dr. Marco Antonio Escalante Cavazos que durante mi maestría y desde siempre, han velado por mi bienestar y me éxito profesional, estimándome como a un hijo.

Agradezco a mis compañeros de carrera, Elí García, Anwar Medina, David Borré, Alejandro González, Raúl González, Nelson Arreaga, Fernando Solís, Víctor Álvarez, Daniela Mendoza, Yadira Rojas, Mauricio Martínez, Cayetano Villarreal y muchos más que siempre se han preocupado por mí y estuvieron apoyando moralmente para que termine este trabajo.

Agradezco a los habitantes de la ciudad de La Paz, nativos y adoptados, por recibirme y hacerme sentir como en casa durante los casi tres años que viví en esta ciudad, especialmente a Norma, Paco, Tania y Arturo y Milton que me recibieron en sus casas en diferentes etapas en que tuve necesidad, y a Adrián con quien compartí casa por largo tiempo. Al Dr. Peter J. P. Croucher y su familia, al Dr. Juan Reardon y su familia y a Rebeca García Sandoval por adoptarme durante los más de seis meses de estancia en California.

El agradecimiento más importante y más profundo es para mi familia y mi novia, por su ayuda, su amor y su apoyo incondicionales. Además de ayuda directa en la tesis y el trabajo detrás de ella, cada uno, a su modo, significaron contención durante los momentos más difíciles y más oscuros así como inspiración para dar lo mejor de mí.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	4
3	JUSTIFICACIÓN	15
4	OBJETIVOS	17
4.1	Objetivo general.....	17
4.2	Objetivos particulares	17
5	HIPÓTESIS	18
6	MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1	Área de estudio y trabajo de campo.....	19
6.2	Conducta.....	23
6.2.1	Mantenimiento de ejemplares en cautiverio.....	23
6.2.2	Descripción del cortejo de <i>P. sierra</i> , <i>P. atromedia</i> y <i>P. sura</i>	24
6.2.2.1	Experimentos de cortejo	24
6.2.2.2	Análisis de datos de cortejo	27
6.3	Genética poblacional.....	28
6.3.1	Trabajo de laboratorio	28
6.3.2	Genotipificación	29
6.3.3	Calibración de loci microsatelites y medidas de diversidad genética por sitio de muestreo.....	31
6.3.4	Determinación del número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional.....	33
6.3.4.1	Análisis factorial de correspondencia.....	33
6.3.4.2	Análisis discriminante de componentes principales.....	34
6.3.4.3	Estadísticos F de Wright.....	34
6.3.4.4	Análisis de asignación a grupos por probabilidades bayesianas.....	35
6.3.4.5	Análisis de varianza molecular	36
6.3.4.6	Construcción de dendrograma.....	38
6.3.4.7	Aislamiento por distancia	39

6.4	Comparación entre los patrones de cortejo, los patrones filogenéticos mitocondriales, la estructuración genética actual de las poblaciones de <i>P. sierra</i> y los eventos vicariantes propuestos en la literatura.....	40
6.5	Evidencias de hibridación	42
6.5.1	Evidencias conductuales	42
6.5.2	Evidencias genéticas.....	43
RESULTADOS		45
6.6	Trabajo de campo y mantenimiento de ejemplares en cautiverio.....	45
6.7	Descripción del cortejo de <i>P. sierra</i>, <i>P. atromedia</i> y <i>P. sura</i>	45
6.7.1	Elementos básicos de los cortejos	47
6.7.2	Desarrollo y patrones de los cortejos.....	50
6.8	Calibración de loci microsatélites.....	56
6.8.1	Validación de la base de datos	56
6.8.2	Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci y por sitio de muestreo.....	57
6.8.3	Desequilibrio de Hardy-Weinberg y alelos nulos por sitio de muestreo	58
6.8.4	Prueba de neutralidad de los loci microsatélites	60
6.9	Diversidad genética al interior de los sitios de muestreo.....	61
6.10	Número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional.....	65
6.10.1	Análisis Factorial de Correspondencia	65
6.10.2	Análisis discriminante de componentes principales	67
6.10.3	Estadísticos F de Wright	69
6.10.4	Análisis de Varianza Molecular	70
6.10.5	Análisis de asignación por probabilidades bayesianas.....	72
6.10.6	Construcción de dendrograma	76
6.10.7	Aislamiento por distancia.....	77
6.11	Concordancias y discordancias entre patrones de cortejo y genéticos y eventos vicariantes.....	78
6.12	Evidencias de hibridación	83
6.12.1	Hibridación entre <i>P. sierra</i> y <i>P. atromedia</i>.....	83
6.12.2	Hibridación entre los linajes mitocondriales Californiano y Peninsular, dentro de <i>P. sierra</i>.	85
7	DISCUSIÓN.....	88
7.1	Comportamientos de cortejo.....	88

7.2	Calibración de los loci microsatélites	93
7.3	Diversidad genética entre sitios de muestreo, número de poblaciones y estructura genética poblacional.....	97
7.4	Número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional.....	98
7.5	Concordancias y discordancias entre patrones de cortejo y genéticos y eventos vicariantes.....	105
7.6	Evidencias de hibridación	118
7.6.1	Hibridación interespecífica	118
7.6.1.1	Evidencias conductuales	118
7.6.1.2	Evidencias genéticas	120
7.6.2	Hibridación intraespecífica	122
7.6.2.1	Evidencias conductuales	122
7.6.2.2	Evidencias genéticas	125
8	CONCLUSIONES	128
9	RECOMENDACIONES	130
10	LITERATURA CITADA.....	132
11	ANEXOS.....	150

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sitios de muestreo de *Pardosa sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* con acercamiento en la zona de frontera entre el estado de Baja California, México y California, E.U.A. El nombre y localización de cada sitio se explican en la Tabla I.....20
- Figura 2. Resultado de la prueba de neutralidad para siete loci microsatélites utilizados para genotipificar sitios de muestreo de *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. El análisis se realizó en el programa LOSITAN. En el área gris se ubican los loci candidatos a ser neutrales, mientras que en las áreas roja y amarilla se ubican los loci candidatos a estar bajo selección, positiva y balanceadora, respectivamente.60
- Figura 3. Medidas de diversidad genética por sitio de muestreo para siete loci microsatélites en *P. sierra* en la península de Baja California y *P. atromedia* en California, E.U.A. Se muestran los promedios de todos los loci por sitio de muestreo. Línea gruesa con rombos = número de individuos, línea negra con cuadros = número de alelos, línea intermitente con círculos = riqueza alélica, línea gris con triángulos = alelos efectivos. Para los acrónimos referirse a la Tabla 1.....64
- Figura 4. Análisis factorial de correspondencia realizado con las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites para *P. sierra* y *P. atromedia* en la península de Baja California y California, E.U.A. Cada punto representa un individuo proveniente de: NOV = verde oscuro, ENS1 = verde claro, ENS2 = amarillo, ENS3 = anaranjado, ENS4 = marrón, TCT = rojo, SCA1 = morado, SCA2 = vino, CCA = azul añil. A. Se grafica el eje 1 contra el eje 2. B. Se grafica el eje 1 contra el eje 3.66
- Figura 5. Análisis discriminante de componentes principales realizado con las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites. A y B nueve sitios de muestreo incluyendo *P. sierra* y *P. atromedia*, ejes 1 y 2 y 1 y 3 respectivamente; C y D. ocho sitios de muestreo incluyendo solo a *P. sierra*, ejes 1 y 2 y 1 y 3 respectivamente; E y F. ocho sitios de muestreo condensados en cuatro grupos, NOV (1 sitio), ENS (4 sitios), TCT (1 sitio) y SCA (2 sitios), ejes 1 y 2 y 1 y 3 respectivamente.....68
- Figura 6. Resultados del análisis de varianza molecular, para cada modelo, construídos a partir de las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites en *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. En gris claro se muestran los porcentajes de varianza entre individuos dentro de los sitios de muestreo; en gris oscuro, entre sitios dentro de grupos; y en negro, entre grupos. Los asteriscos denotan significancia estadística. A. Análisis realizados en la modalidad nueve sitios,

incluyendo *P. sierra* y *P. atromedia*. B. Análisis realizados en la modalidad 8 sitios, incluyendo sólo *P. sierra*. 71

Figura 7. Resultados del análisis de asignación por probabilidades bayesianas en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007), utilizando siete loci microsatélites para nueve sitios de muestreo de *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. A. Diagrama en el que cada barra representa un individuo y cada color representa la proporción del genoma que corresponde al grupo definido por NOV (en verde), TCT (en rojo) o CCA (en azul). B. Número de grupos genéticamente homogéneos inferidos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud (Evanno *et al.*, 2005). 73

Figura 8. Resultados del análisis de asignación por probabilidades bayesianas en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007) utilizando siete loci microsatélites para ocho sitios de muestreo de *P. sierra* de la península de Baja California y California, E.U.A. A. Diagrama en el que cada barra representa un individuo y cada color representa la proporción del genoma que corresponde al grupo definido por NOV (en verde), ENS (en amarillo), TCT (en rojo) o SCA (en vino). B. Número de grupos genéticamente homogéneos inferidos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud (Evanno *et al.*, 2005). 75

Figura 9. Dendrograma reconstruido mediante el algoritmo del vecino más cercano basado en distancias de la cuerda D_{CSE} de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), construidas a partir de frecuencias alélicas de siete loci microsatélites de *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. En cada nodo se muestran los valores de soporte obtenidos con un remuestreo de 10000 iteraciones... 76

Figura 10. Mapa que representa el patrón de concordancias entre la filogenia mitocondrial propuesta por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), y los datos de genética poblacional y de conducta generados en el presente estudio para cinco poblaciones: Centro de California (CCA), El Novillo/La Paz (NOV, LPZ), Ensenada (ENS1-5), Tecate (TCT), Sur de California (SCA1-3) y Monterrey (MTY). Los anillos grandes representan la filogenia basada en ADN mitocondrial para especies (azul = *P. atromedia*; gris = *P. sura*; verde = *P. sierra*) y linajes (verde = linaje Peninsular; vino = linaje Californiano), datos obtenidos de Correa-Ramírez *et al.* (en preparación). Los gráficos de pastel representan las proporciones de los coeficientes de membresía a grupos según los análisis realizados en STRUCTURE con base en frecuencias alélicas de siete loci microsatélites (relaciones color-grupo definido por: azul oscuro = CCA; verde = NOV; amarillo = ENS; rojo = TCT; vino = SCA). Los gráficos de barra representan las frecuencias relativas de movimientos de cortejo (azul oscuro = movimiento tipo VI; gris = movimiento tipo V; azul claro = movimiento tipo VII; verde = movimientos tipo I, II, III y IV); en el caso de *P. sierra* también se muestran barras con las frecuencias relativas de los movimientos III y IV. Las líneas representan eventos vicariantes con grosores proporcionales a la antigüedad del evento, del más antiguo al más reciente, formación del Golfo de California = FGC (hace 12-5 ma),

Formación Imperial = FI (10-6 ma), Formación Bouse = FB (6-5.3 ma), Canal Transpeninsular de la Región del Cabo = CTC (3 ma), Canal Transpeninsular del Vizcaíno = CTV (1.5 ma). Ver datación según autores en la Tabla XI..... 82

Figura 11. Diagrama de STRUCTURE resultante del análisis de asignación utilizando nueve sitios de muestreo de *P. sierra* y *P. atromedia*. En color azul se muestra la proporción del genoma de cada individuo que proviene del grupo definido por CCA, es decir *P. atromedia*. Dos individuos en SCA1, dos en SCA2, uno en NOV y uno en ENS2 aparecen señalados, tienen suficiente proporción de su genoma proveniente de *P. atromedia* para considerarlos como híbridos inter específicos. 85

Figura 12. Clina en la composición genómica de individuos de *P. sierra* muestreados en ocho sitios de la península de Baja California y California, E.U.A. y genotipificados con siete loci microsatélites. Se grafica la distancia en kilómetros hacia un punto central entre los sitios más extremos, contra la proporción del genoma que proviene del grupo definido por SCA, es decir el linaje mitocondrial de California. NOV se representa en color verde, el conjunto de sitios de Ensenada (ENS), en amarillo; TCT, en rojo y los dos sitios del sur de California (SCA) en vino. 87

LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Información de los muestreos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*. Se muestran los acrónimos de cada sitio de muestreo, nombre de la localidad, ubicación, tipo de vegetación, altitud y coordenadas geográficas, así como fechas de recolecta, condiciones ambientales durante la misma y cantidad y especie de los ejemplares recolectados. NL = Nuevo León, BCS = Baja California Sur, BC = Baja California, CA = California, MEX = México, EUA = Estados Unidos de América, HR = humedad relativa, T = temperatura, NP = número de individuos recolectados preservados para análisis genéticos, NV = número de individuos recolectados vivos para análisis de comportamiento reproductivo. Las clasificaciones de la vegetación son de acuerdo a: ¹ Rzedowski (2006), ² González-Abraham *et al.* (2010) y ³ Ornduff *et al.* (2003).21
- Tabla II. Secuencias de cebadores y condiciones de las reacciones en cadena de la polimerasa en ejemplares de *P. sierra* y *P. atromedia* provenientes de nueve sitios de muestreo, utilizando ocho loci microsátélites desarrollados por Correa-Ramírez *et al.* (2010a) F = cebador directo, R = cebador inverso, TA = Temperatura de alineamiento en grados Celsius, [Buffer] = concentración del amortiguador, [MgCl₂] = concentración miliMolar final de cloruro de magnesio, [Ceb] = concentración microMolar final de cada cebador, [Taq] = concentración final de enzima ADN *Taq* polimerasa en unidades por reacción.31
- Tabla III. Experimentos de apareamiento y cortejo de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* ordenados cronológicamente. TE = Tipo de emparejamiento (IN =Intralinaje, L = Interlinaje largo, C = Interlinaje corto, M = Machos solos estimulados con feromonas de la hembra indicada pero sin su presencia física), ♀ y ♂ hembra y macho utilizados con sitio de origen entre paréntesis. C = presentó cortejo, A = presentó apareamiento. *Individuos vírgenes †No se utilizó la hembra, sólo sus feromonas.46
- Tabla IV. Elementos y patrones de comportamiento desplegados por machos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*. Referirse al texto de resultados para ver descripciones. N(Exp) = Número de experimentos realizados, N (Ind) = Número de machos utilizados. PBC = Linaje de la península de Baja California, C = Linaje de California, E.U.A. De acuerdo con los linajes mitocondriales propuestos por Correa *et al.* (en preparación).53
- Tabla V. Pruebas de estadística no paramétrica U de Mann-Whitney para diferenciar cortejos dentro de *P. sierra*, entre patrones (descritos en el texto) y entre los linajes mitocondriales de California, E.U.A. (C) y de la península de Baja California (PBC) considerando pseudoréplicas condensadas y sin condensar. “N” = número de réplicas. Como resultados de las pruebas U de Mann-Whitney se indican “Límites Inf - Sup” = intervalos de valores críticos de acuerdo a los tamaños de muestra, “U_A” = valores del estadístico U y “P” = valores de probabilidad. Valor de significancia después de la corrección de Bonferroni P = 0.0155

- Tabla VI. Valores de probabilidad de la prueba de desequilibrio gamético por pares de loci microsatélites, por sitio de muestreo y global en *P. atromedia* y *P. sierra* de California y la península de Baja California. * y en rojo, significativos después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.000265$).....57
- Tabla VII. Frecuencias de alelos nulos por sitio de muestreo, por locus y promedios estimados en el programa FREENA para *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. †Combinaciones de sitio de muestreo y locus que podrían presentar alelos nulos según el programa MICRO-CHECKER.....59
- Tabla VIII Medidas de diversidad genética estimadas por locus microsatélite, por sitio de muestreo y promedios para *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. SM = Sitio de muestreo, Param. = Parámetro, Prom = Promedio, N = Número de individuos, Na = Número de alelos, Ne = Alelos efectivos, R = Riqueza alélica, Ho = Heterocigosidad observada, He = Heterocigosidad esperada no sesgada, F = Índice de endogamia. *Desviado significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg después del ajuste de Bonferroni ($P < 0.0008$).....62
- Tabla IX. Valores de F_{ST} por pares de sitios de muestreo estimados a partir de las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites para *P. sierra* y *P. atromedia* en la península de Baja California y California, E.U.A. Bajo la diagonal se muestran los valores de F_{ST} . En rojo se resaltan los valores más altos, entre 0.19 y 0.28; en amarillo, entre 0.09 y 0.14; en verde, entre 0.05 y 0.07; y los inferiores a 0.05 aparecen en blanco. Los asteriscos denotan significancia estadística. Sobre la diagonal se muestran los valores de probabilidad correspondientes. Significancia estadística después de la corrección de Bonferroni $P=0.0014$69
- Tabla X. Pruebas de Mantel de aislamiento por distancia para *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. Se muestran los valores de correlación entre las matrices de distancias genéticas y el logaritmo de las distancias geográficas. Los valores de probabilidad corregida corresponden a un error de 0.05% ajustados con la corrección de Bonferroni de acuerdo a la cantidad de sitios analizados.77
- Tabla XI. Cuadro comparativo de las discontinuidades genéticas (mitocondriales y nucleares) y de comportamiento entre *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* y dentro de *P. sierra*, y los posibles eventos vicariantes que los explican. Precediendo a cada valor de discontinuidad, se indica entre corchetes su respectivo valor jerárquico. ¹ Los tiempos estimados de divergencia de ADN mitocondrial se obtuvieron de Correa-Ramírez *et al.* (en preparación). ^{2 y 3} Las dataciones aproximadas de los eventos vicariantes se obtuvieron de ² Grismer (1994), Riddle *et al.* (2000c), y/o Murphy y Aguirre-León (2002) y ³ Wood *et al.* (2008). †Tiempos estimados de divergencia no específicos a los sitios indicados, sino a todas las poblaciones del linaje Peninsular de *P. sierra* (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación).....81

Tabla XII Frecuencias alélicas de los alelos casi diagnósticos entre <i>P. sierra</i> y <i>P. atromedia</i> . Cumplen la condición de estar presentes en proporción relativamente alta en CCA, relativamente baja en NOV e intermedia en los sitios geográficamente intermedios.	83
---	----

1 INTRODUCCIÓN

La complejidad del mundo viviente está definida en términos de número de especies, ésta es pues la métrica para desarrollar estrategias de conservación y resaltar zonas de riesgo sobre la pérdida de diversidad biológica. Pero para desarrollar estas estrategias de manera oportuna se requiere adoptar una perspectiva evolutiva, que reconozca que las especies, no sólo son números y elementos de sistemas de clasificaciones fijas, sino entidades producto y sujeto de procesos evolutivos continuos y extendidos en tiempo y espacio.

El conocimiento que tenemos de la mayoría de estos procesos es parcial, por lo tanto, son temas de estudio que aún ofrecen mucho por descubrir, especialmente si se tiene en consideración la información que las técnicas de biología molecular ponen cada vez más al alcance. Como consecuencia directa de este desarrollo ha surgido la filogeografía, ubicada allí donde se traslapan diversas disciplinas microevolutivas y macroevolutivas. Esta rama del conocimiento tiene por objeto estudiar los principios y procesos que determinan la distribución geográfica de linajes genealógicos integrando información de genética molecular, genética poblacional, etología, demografía, biología filogenética, paleontología, geología y geografía histórica (Avice, 2000).

Por otro lado, debido a su peculiar conformación y a la diversidad de eventos geológicos que la han afectado a lo largo de su historia, la península de Baja California ha sido un escenario geográfico ampliamente recurrido para realizar estudios filogeográficos, atendándose con particular interés el efecto de eventos vicariantes y cómo estos han moldeado los patrones actuales de estructuración genética e influido en el proceso de especiación (Grismer, 2000; Riddle *et al.*, 2000c).

En un esfuerzo conjunto entre el Laboratorio de Genética para la Conservación y el Laboratorio de Aracnología del CIBNOR, se inició hace cinco años un estudio filogeográfico sobre *Pardosa sierra* Banks, 1898, una especie de araña lobo fácilmente asequible por su amplia distribución y abundancia, que habita casi exclusivamente en la península de Baja California (Correa-Ramírez *et al.*, 2010b). El descubrimiento de que otras especies habían sido sinonimizadas sin fundamento, bajo el nombre de *P. sierra*, y que las poblaciones de esta especie están genéticamente estructuradas a pesar de los altos

niveles de migración, llevaron no sólo a demostrar la necesidad de continuar la investigación, sino a reforzar la visión de que la península de Baja California representa un excelente laboratorio biológico para el estudio de la biogeografía histórica y comparada y a proponer la extensión de los estudios a otros taxa y nuevas posibles explicaciones a la diversificación, dando origen conceptual al Proyecto “Filogeografía Comparada en el Noroeste de México” (García de León, com. personal).

Si bien la vicarianza y la dispersión suelen ser los fenómenos históricos predilectos para ponderarse en estudios filogeográficos (Avice, 2000) y en particular para la región Noroeste de México (Grismer, 2000; Riddle *et al.*, 2000c), es igualmente interesante considerar explicaciones alternativas para los patrones observados de la diversidad genética y distribución de genealogías, como por ejemplo, selección sexual. En este sentido, *P. sierra* posee características excepcionales como modelo para el estudio simultáneo del papel de eventos vicariantes y selección mediante factores etológicos. Los primeros, porque su distribución geográfica y su asociación a las orillas de oasis, arroyos y otros cuerpos de agua en teoría, la hacen ajustarse al modelo poblacional discreto y por lo tanto, se esperaría que presentara una marcada estructuración genética (Correa-Ramírez, 2010); y porque, como otras arañas, presenta rituales de cortejo estereotipados antes de la cópula que permiten estudiar la relación existente entre ciertos elementos del comportamiento reproductivo, con el proceso de especiación y poner a prueba hipótesis sobre selección sexual y aislamiento reproductivo precopulatorio (Panhuis *et al.*, 2001; Verzijden *et al.*, 2005; Ritchie, 2007).

Además, los estudios previos sobre esta especie permiten tener un amplio marco de referencia porque se conocen los grados de diferenciación genética a diferentes escalas temporales, desde la estructura poblacional actual, pasando por linajes divergentes dentro de la misma especie y hasta la más profunda, a nivel de diferentes especies (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación), lo que permite comparar la influencia de los diferentes factores, vicariantes y etológicos en diferentes fases de los procesos de especiación.

De hecho Ritchie (2007) sugiere que los estudios filogeográficos, como el aquí planteado, ofrecen una escala más apropiada para detectar la influencia de la selección sexual en la diferenciación evolutiva, en lugar de las aproximaciones que tradicionalmente

se han utilizado, los basados en métodos comparativos entre grupos en los que se presume ha habido explosiones de especiación.

La estructura de este trabajo se basa en la propuesta de principios de concordancia genealógica (Avice y Ball, 1990) según la cual, en organismos de reproducción sexual, las agrupaciones filogenéticas basadas en diferentes rasgos genéticos sólo concuerdan cuando actúa una fuerza evolutiva de gran magnitud (tal como barreras intrínsecas de aislamiento reproductivo o eventos vicariantes) que les da a todas una conformación coincidente (Avice, 2004). Este sería el modelo nulo, contra el que se compararían las concordancias y discordancias observadas entre la información disponible sobre la filogenia mitocondrial de *P. sierra* (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación), y la información generada en este trabajo, tanto sobre la estructura genética poblacional con base en loci microsatélites, como de los patrones de comportamiento reproductivo. Integrando esta información, se buscará responder interrogantes como: ¿Existe concordancia entre la información genealógica proveniente de ADN mitocondrial, loci microsatélites y patrones conductuales? Aparte de la vicarianza, ¿qué otros fenómenos podrían explicar los patrones de especiación observados en *P. sierra* y dos especies cercanamente emparentadas, *P. atromedia* y *P. sura*? ¿Qué papel ha jugado la selección sexual sobre el comportamiento reproductivo en los procesos de especiación de estas especies? ¿Existe hibridación inter-específica entre ellas?

Esta última pregunta es de particular interés, porque las zonas híbridas proveen un cúmulo de información sobre los posibles estados y grados de divergencia entre poblaciones que están en fases tempranas de especiación, así como sobre la ecología, biología e historia evolutiva de las especies bajo estudio (Harrison, 1993). El descubrimiento de una zona híbrida permitiría estudiar desde otro enfoque el papel del cortejo y otros factores susceptibles a la selección natural y sexual y profundizar en el entendimiento del devenir evolutivo de estas arañas.

2 ANTECEDENTES

Los estudios recientes de biogeografía histórica que se han llevado a cabo en la península se han enfocado en explicar los actuales patrones de diversidad genética como consecuencia de la historia geológica, particularmente de los eventos vicariantes relacionados con la formación del Golfo de California y la conformación de la península de Baja California durante el Mioceno y el Plioceno, y de las fluctuaciones climáticas de las glaciaciones del Pleistoceno y la desertificación del Holoceno.

Murphy (1983), seguido de Grismer (1994) fueron de los primeros en señalar la importancia de los eventos vicariantes sobre la biota de la región, relacionando la distribución actual de especies de reptiles desérticos de la península de Baja California, en el Noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos, con la existencia de eventos vicariantes asociados a la formación y transformaciones de la península de Baja California durante el Plioceno y el Mioceno. En estos primeros estudios destacaban como eventos vicariantes la formación del Golfo de California o la separación de la península de Baja California, migración de la Región del Cabo desde su desprendimiento de la costa de lo que hoy es Nayarit, hasta unirse a la península, las Transgresiones Norteñas del Golfo de California y la Formación de un canal Inter-Peninsular que volvió a separar a la Región del Cabo del resto de la península.

La siguiente generación de estudios pueden considerarse filogeográficos, pues incorporaron la utilización de marcadores moleculares, particularmente de genes mitocondriales, que permitieron alcanzar un nuevo nivel de resolución en la evaluación de las relaciones filogenéticas entre poblaciones y descubrir gran cantidad de diversidad críptica. Uno de estos estudios fue el de Upton y Murphy (1997), que tuvo la particularidad de proponer un nuevo evento vicariante al repertorio ya existente, el canal interpeninsular del Vizcaíno. Entre otros trabajos destacan, Riddle *et al.* (2000a, 2000b, 2000c), Álvarez-Castañeda y Patton (2004), y Zink y Blackwell (1998) y Zink *et al.* (1997, 2000, 2001), quienes extendieron los estudios a otros taxa como mamíferos y aves respectivamente, robusteciendo con la nueva información, las evidencias sobre la influencia de todos estos eventos vicariantes en la historia biogeográfica de la península.

Otros estudios de filogeografía más recientes y enfocados en especies de otros taxa como arañas (Crews y Hedin, 2006), moscas (Hurtado *et al.*, 2004; Pfeiler *et al.*, 2007) o plantas (Nason *et al.*, 2002) entre otros, o de taxa ya ampliamente estudiados como reptiles (Mulcahy y Macey, 2009), aunque no han dejado de obtener evidencia sobre los efectos de los eventos vicariantes, han complementado también con otras aportaciones como incorporar nuevos factores en sus modelos explicativos, por ejemplo la existencia de zonas de “refugio” donde la flora y fauna pudieron permanecer durante los períodos glaciales, los efectos de la dispersión o de las relaciones huésped/hospedero. También han señalado la importancia de ser más rigurosos a la hora de considerar las evidencias geológicas que soportan las propuestas de eventos vicariantes y cómo interpretarlas en el contexto filogeográfico (Crews y Hedin, 2006; Lindell *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2008). Incluso existe un estudio donde Queiroz y Lawson (2008) propusieron la distribución de la culebra *Thamnophis validus* (Kennicott, 1860) como el resultado de la dispersión reciente a través del Golfo de California y no de los movimientos tectónicos como se consideraba previo a este trabajo.

Por su parte el género *Pardosa* Koch, 1874, es uno de los cinco género de arañas más numerosos del mundo, con más de 530 especies que ocurren en todos los continentes. Se caracteriza porque la región cefálica del prosoma es relativamente más alta que en otros licósidos y los lados del rostro son casi verticales. En los gonopodios (órgano reproductor de los machos), la apófisis media es gruesa y bien esclerizada, el émbolo es una espina larga y curvada, mientras que el epiginio (órgano sexual femenino) tiene una estructura con forma de T invertida (Vogel, 2004). Las especies de *Pardosa* de Norteamérica se clasifican en 15 grupos de especies definidos por características de los órganos reproductores, especialmente de los pedipalpos (gonopodios) de los machos.

Pardosa sierra, *P. atromedia* Banks, 1904 y *P. sura* Chamberlin e Ivie, 1941 se describieron originalmente como especies distintas, todas pertenecientes al grupo *lapidicina*. Barnes (1959), haciendo una revisión de este grupo, las sinonimizó como *P. sierra*, tomando en cuenta que las variaciones morfológicas de los genitales masculinos eran menores y no correlacionadas con su amplia distribución geográfica (que abarcaba desde California hasta Texas en E.U.A. y gran parte de los estados norteros de México);

este mismo autor, reconoció la existencia de al menos dos morfos distintos para los epiginios de las hembras, pero no les dio relevancia a nivel taxonómico.

Pardosa sierra, en particular es una de tantas especies habitantes de la península de Baja California que se han utilizado para llevar a cabo estudios filogeográficos (Correa-Ramírez 2010, Correa-Ramírez *et al.*, 2010b; Correa-Ramírez *et al.*, en preparación). Es una especie caracterizada principalmente por preferir hábitats en estrecha asociación a cuerpos de agua, particularmente zonas rocosas a orilla de arroyos o estanques (Van Dyke y Lowrie, 1975; Punzo y Farmer, 2006). Esta especie pertenece a la familia Lycosidae Sundevall, 1833, que se caracteriza por agrupar arañas cazadoras cursoriales, por el arreglo característico de sus ojo en tres filas (4 anteroinferiores, 2 anterosuperiores y 2 posteriores), por la falta de apófisis tibial retrolateral en el pedipalpo del macho y por el cuidado maternal de las hembras que cargan el ovisaco en sus hileras y posteriormente a las recién emergidas arañuelas sobre su abdomen (Murphy *et al.*, 2006). Como todas las arañas, *P. sierra* es una especie de reproducción sexual dioica. También como en todas las arañas, los machos, tienen pedipalpos modificados con los que transfieren el esperma a los receptáculos seminales de las hembras, y éstas, por su parte, pueden copular con varios machos, encapsular el esperma de cada uno por separado y controlar cuál utilizarán para la fertilización; la dispersión suele darse durante la fase juvenil (Foelix, 2011).

El primer aporte de los estudios filogeográficos de *P. sierra* (Correa-Ramírez, 2010; Correa-Ramírez *et al.*, 2010b), fue reconocer la validez de las tres especies como se habían descrito originalmente, y en consecuencia anular la sinonimia establecida por Barnes (1959). Esto se hizo con base en las diferencias encontradas en un carácter morfológico, la forma de la placa genital femenina, y en el análisis de distancias genética entre secuencias de un fragmento del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) de las tres especies. Como consecuencia, las áreas de distribución de las tres especies se delimitaron como sigue: el área de distribución de *P. sierra* quedó restringida a la península de Baja California, la de *P. atromedia* se limitó al centro y sur del estado de California, E.U.A., y *P. sura* quedó con la distribución más amplia, que incluye Oregon, noreste de California, Utah, Colorado, Arizona y Texas en E.U.A. y desde Chihuahua hasta Veracruz en México,

excluyendo a Sonora, Sinaloa y la península de Baja California (Correa-Ramírez *et al.*, 2010b).

Además, Correa Ramírez *et al.* (2010a) desarrollaron una batería de 10 loci microsatélites para ser usados en *P. sierra*, tanto en filogeografía, como en el único estudio de genética de poblaciones de arañas del que se tenga conocimiento, utilizando este tipo de marcadores moleculares. Como resultado de éste, se encontró que *P. sierra* presenta diferenciación genética pequeña pero significativa a lo largo de la península, conformándose al menos cinco poblaciones distintas: una en Sierra de la Laguna, otra en El Novillo, y las demás separadas entre San Pedro de la Presa-San Isidro, Cadejé y El Rosarito-Ensenada. Además encontraron altos niveles de flujo genético entre los sitios muestreados por lo que infirieron una alta capacidad de dispersión, aunque no llegaron a explicar sus mecanismos.

Otro de los aportes importantes en cuanto a la filogeografía de *P. sierra* y sus especies cercanas *P. atromedia* y *P. sura*, fue la propuesta hecha por Correa-Ramírez (2010) reformulada posteriormente por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), sobre la historia evolutiva de las tres especies, a partir de análisis filogenéticos utilizando los genes mitocondriales COI y del ARN de la subunidad 16S. Consideraron varias especies de *Pardosa* de los grupos *lapidicina* (incluyendo *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*) y *milvina*, y calcularon tiempos de divergencia entre especies y linajes. Luego los correlacionaron con eventos vicariantes acontecidos en la península y con cambios climáticos sucedidos durante el Pleistoceno. Según sus reconstrucciones filogenéticas, *P. lapidicina* Emerton, 1885 y *P. atromedia* son especies hermanas (los dos descendientes más cercanos entre sí con un ancestro común) y ambas forman el clado hermano de *P. sierra*, mientras que *P. sura* es hermana de *P. vadosa* Barnes, 1959 y *P. steva* Lowrie y Gertsch, 1955 es hermana de *P. valens* Barnes, 1959. Estas últimas cuatro especies forman el clado hermano de las tres primeras. Más aún, encontraron coincidencias entre los tiempos de divergencia que estimaron entre diferentes especies dentro del grupo *lapidicina* y los tiempos reportados para diversos eventos geológicos. Esto los llevó a proponer un escenario evolutivo en el que el grupo *lapidicina* primero se separó en dos, una parte en la península de Baja California (grupo *P. sierra* y *P. atromedia*) y la otra en México continental (grupo *P.*

vadosa y *P. sura*), aproximadamente hace 5.61 millones de años debido a la separación de la península de la masa continental o formación del Golfo de California. Después, el linaje que dio origen a *P. sierra* se separó del que formó a *P. atromedia*, esto correspondería a la introgresión marina norteña, un evento vicariante que ocurrió hace aproximadamente 4.1 millones de años en las inmediaciones de la actual cabeza del Golfo de California. Finalmente, el linaje de *P. sierra* se separó en dos (un linaje de California, E.U.A. y otro de la península de Baja California) hace aproximadamente 2.05 millones de años, correspondiendo con el incremento del nivel del Río Colorado que ocurrió entre el Plioceno tardío y el Pleistoceno temprano. Estos dos linajes determinados mediante ADN mitocondrial, son mencionados recurrentemente a lo largo del presente trabajo y se refieren específicamente a esta propuesta realizada por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación).

Como puede verse, las hipótesis de especiación y diversificación de linajes por vicarianza han sido ampliamente consideradas para los estudios de biogeografía histórica de la península de Baja California. Sin embargo, además de las explicaciones de diversificación por vicarianza o por eventos geológicos o por dispersión, pueden encontrarse otras, que sean alternativas o complementarias, relacionadas con la selección ambiental y/o sexual y que no se han puesto a prueba en esta ni en otras especies que habitan la península.

Existen al menos dos casos de estudios de arañas, uno del género *Tetragnatha* Latreille, 1804 en Hawaii (Gillespie, 2004) y otro del género de arañas lobo *Hogna* Latreille, 1819 en las Galápagos (De Busschere *et al.*, 2010, 2012), en los que se ha encontrado que tanto el aislamiento geográfico entre las diferentes islas como la adaptación a ambientes distintos dentro de las mismas, han contribuido a la diversificación de estos grupos de arañas. En ambos estudios se comprobó que las especies de varias islas tenían adaptaciones morfológicas similares que les permitían sobrevivir en ambientes del mismo tipo. Sin embargo, las especies cohabitantes al interior de cada isla, eran filogenéticamente más cercanas entre sí (aún cuando morfológica y ecológicamente estaban claramente diferenciadas), que con respecto a sus equivalentes ecológicos de otras islas. Este patrón en la composición de especies tuvo que ser resultado de especiación alopátrica conforme se

fueron colonizando las islas, seguida de especiación ecológica relativamente reciente dentro de cada isla.

En otro estudio se demostró la importancia de la selección sexual sobre el cortejo en la diversificación de un grupo de arañas saltadoras *Habronattus pugillus* Griswold, 1987. En esta especie, los machos de poblaciones alopátricas pero próximas entre sí, tienen diferencias muy marcadas en ornamentos corporales y en los cortejos en los que éstos son desplegados mientras que las hembras no varían. Masta y Maddison (2002) encontraron que estos rasgos de los machos se encuentran bajo selección sexual y desarrollaron un método basado en simulaciones y comparación de árboles de genes con el que comprobaron que la tasa de fijación de estos rasgos sexualmente seleccionados, es significativamente mayor a la de genes mitocondriales neutrales. Además encontraron diferentes niveles de aislamiento reproductivo entre diferentes combinaciones de poblaciones. De todo esto concluyeron que entre estas poblaciones, existe un proceso de especiación incipiente que es dirigido por selección sexual.

En arañas lobo no se han llevado a cabo estudios con el objetivo específico de comprobar la existencia de especiación por selección sexual. Aunque no existen antecedentes específicos sobre el comportamiento reproductivo de *P. sierra*, los cortejos de arañas lobo han sido abundantemente estudiados y el estado actual del conocimiento sugiere que *P. sierra* es un modelo adecuado para poner a prueba hipótesis de especiación por selección sexual sobre el cortejo. A continuación se presentan los antecedentes que sustentan esta propuesta con mayor puntualidad.

Tradicionalmente se ha considerado que en arañas, el cortejo cumple con dos funciones principales, la supresión de los instintos depredadores, principalmente de la hembra pero puede ser de ambos consortes; y la excitación o estimulación mutua, ya que las hembras por lo general permanecen pasivas mientras no sean lo suficientemente estimuladas (Turnbull, 1973; Robinson, 1982; Brusca y Brusca, 1990; Foelix, 2011). Estos patrones de cortejo funcionan entonces como mecanismos de reconocimiento intraespecíficos y son particulares para cada especie, por lo que permiten el encuentro y apareamiento de consortes homoespecíficos pero no heteroespecíficos (Jiménez, 1984). Tan es así, que las pautas de comportamiento son complementos importantes en las

determinaciones taxonómicas y en la diferenciación de especies estrechamente emparentadas (Jiménez, 1984) e incluso se ha llegado a proponer el nombre de “etoespecies” para definir especies “reproductivamente aisladas de otras, únicamente por mecanismos de comportamiento que ocurren durante el cortejo, pues fuera de eso, son especies morfológica y ecológicamente idénticas” (Hollander y Dijkstra, 1974).

Por ejemplo, el grupo *lugubris* dentro del género *Pardosa* se distribuye en gran parte del continente europeo. Töpfer-Hofmann *et al.* (2000) estudiaron ejemplares vivos de diversas procedencias y por observaciones de cortejo así como de pruebas de aceptación/rechazo de los machos por parte de las hembras, fueron capaces de identificar seis especies distintas, muchas de las cuales presentaban simpatría en algunos de los sitios muestreados y, mientras que no podían diferenciarse morfológicamente, eran perfectamente distinguibles mediante los rasgos conductuales.

En otro estudio, Stratton y Uetz (1986) utilizaron un par de especies de araña lobo morfológicamente indistinguibles, *Schizocosa ocreata* (Hentz, 1842) y *S. rovneri* Uetz y Dondale, 1979, que están reproductivamente aisladas por tener cortejos distintos. Mediante apareamientos “forzados” en el laboratorio utilizando hembras anestesiadas, obtuvieron híbridos de primera generación, los machos de los cuales presentaban elementos de cortejo de ambas especies parentales. Machos y hembras híbridos resultaron etológicamente estériles, pues los machos, a pesar de cortejar, no fueron aceptados por ninguno de los tres tipos de hembras (híbridos o cada una de las especies parentales), y las hembras híbridas no aceptaron a ninguno de los tres tipos de machos. El hecho de que las hembras híbridas no prefirieran a los machos híbridos indicó que no hay acoplamiento entre los comportamientos de cortejo de los machos y los de receptividad de las hembras. Sin embargo, los híbridos produjeron descendencia fértil mediante apareamiento “forzado”. Además, estudiando el comportamiento de cortejo de híbridos F1, F2 y retrocruzas, los autores encontraron que probablemente la herencia en algunos aspectos de estos comportamientos, está relacionada con un único locus autosómico y que el comportamiento de cortejo y los caracteres sexuales secundarios, no se segregan independientemente.

Un estudio muy similar al anterior fue el realizado por Costa y Francescoli (1991) con las especies de araña lobo *Lycosa thorelli* (Keyserling, 1877) y *L. carbonelli* Costa y

Capocasale, 1984, las cuales son simpátricas, sinmórficas y sincrónicas pero de cortejos muy distintos. Al igual que en el estudio de Stratton y Uetz (1986), ellos utilizaron apareamientos forzados para obtener híbridos y comprobaron la ausencia de aislamiento reproductivo post-copulatorio entre las especies parentales y los híbridos.

Otros estudios recientes han encontrado que además de ser importantes en el reconocimiento entre consortes de la misma especie, hasta el punto de no permitir las cruzas interespecíficas, los cortejos también son importantes porque la intensidad con que son desplegados (medida por ejemplo, como el tiempo que los machos despliegan cierto comportamiento entre el tiempo total de observación), es un fiel indicador de la condición del macho, y por lo tanto es un rasgo del que las hembras toman información a la hora de aceptar o rechazar la cópula con éste. Como consecuencia, los machos que tienen cortejos más intensos tienen más probabilidades de aparearse que aquellos que cortejan con menor intensidad (Scheffer *et al.*, 1996; Delaney *et al.*, 2007; Gibson y Uetz, 2008; Lomborg y Toft, 2009; Shamble *et al.*, 2009). La preferencia de las hembras por cierto tipo de cortejos, podría en teoría, ser un disparador de reproducción diferencial, y por lo tanto la divergencia de linajes.

Pero no siempre las diferencias de cortejo resultan en aislamiento reproductivo entre especies, pues también existen varios casos documentados de hibridación de distintas especies de arañas en condiciones tanto naturales como de laboratorio.

Fernández-Montraveta *et al.* (2001) hicieron cruzas en laboratorio entre individuos de *Lycosa tarentula fasciiventris* Dufour, 1835 y otra especie no descrita de *Lycosa* y encontraron que las diferencias de cortejo no ejercen una barrera absoluta de aislamiento reproductivo entre ellas pues aproximadamente la mitad de los experimentos entre machos de *L. tarentula fasciiventris* con hembras de *Lycosa* sp. resultaron en apareamientos aunque ninguno produjo descendencia.

En condiciones naturales también se ha detectado hibridación en diferentes especies de arañas. En varios estudios se ha utilizado ADN mitocondrial para determinar la existencia de introgresión de haplotipos de una especie en individuos que por su morfología, distribución, afinidades ecológicas o ADN nuclear correspondían a otra especie. Hedin y Lowder (2009) observaron algunos casos de este fenómeno en arañas

saltadoras del género *Habronattus* F. O. P-Cambridge, 1901; mientras que Lattimore *et al.* (2011) lo hicieron en arañas del género *Dolomedes* Latreille, 1804.

También utilizando ADN mitocondrial Croucher *et al.* (2004, 2007) encontraron que tres especies de arañas de la familia Agelenidae Latreille, 1804 (*Tegenaria atrica* C. L. Koch, 1843, *T. saeva* Blackwall, 1844 y *T. gigantea* Chamberlin e Ivie, 1935), tienen distribuciones traslapadas en el oeste de Europa e hibridan asimétricamente entre sí, pues se encontraron haplotipos de *T. gigantea* en ejemplares de *T. saeva*, pero no viceversa. Describieron una zona híbrida (zonas donde confluyen dos grupos genéticamente distintos y producen descendencia con ancestría mezclada), notable por el hecho de que la hibridación es mucho más frecuente en zonas a las que ambas especies han extendido su distribución recientemente y porque se trata de una zona de tensión, en la que los híbridos tienen menor eficacia biológica (“fitness” en inglés), y sin embargo, no encontraron desplazamiento de caracteres, es decir evolución de rasgos fenotípicos contrastantes que facilitan la identificación de individuos conespecíficos en zonas de contacto (pero no en sus distribuciones alopátricas) como resultado de la presión selectiva ejercida por la baja o nula viabilidad, eficacia o fertilidad de los híbridos.

El único caso documentado de una probable zona híbrida entre arañas lobo es el estudiado por Reiskind y Cushing (1996) quienes propusieron una zona híbrida de 300 metros de ancho en Florida, E.U.A., donde hibridan *Hogna ammophila* (Wallace, 1942) (= *Lycosa ammophila*) y *Hogna ericeticola* (Wallace, 1942) (= *Lycosa ericeticola*). La identificación y descripción de esta zona híbrida se hizo en base a caracteres morfológicos únicamente. Encontraron machos con pedipalpos que eran intermedios en apariencia, por su estructura y tamaño, entre los de las dos especies parentales. Estos machos fueron considerados híbridos de primera generación pero no encontraron evidencias de introgresión hacia las especies parentales. Además corroboraron mediante experimentación controlada, que a pesar de que las diferencias entre los genitales de los machos son dramáticas, éstas no son suficientes para impedir el apareamiento interespecífico, ya que no existe aislamiento pre-copulatorio entre las dos especies.

Todos estos antecedentes hacen suponer la existencia de hibridación entre las especies abordadas en el presente estudio. Este fenómeno es de gran interés en la medida de

poder confirmar la identidad específica bajo el concepto de especie biológica, el cual menciona que dos especies deben estar reproductivamente aisladas una de otra y por lo tanto se requiere comprobar que no hibridan entre sí para corroborar que el proceso de especiación está completo y se les puede considerar especies en el sentido estricto de esta definición. Por otro lado, las zonas híbridas, que son zonas donde confluyen dos grupos genéticamente distintos y producen descendencia con ancestría mezclada, juegan un papel crucial en el origen de nuevas especies, pudiendo llevar a muchos desenlaces distintos, cada uno de los cuales ofrece por sí mismo una posible explicación al proceso de especiación (Kawakami y Butlin, 2001; Mallet, 2005; Schwenk *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2013; Feder *et al.*, 2013).

La aproximación conceptual que se seguirá en el presente estudio para hacer una comparación entre las posibles explicaciones en el origen de especies y linajes (vicarianza, selección sexual sobre el cortejo) de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, se basa en los principios de concordancia propuestos por Avise y Ball (1990). De acuerdo con Avise (2004) la concordancia entre varias estructuras filogenéticas cuasi-independientes obtenidas de diferentes loci sólo puede darse como resultado de una interrupción del flujo genético sostenida durante un período de tiempo lo suficientemente largo para que las genealogías de todos los genes alcancen un estado de monofilia recíproca dentro de cada linaje. Estas interrupciones al flujo genético podrían deberse a barreras intrínsecas de aislamiento reproductivo o extrínsecas como los eventos vicariantes que impidieron el contacto entre las poblaciones, precisamente las dos posibles explicaciones que se contrastarán en el presente estudio.

Según Avise (2004), estos principios abarcan cuatro aspectos que deben ser abordados en escalas tanto espacial como temporalmente apropiadas: I) concordancia entre múltiples cambios nucleotídicos dentro de una misma secuencia o gen; II) concordancia entre las genealogías de múltiples genes o loci dentro de una misma especie; III) concordancia entre las estructuras filogeográficas de varias especies codistribuidas; y IV) concordancia entre las genealogías genéticas y evidencias biogeográficas tradicionales.

Aunque se suele preferir la comparación de genes mitocondriales y genes nucleares en busca de concordancia, Avise (2000, 2004) explica que al abordar el aspecto II bajo un

marco más amplio, también se puede utilizar información sustituta que puede provenir de apreciaciones de genética poblacional tradicional como frecuencias alélicas y distancias genéticas (preferiblemente de varios loci nucleares); o alternativamente, de enfoques geográficos de los fenotipos de los organismos como caracteres morfológicos o de comportamiento que se presume pueden registrar diferencias genéticas notables entre las poblaciones monitorizadas.

3 JUSTIFICACIÓN

Por su peculiar conformación, la península de Baja California siempre ha llamado la atención de naturalistas y científicos de las ciencias de la tierra. En tiempos recientes, ha habido un furor creciente en estudiar esta zona, producto de la aparición de nuevos paradigmas científicos como la filogeografía y la tectónica de placas, lo que ha permitido develar considerables niveles de diversidad genética en la región y explicarla en función de eventos geológicos localizados en tiempo y espacio (Grismer, 1994; Avise, 2000).

Sin embargo, esto probablemente también ha resultado en que se haya sobredimensionado la importancia de los eventos vicariantes, sin ejercer rigurosidad a la hora de asociar diferentes eventos vicariantes con eventos de cladogénesis. La prueba está en la gran cantidad de fechas y ubicaciones geográficas que diferentes autores atribuyen a los mismos eventos vicariantes (p. ej. ver el resumen de Munguía-Vega, sin publicar; o comparar entre Grismer, 1994; Riddle *et al.*, 2000c; y Murphy y Aguirre-León, 2002).

El formular y comprobar explicaciones alternativas, como se propone en el presente estudio considerando la selección sexual sobre el cortejo, sentaría precedente de un nuevo camino para el desarrollo de investigaciones encaminadas a tener una mejor comprensión de la historia biológica de la península de Baja California y el Noroeste de México, que ponderen de manera más objetiva la importancia de los eventos vicariantes y lleven el estudio de la especiación a un nivel de resolución más profundo, que además de los eventos vicariantes, tome en cuenta otros actores como la selección, tanto natural como sexual, que seguramente tienen influencia, pero hasta ahora no se sabe de qué magnitud y tipo, porque han sido generalmente relegadas en los estudios filogeográficos del Noroeste Mexicano.

Aunque existe gran desconocimiento de la diversidad del orden Araneae, los cortejos de las arañas lobo han sido una excepción, pues se han estudiado profusamente. Sin embargo estos estudios no se han visto acompañados de estudios paralelos a nivel de filogeografía ni genética de poblaciones, inicialmente por la ausencia de medios técnicos (el desarrollo de marcadores moleculares es relativamente reciente) o por una aparente desintegración entre estas disciplinas. Gracias a los estudios que se han llevado a cabo en *Pardosa sierra* (Correa-Ramírez, 2010; Correa-Ramírez *et al.*, 2010a, 2010b, en

preparación), hoy se se cuenta con conocimientos y medios técnicos que permiten un enfoque innovador para el estudio de la evolución de esta especie, integrando información filogeográfica, genética poblacional y conductual, para poner a prueba hipótesis alternativas a las de vicarianza ya propuestas (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación) en la explicación de su historia evolutiva.

Además del interés intrínseco que entraña el comprender los procesos evolutivos, este tipo de estudios son de gran importancia para la elaboración de estrategias de conservación en una zona de tantos endemismos y riqueza biológica como es la península de Baja California, porque generan conocimiento sobre cómo se ha originado esta riqueza, dónde se encuentra actualmente y cómo se puede ver afectada, permitiendo así encausar los esfuerzos de conservación de manera óptima.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar si la diversificación en *Pardosa sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, y su mantenimiento como linajes independientes, se explican más satisfactoriamente como el resultado de selección sexual sobre el cortejo, que como el resultado de eventos vicariantes.

4.2 Objetivos particulares

- a) Describir los patrones de cortejo de *Pardosa sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*.
- b) Determinar el número de poblaciones genéticamente homogéneas en las muestras recolectadas de *P. sierra* y *P. atromedia*.
- c) Establecer la estructura genética de las poblaciones muestreadas de *P. sierra*.
- d) Comparar los patrones de cortejo con los patrones filogenéticos mitocondriales hasta ahora conocidos, para las tres especies, con la estructuración genética actual de las poblaciones de *P. sierra* y con los eventos vicariantes propuestos en la literatura.
- e) Detectar evidencias de hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia* y entre los dos linajes mitocondriales de *P. sierra*, mediante el uso de marcadores moleculares y experimentos de cortejo y apareamiento.

5 HIPÓTESIS

Ho: Si los procesos de especiación y diversificación de linajes en *P. sierra* y especies cercanas son facilitados y dirigidos por el cortejo, entonces se esperaría que:

-Los patrones de cortejo concuerden con los patrones filogenéticos mitocondriales pero no con eventos vicariantes propuestos.

-Cada especie y cada linaje interespecífico tenga un cortejo propio característico que impide la hibridación y que las poblaciones genéticamente aisladas presenten cortejos diferenciados.

Ha: Si los eventos vicariantes son los que han provocado la diversificación de linajes se esperaría que:

-Los patrones filogenéticos mitocondriales concuerden con eventos vicariantes propuestos.

-Los patrones de cortejo concuerden o no con los patrones filogenéticos mitocondriales e impidan o no la hibridación.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio y trabajo de campo

El diseño del muestreo se orientó a cubrir exhaustivamente un área relativamente pequeña, comparada con el área de distribución de las especies, donde se esperaba encontrar una zona de confluencia (posiblemente una zona híbrida) entre *P. sierra* y *P. atromedia*. Esta área comprendió aproximadamente 50,000 km² y abarcando partes del norte de la península de Baja California y sur de California, E.U.A. Adicionalmente se muestreó al menos un sitio por especie, donde se encontraran ejemplares “puros” de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, que pudieran servir como referencia de los rasgos genéticos, morfológicos y etológicos típicos de cada especie. Con excepción del sitio El Novillo (NOV), del que se utilizó material previamente recolectado para un estudio anterior (Correa-Ramírez, 2010), todos los demás sitios se muestrearon explícitamente para el presente estudio. En la Figura 1 se presenta un mapa con la ubicación geográfica de cada sitio de muestreo y en la Tabla I se detallan, de cada sitio, la localidad, las coordenadas geográficas, el tipo de vegetación e información de las condiciones de recolecta. En el Anexo 1 se incluyen fotos de los sitios de muestreo.

Las arañas fueron capturadas manualmente durante el día por una a cuatro personas, y siempre se las encontró en microhábitats formados por cuerpos de agua rodeados o flanqueados por zonas pedregosas, de suelo arenoso y con vegetación herbácea de medianamente densa a muy escasa. Se tomaron datos de temperatura y humedad relativa además de hora, fecha y coordenadas geográficas. Para cada sitio de muestreo se procuró recolectar aproximadamente 20 individuos vivos (utilizando frascos de plástico de 110 mL con un pedazo de algodón humedecido y resguardados en una hielera a aproximadamente 15 °C para evitar la deshidratación de las arañas) para los experimentos de cortejo y apareamiento, y aproximadamente 50 individuos fijados en alcohol al 96% a temperatura ambiente para preservación y extracción de ADN. Los ejemplares recolectados en el sitio Bertagnolli Ranch, Mount Diablo en el Centro de California, E.U.A. (CCA) se mantuvieron

en el alcohol a temperatura inferior a 10°C desde el momento de la recolección hasta la extracción. En aquellos sitios donde la densidad de ejemplares era baja, se procuró recolectar ejemplares vivos prioritariamente y estos mismos se utilizaron para extraer ADN una vez concluida su utilización para los experimentos de cortejo y apareamiento.

La determinación taxonómica de las arañas recolectadas se hizo en base a los epiginios de las hembras maduras siguiendo la descripción de Correa-Ramírez *et al.* (2010b). Los ejemplares machos e inmaduros se consideraron de la misma especie que las hembras recolectadas en el mismo evento de muestreo.

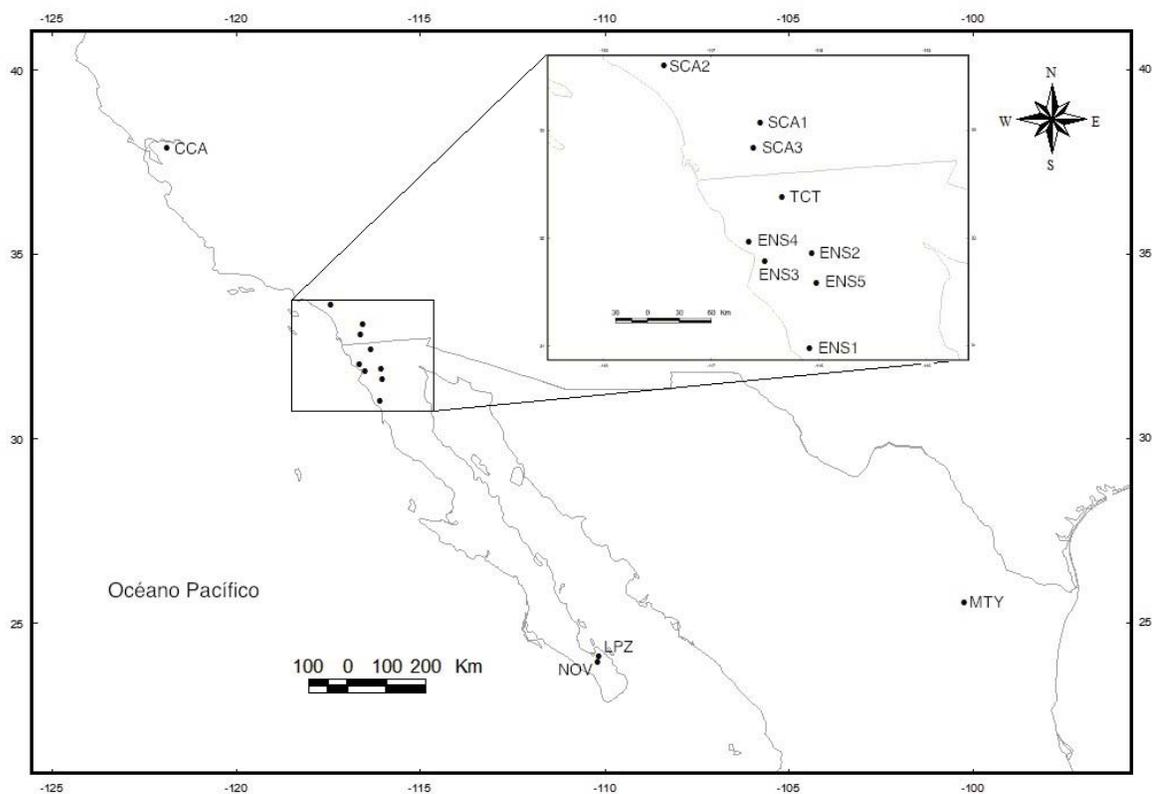


Figura 1. Sitios de muestreo de *Pardosa sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* con acercamiento en la zona de frontera entre el estado de Baja California, México y California, E.U.A. El nombre y localización de cada sitio se explican en la Tabla I.

Tabla I. Información de los muestreos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*. Se muestran los acrónimos de cada sitio de muestreo, nombre de la localidad, ubicación, tipo de vegetación, altitud y coordenadas geográficas, así como fechas de recolecta, condiciones ambientales durante la misma y cantidad y especie de los ejemplares recolectados. NL = Nuevo León, BCS = Baja California Sur, BC = Baja California, CA = California, MEX = México, EUA = Estados Unidos de América, HR = humedad relativa, T = temperatura, NP = número de individuos recolectados preservados para análisis genéticos, NV = número de individuos recolectados vivos para análisis de comportamiento reproductivo. Las clasificaciones de la vegetación son de acuerdo a: ¹ Rzedowski (2006), ² González-Abraham *et al.* (2010) y ³ Ornduff *et al.* (2003).

Acrónimo	Especie	Localidad	Municipio o Condado	Estado	País	Coordenadas Geográficas	
						Lat. (Norte)	Long. (Oeste)
MTY	<i>P. sura</i>	Parque La Estanzuela	Monterrey	NL	MEX	25° 32' 58.87"	100° 16' 9.61"
NOV	<i>P. sierra</i>	El Novillo	La Paz	BCS	MEX	23° 55'	110° 13'
LPZ	<i>P. sierra</i>	Presa de la Buena Mujer	La Paz	BCS	MEX	24° 05' 17.44"	110° 11' 29.3"
ENS1	<i>P. sierra</i>	Arroyo El Mejín, Carretera Ensenada-Sierra de San Pedro Mártir	Ensenada	BC	MEX	30° 58' 49.6"	116° 5' 41.5"
ENS2	<i>P. sierra</i>	Arroyo San Salvador, Puente Rancho Viejo, Carr. Fed. #3 San Felipe-Ensenada	Ensenada	BC	MEX	31° 51' 9.1"	116° 4' 39.4"
ENS3	<i>P. sierra</i>	Arroyo San Carlos, Rancho San Carlos	Ensenada	BC	MEX	31° 47' 10.6"	116° 30' 18.2"
ENS4	<i>P. sierra</i>	Arroyo San Antonio de las Minas	Ensenada	BC	MEX	31° 58' 8.3"	116° 39' 31.1"
ENS5	<i>P. sierra</i>	Rancho Las Liebres, Carr. Fed. #3 San Felipe - Ensenada	Ensenada	BC	MEX	31° 35' 3.8"	116° 1' 57"
TCT	<i>P. sierra</i>	Arroyo Las Palomas, Zona Urbana, Ejido Guadalajara #2	Tecate	BC	MEX	32° 22' 26.3"	116° 21' 16.7"
SCA1	<i>P. sierra</i>	San Felipe Creek	San Diego	CA	EUA	33° 3' 57.9"	116° 33' 11.4"
SCA2	<i>P. sierra</i>	San Juan Creek	Orange	CA	EUA	33° 36' 26.78"	117° 26' 38.69"
SCA3	<i>P. sierra</i>	Descanso Town Highway 79	San Diego	CA	EUA	32° 50' 35.8"	116° 36' 16.4"
CCA	<i>P. atromedia</i>	Bertagnolli Ranch, Mount Diablo	Contra Costa	CA	EUA	37° 52' 0.21"	121° 52' 53.18"

Tabla I. Continuación

Acrónimo	Altitud (msnm)	Vegetación	Fechas Recolecta	HR (%)	T (°C)	NP	NV
MTY	711	Sierra Madre Oriental ¹	4 Feb '12		14	0	5
NOV		Costa central del golfo ²	4 Jun '06			52	0
LPZ	341	Costa central del golfo ²	28 May '11 10 Ago '11		34 30	0 0	17 8
ENS1	79	Matorral costero rosetófilo ²	15 May '11	46	21.6	30	10
ENS2	933	Chaparral ²	14 May '11			34	0
ENS3	81	Matorral costero ²	14 May '11	48	20.2	40	20
ENS4	232	Matorral costero ²	8 May '11	55	19.4	40	22
ENS5	1080	Chaparral ²	14 May '11			0	10
TCT	870	Chaparral ²	13 May '11	43	27.4	40	20
SCA1	851	Chaparral montano ³	11 May '11	44	20	23	17
SCA2	492	Chaparral montano ³	10 May '11	38	24.4	40	18
SCA3	1048	Chaparral montano ³	12 May '11	48	23	0	3
CCA	260	Bosques de base de montaña y valles ³	18 May '12 11 Oct '12		24 22	53 0	0 17

6.2 Conducta

6.2.1 Mantenimiento de ejemplares en cautiverio

A todos los individuos recolectados vivos se les asignó una clave de identificación individual y de cada uno se determinó y registró el sitio de muestreo, la especie (*P. sierra*, *P. atromedia*, *P. sura*, otra) el estado de desarrollo (juvenil, pre-adulto, adulto), el sexo (hembra o macho) en el caso de los adultos y el lugar de maduración (campo o laboratorio), asumiendo que todos los individuos madurados en el laboratorio eran vírgenes y que todos los recolectados en el campo siendo ya adultos adultos, no eran vírgenes.

Los individuos de *P. sierra* se incorporaron al Laboratorio de Animales en Cautiverio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), donde permanecieron a temperatura controlada de 25 °C y humedad relativa ambiental aproximada de 40%. Cada espécimen se colocó en un frasco de plástico de 500 mL (8 cm de diámetro x 15 cm de altura) cubierto por tela de malla al que se agregó una tira de papel para que sirviera como sustrato. A todas las arañas se les proveyó de agua mediante un algodón empapado cada cuarto días y alimento dos o tres veces por semana con una a seis (dependiendo de la talla de la araña) moscas de la especie *Drosophila melanogaster* mutantes de alas curvadas criadas utilizando medio *Drosophila* Products Jazz-Mix *Drosophila* Food (Applied Scientific). Después de los primeros tres meses de tener las arañas en el laboratorio, al medio de cultivo de las moscas se adicionó hojuelas de alimento para pescado, de tal modo que la mayoría de los experimentos de cortejo se realizaron cuando las arañas ya llevaban esta dieta. Además se probaron otros organismos como fuente de alimento, entre ellos, ninfas de *Acheta domesticus* y larvas de *Tenebrio molitor*, pero no fueron bien aceptados. Los frascos se limpiaron una vez al mes para retirar restos de alimento y excreciones.

Los ejemplares de *P. sura* y *P. atromedia* se mantuvieron en instalaciones fuera del Laboratorio de Animales en Cautiverio, en condiciones lo más similares posible a las anteriormente descritas. *Pardosa atromedia* fue alimentada con *Drosophila* spp. y otras moscas silvestres de tamaño similar, mientras que *P. sura*, no fue alimentada porque la fase

de experimentos se realizó en el transcurso de los cinco días posteriores a su recolectas, e inmediatamente después de terminarla, los ejemplares se fijaron en alcohol.

6.2.2 Descripción del cortejo de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*.

6.2.2.1 Experimentos de cortejo

Estos experimentos se llevaron a cabo con la finalidad de describir y comparar los patrones de cortejo y su variabilidad a nivel de las tres especies, *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, y dentro de *P. sierra*, a nivel de linajes mitocondriales, California y península de Baja California (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación) y sitios de muestreo. Se incluyeron todos los sitios muestreados con excepción de ENS2 y NOV, de los que no se recolectaron ejemplares vivos, y SCA3 del que sólo se recolectaron hembras.

Para estandarizar las condiciones bajo las que se llevarían a cabo los experimentos se realizaron 23 ensayos piloto en los que se pusieron a prueba diferentes duraciones, horarios, tipos de recinto en el que se colocaron las arañas, tipos de sustrato y métodos de grabación. Uno fue realizado entre dos individuos de ENS3, seis entre individuos de CCA y el resto entre individuos de LPZ. La información de estos ensayos piloto se tomó en cuenta únicamente para el diseño de los experimentos estandarizados.

Los experimentos estandarizados se llevaron a cabo dentro del Laboratorio de Animales en Cautiverio del CIBNOR, utilizando un aparato diseñado *ad hoc* (Anexo 2) que permitió la observación y grabación simultánea de señales visuales y acústico-vibratorias. Este aparato consistía en un anillo circular de acrílico transparente de diez cm de diámetro y seis centímetros de altura, embonado (pero sin tocar las paredes) con un sensor piezoeléctrico, ligeramente menor en diámetro, que le servía como base y que estaba aislado de las vibraciones ambientales mediante un par de placas metálicas de medio centímetro de espesor y una placa de esponja de 4 cm de espesor entre ellas. Este sensor se encontraba montado sobre soportes de goma y conectado a una grabadora de sonido Sony IC Recorder 1CD-UX200. Hacia el fondo del anillo, directamente sobre el sensor piezoeléctrico, se colocaba un círculo de papel filtro desechable, ligermanete menor de 10 cm de diámetro, que servía como sustrato para que las arañas se movieran sobre él y le

impregnaran sus feromonas (ver explicación más adelante). Por encima del anillo se contaba con un micrófono Electret de 5 mm de diámetro. El sensor piezoeléctrico y el micrófono se utilizaron para registrar los sonidos y vibraciones. El registro de video se hizo utilizando dos cámaras: una Panasonic con teleobjetivo, colocada por arriba a una distancia fija con ayuda de un tripié, en ángulo perpendicular al suelo, para obtener un plano general del sustrato y las arañas y de este modo evitar la deformación de la superficie y hacer posible la medición exacta de distancias; y una cámara Sony HandyCam mini DVI (o un iPhone 4 en los 5 experimentos de *P. atromedia*, ver más adelante) operada manualmente, usualmente en ángulo paralelo al suelo para hacer acercamientos del cortejo y seguir a las arañas en sus movimientos obteniendo un primer plano de las acciones. Las grabaciones de sonido y video se digitalizaron para su posterior análisis. Las características técnicas del aparato se describen en Romero-Vivas *et al.* (2012).

Para llevar a cabo los experimentos, en esencia, se siguió el método utilizado por Stratton y Uetz (1986) con algunas modificaciones. Cada macho y hembra que se utilizaron fueron alimentados el día anterior al experimento. El macho permaneció en su contenedor individual mientras que la hembra fue colocada dentro del cilindro de acrílico sobre el papel filtro (ver descripción en el párrafo anterior) durante al menos 12 horas antes del experimento para que impregnara el papel filtro con sus feromonas. Inmediatamente antes de iniciar, se registró el peso de ambos con una balanza analítica. Luego se devolvió la hembra al cilindro y sólo a continuación fue que se presentó al macho y ambos entraron en contacto dando inicio al experimento. En los casos en que el macho desplegó su ritual de cortejo, el experimento tuvo una duración de 20 min; si el macho no mostró ningún indicio de cortejo, se limitó a 15 min. Cuando hubo apareamientos, éstos se grabaron en su totalidad. Al término de cada experimento, las arañas se separaron y se devolvieron a sus respectivos contenedores individuales. Todos estos experimentos se realizaron en el Laboratorio de Animales en Cautiverio del CIBNOR con condiciones controladas de iluminación y temperatura y durante la noche para minimizar la contaminación auditiva causada por el ruido ambiental. Se procuró utilizar individuos vírgenes siempre que esto fuera posible. En varias ocasiones hubo necesidad de utilizar un mismo individuo en más de una réplica, en tales casos se les dejó descansar al menos 72 horas entre experimentos.

Utilizando el equipo y los métodos detallados en los párrafos anteriores, se llevaron a cabo 29 experimentos con individuos de *P. sierra*, en Octubre de 2011. Estos experimentos, además de observar y grabar los patrones de cortejo, también estaban destinados a evaluar la hibridación entre los linajes mitocondriales dentro de *P. sierra*, por lo que el diseño experimental se explica más adelante, en la sección sobre hibridación.

Adicionalmente, con la finalidad de evaluar si la comunicación química a través de las feromonas de la hembra era suficiente para desencadenar el cortejo de los machos, en Enero de 2012 se realizaron once experimentos, de diez minutos de duración, en los que se utilizaron machos de *P. sierra* que fueron expuestos al sustrato de papel filtro impregnado con las feromonas de la hembra pero sin la presencia física de ésta.

En lo que respecta a *P. atromedia* y *P. sura*, se llevaron a cabo cinco y cuatro experimentos en Febrero y Diciembre de 2012, respectivamente. Específicamente en los experimentos con *P. atromedia*, fue importante preservar la virginidad de las hembras para utilizarlas en experimentos posteriores (no incluidos en este estudio), por lo que los intentos de cópula fueron deliberadamente interrumpidos.

Tanto los experimentos con los machos solos de *P. sierra*, como todos los de *P. atromedia* y *P. sura* se realizaron fuera del Laboratorio de Animales en Cautiverio del CIBNOR. Debido a esto, el aparato utilizado para hacer los experimentos no estaba completo, carecía de la cámara de video de vista panorámica superior y del sistema de placas metálicas y esponja para aislar de vibraciones ambientales, y por problemas con el sensor piezoeléctrico (ver descripción dada anteriormente) algunas grabaciones de audio fueron deficientes. Todos estos experimentos se llevaron a cabo utilizando machos y hembras (o feromonas de las hembras) del mismo sitio de muestreo, con excepción de los machos de SCA2 que fueron presentados con feromonas de hembras de SCA1 porque no había hembras del mismo sitio.

6.2.2.2 Análisis de datos de cortejo

Para comparar los cortejos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* se identificaron y describieron los movimientos típicos de los machos de cada especie, así como su utilización general a lo largo del cortejo.

Además se cuantificaron y compararon las diferencias en el cortejo de los machos entre linajes y poblaciones dentro de *P. sierra*. Para esto se contabilizó la cantidad de veces que los movimientos III y IV (escogidos por ser los menos ambiguos de interpretar y más variables entre sitios, ver descripción y videos de estos movimientos en la sección de resultados) fueron ejecutados durante el cortejo y se estandarizó dividiendo entre el tiempo efectivo de cortejo. Para calcular este último parámetro, se sumó la duración de todas las interrupciones en las que el macho permaneció inmóvil por más de treinta segundos y se restó del tiempo total que duró la réplica, aproximadamente 20 minutos. Debido a que varios machos se utilizaron en más de un experimento, constituyendo pseudoréplicas, los análisis se realizaron tanto considerando las pseudoréplicas por separado, como promediando sus parámetros para utilizar un solo dato global por individuo. La significancia estadística de las diferencias entre linajes mitocondriales y entre poblaciones se evaluó mediante pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney ajustando los valores de significancia con la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

6.3 Genética poblacional

6.3.1 Trabajo de laboratorio

Para el trabajo de genética se incluyeron todos los sitios de muestreo excepto ENS5, SCA3, MTY y LPZ; los tres primeros por tener una cantidad insuficiente de muestras y el último porque se utilizó NOV en su lugar, que era un sitio geográficamente muy próximo e importante de incluir como control para homologar la base de datos del presente estudio con la del estudio realizado por Correa-Ramírez (2010). El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética para la Conservación del CIBNOR y en el EVOLAB del Department of Environmental Science, Policy, and Management, University of California, Berkeley.

Primeramente se extrajo el ADN genómico total, a partir de 4 patas o del prosoma de cada araña utilizando un protocolo de extracción con sales modificado a partir del de Aljanabi y Martínez (1997). Para el sitio de muestreo de CCA las extracciones se hicieron con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue de Qiagen, siguiendo las instrucciones del producto. Del sitio de muestreo NOV no se hicieron extracciones ya que se contaba con ADN extraído previamente (Correa-Ramírez, 2010)

La concentración y calidad de todas las extracciones se midió en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop ND200 y se visualizó en geles de agarosa al 1.5% con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en un documentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR SystemBioRad.

Se llevaron a cabo reacciones en cadena de la polimerasa para ocho loci microsatélite con motivos dinucleótidos repetidos desarrollados por Correa-Ramírez *et al.*, (2010a). Se utilizaron cebadores directos etiquetados con flurocromos de 4 colores del kit DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) de Applied Biosystems. Los cebadores inversos se modificaron para agregarles una secuencia “PIGtail” (Brownstein *et al.*, 1996) con el fin de disminuir errores por adenilación diferencial de los fragmentos durante las reacciones en cadena de la polimerasa.

Todas las reacciones en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo en termocicladores Bio-Rad iCycler y Bio-Rad T100, en volúmenes de 10 µl, con 60 ng de ADN por reacción, concentración final de 0.3 mM de dNTPs y concentración final de 0.01 µg/µl de albúmina de suero bovino. Las concentraciones finales de amortiguador, cloruro de magnesio, cebadores y enzima ADN *Taq* polimerasa variaron dependiendo del locus a amplificar (Tabla II).

El programa utilizado en el termociclador fue un paso inicial de cinco minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de cuarenta ciclos de desnaturalización a 94°C por medio minuto, alineamiento a temperatura específica para cada locus (Tabla II) por un minuto y extensión a 72°C por un minuto y medio y un paso de extensión final a 72°C por una hora. Este programa se utilizó para todos los loci, a excepción de Psier04 y Psier40, en los que se usaron 35 ciclos en vez de 40, y la duración de las extensiones en cada ciclo fue de un minuto en vez de uno y medio.

Para cada individuo genotificado, se tomaron dos µl de producto mezclado de amplificación (Psier04 + Psier40 + Psier20 + Psier21 o Psier17 + Psier19 + Psier29 + Psier51), se agregaron 0.33 µl de la escalera GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard y se agregó formamida hasta completar 10 µl de la mezcla para enviarse a análisis de fragmentos en un secuenciador Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer en la DNA Sequencing Facility, University of California, Berkeley

6.3.2 Genotificación

Los resultados del análisis de fragmentos fueron visualizados en el programa *Peak Scanner*™ Software v1.0 de Applied Biosystems. La información fue exportada a MICROSOFT® EXCEL® 2004 11.6.1 for Mac para la determinación de los tamaños alélicos tomando en cuenta (en este orden de prioridad) las siguientes reglas: 1) La señal mínima para lectura de picos homocigotos fue de 350 unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) y de 117 para heterocigotos (en algunos individuos que fueron difíciles de amplificar, este criterio se relajó y se consideraron picos de mínimo 60 RFUs). 2) Debido a que se utilizaron loci dinucleótidos, la talla de los alelos de individuos

heterocigotos debía variar en más de un par de bases. 3) Con la finalidad minimizar errores por la presencia de bandas numerarias, cuando el fragmento más grande tuvo un valor de RFU superior al del fragmento de menor talla, se consideró que el genotipo era heterocigoto sólo si la razón entre ellos era mayor a 0.8. 4) Debido a la longitud de los fragmentos, en los genotipos heterocigotos es más común que el pico correspondiente al alelo de menor talla se encuentre más concentrado en las reacciones de amplificación y por lo tanto presente un valor más alto de RFU con respecto al segundo (“allelic dropout” en inglés). Siempre que se dio este caso, sólo se tomaron en cuenta como heterocigotos, aquellos pares de alelos en los que la razón entre el más grande y el más chico fuera mayor a 0.333.

A continuación se exportó la información de alelos de cada individuo al programa ALLELOGRAM 2.2 (Morin *et al.*, 2009) en donde se conjuntaron los resultados de diferentes corridas de análisis de fragmentos, se normalizaron los valores de tallas alélicas y se asignaron a la talla discreta correspondiente de acuerdo al tamaño de unidades repetidas (“binning”, en inglés), en este caso dinucleótidos. Como producto se obtuvo la base de datos final que se utilizó en los análisis genéticos subsiguientes. Se utilizaron los programas CONVERT 1.31 (Glaubitz, 2004), GENEALEX 6.5 (Peakall y Smouse; 2006, 2012) y GENECLASS 2.0.g (Piry *et al.*, 2004) para convertir la base de datos entre los diferentes formatos requeridos por los programas de análisis genéticos.

Tabla II. Secuencias de cebadores y condiciones de las reacciones en cadena de la polimerasa en ejemplares de *P. sierra* y *P. atromedia* provenientes de nueve sitios de muestreo, utilizando ocho loci microsatélites desarrollados por Correa-Ramírez *et al.* (2010a) F = cebador directo, R = cebador inverso, TA = Temperatura de alineamiento en grados Celsius, [Buffer] = concentración del amortiguador, [MgCl₂] = concentración miliMolar final de cloruro de magnesio, [Ceb] = concentración microMolar final de cada cebador, [Taq] = concentración final de enzima ADN *Taq* polimerasa en unidades por reacción.

Locus	Secuencia del cebador y fluoróforo	TA	[Buffer]	[MgCl ₂]	[Ceb]	[Taq]
Psier04	F: FAM-TATTTCTGGCGGTGTTT-3' R: 5'-GTTTCTTATCCCTCCCACTTATCTCTC-3'	54°C	1.5x	2.5 mM	0.4 µM	0.2 u/R
Psier17	F: VIC-GTGAGTGAGAAGGAGAGAAGA-3' R: 5'-GTTTCTTAGGTTGTGATTATGTGTTCC-3'	64°C	1.125x	2.25 mM	0.4 µM	0.25 u/R
Psier19	F: FAM-GAACAGACCGTGCTAAAAA-3' R: 5'-GTTTCTTTATATCAAACCGAGCCAAAC-3'	56°C	1.125x	2.25 mM	0.4 µM	0.25 u/R
Psier20	F: PET-CCATGTGACAGAACAGAAAA-3' R: 5'-GTTTCTTATGTGATTGAATGGATATGG-3'	58°C	1.5x	3 mM	0.3 µM	0.25 u/R
Psier21	F: NED-ATCCATTCAATCACATGGTAAA-3' R: 5'-GTTTCTTAACCTATGGGGATTATGTATCT-3'	58°C	1.5x	3 mM	0.3 µM	0.25 u/R
Psier29	F: NED-TTGATTGAGTTTATCACACG-3' R: 5'-GTTTCTTGAACCTTGAGGACACTCCTTT-3'	62°C	1.125x	2.25 mM	0.4 µM	0.25 u/R
Psier40	F: VIC-ACAACCATCTAAACACACACA-3' R: 5'-GTTTCTTATCGCCACTCTCAGGATTAC-3'	54°C	1.5x	2.5 mM	0.4 µM	0.2 u/R
Psier51	F: PET-AAAAGTTTGGAACACCTGTAA-3' R: 5'-GTTTCTTGCAAATCAAGAAAATCAACA-3'	53°C	1.125x	3 mM	0.4 µM	0.25 u/R

6.3.3 Calibración de loci microsatélites y medidas de diversidad genética por sitio de muestreo.

Para los tipos de análisis que se llevaron a cabo en este estudio, es deseable que los marcadores microsatélites utilizados reúnan, entre otras características, permitir una genotipificación consistente y amplificación de todos los alelos, aportar información independiente entre sí, ser selectivamente neutrales, heredarse de manera Mendeliana y no presentar homoplasia (Selkoe y Toonen, 2006).

Para verificar la precisión de la genotipificación, ésta se realizó por duplicado, desde la amplificación hasta la asignación de tallas a cada alelo, en 48 individuos, para posteriormente calcular la tasa media de error por alelo (razón entre el número de inconsistencias alélicas y el número de alelos replicados) y la tasa media de error por locus (razón entre el número genotipos unilocus que incluyen al menos una inconsistencia alélica y el número de genotipos unilocus replicados) según Pompanon *et al.* (2005).

Para probar que los loci microsatélites no estuvieran ligados, se realizaron pruebas exactas de desequilibrio de ligamiento gamético por el método de Fisher en el programa GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008), utilizando cadenas de Markov con parámetros por defecto y 10,000 permutaciones para determinar la significancia estadística de las pruebas, aplicando la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

De cada sitio de muestreo se valoró el equilibrio de Hardy-Weinberg que es uno de los pilares centrales sobre los que se ha construido gran parte de la teoría de la genética de poblaciones. Se trata de un modelo que establece que las frecuencias alélicas de una población se mantendrán constantes a lo largo de las generaciones si se cumplen condiciones de panmixia, es decir reproducción aleatoria entre todos los miembros de la población. Muchos fenómenos que suceden en las poblaciones, como la deriva genética, la selección natural, la selección sexual o los sistemas de reproducción, la mutación y la migración, entre otros, pueden ocasionar desviaciones de los valores esperados bajo este modelo. Por lo tanto, saber si una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, o qué tanto se desvía de él, permite hacer inferencias sobre las fuerzas evolutivas que moldean la variación genética de los loci microsatélites en dicha población. Se utilizaron pruebas exactas de Fisher, implementadas en el programa GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) en las que se estimó el valor de F_{IS} según Weir y Cockerham (1984) utilizando cadenas de Markov con parámetros por defecto y 10,000 permutaciones para calcular la probabilidad de que las heterocigocidades observadas se desvíen significativamente de las esperadas.

Se utilizó el programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004), que analiza los patrones de reconocimiento de alelos, y determina si las desviaciones observadas al equilibrio de Hardy-Weinberg pudieran deberse a alguno de tres fenómenos, a saber, la presencia de alelos nulos (alelos que no se amplifican exitosamente debido a mutaciones en la zona de unión de los cebadores); la amplificación pobre de alelos de mayor talla o número de motivos repetidos por competencia con alelos de menor talla que son amplificados más rápido y en mayor cantidad (“allelic dropout” en inglés); o la confusión en el reconocimiento de alelos entre individuos homocigotos y heterocigotos por la presencia de bandas numerarias (“stutters” en inglés). Además se utilizó el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007) para estimar específicamente la frecuencia de alelos

nulos por locus por sitio de muestreo mediante el algoritmo esperanza-maximización (EM) de Dempster *et al.* (1977).

Por último, se verificó la neutralidad de los microsatélites, utilizando el programa LOSITAN (Antao *et al.*, 2008), el cual implementa el método de Beaumont y Nichols (1996), en el que se considera que los niveles de endogamia que experimentan diferentes loci neutrales deben ser iguales debido a su historia demográfica compartida. Tomando en cuenta esto se genera una distribución nula y al proyectar todos los loci en una gráfica de valores de F_{ST} y heterocigosidad, cualquier locus que se aparte significativamente de esta distribución presumiblemente estaría bajo el efecto de la selección. El análisis se llevó a cabo utilizando 500,000 simulaciones, valor medio de F_{ST} neutral y forzado, y los demás parámetros por defecto, probando ambos modelos mutacionales disponibles: alelos infinitos y un paso (“stepwise” en inglés).

Además se obtuvieron otras medidas de diversidad por locus por sitio de muestreo como el número de alelos y los alelos efectivos con el programa GENEALEX 6.5 (Peakall y Smouse; 2006, 2012) y la riqueza alélica en el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet; 1995, 2002).

6.3.4 Determinación del número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional

6.3.4.1 Análisis factorial de correspondencia

Como un acercamiento inicial, se realizó un análisis factorial de correspondencia que es de utilidad porque permite de una manera rápida y computacionalmente sencilla, visualizar gráficamente la estructuración genética de los sitios de muestreo bajo estudio. Para esto, condensa toda la información de variabilidad genética aportada por las frecuencias alélicas de los diferentes loci, en una cantidad reducida de n vectores ortogonales (independientes entre sí), los cuales se representan en planos cartesianos. Luego cada individuo se representa como un punto dentro de una nube ubicada en este espacio de n dimensiones, donde los puntos más cercanos entre sí son los más parecidos genéticamente. Este análisis se realizó en el program GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004), con la base de datos

completa y también excluyendo al sitio CCA, para ver si al remover la influencia de *P. atromedia* se revelaba mayor detalle en las agrupaciones dentro de *P. sierra*.

6.3.4.2 Análisis discriminante de componentes principales

Un método analítico similar al anterior es el análisis discriminante de componentes principales (Jombart *et al.*, 2010). Éste combina las bondades de ambos métodos multivariados que le dan nombre. Permite en primera instancia, condensar la información de las variables originales, en este caso los alelos, haciendo combinaciones lineales (componentes principales) con las que se busca maximizar la varianza entre grupos al mismo tiempo que minimizar la que se encuentra dentro de grupos. A partir de allí, en segunda instancia, se crean variables sintéticas (funciones discriminantes) que permiten calcular probabilidades de pertenencia de cada individuo a los diferentes grupos, los cuales pueden ser estimados o ser definidos *a priori*. En este caso se definieron *a priori*, considerando un primer análisis con los sitios tal como se muestrearon; un segundo análisis excluyendo a *P. atromedia* para eliminar su influencia por ser una especie distinta; y un tercero en el que además se agruparon los sitios de Ensenada y California buscando una diferenciación más clara entre grupos. Todos estos análisis se llevaron a cabo en el paquete “adegenet” (Jombart, 2008) en el lenguaje y entorno de programación R (R Development Core Team, 2008).

6.3.4.3 Estadísticos F de Wright

Su uso es una forma de estimar el número y la estructura genética de un grupo de poblaciones basándose en el cálculo del nivel de diferenciación entre los valores observados y esperados de heterocigosidad a diferentes niveles jerárquicos dentro de la población (estadísticamente hablando), desde el nivel de individuos considerados dentro de subpoblaciones (F_{IS}) hasta individuos en la población total (F_{IT}), pasando por las subpoblaciones dentro de la población total (F_{ST}). Así, los valores de F_{ST} indican el grado de diferenciación que existe entre las subpoblaciones dentro de una población, en relación

con la diferenciación que existe entre los individuos dentro de la subpoblación y a través de toda la población. En el caso de los F_{ST} sus valores varían de 0 a 1 donde 0 indica una sola población (es decir que las subpoblaciones no son diferentes entre sí) y 1 indica dos subpoblaciones completamente distintas. Para poder estimar el grado de diferenciación entre las sitios muestreados, se calcularon los valores de F_{ST} según Weir y Cockerham (1984) entre todos los pares posibles de sitios, utilizando para ello el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004) con el método de permutación de alelos (1,000 permutaciones) para calcular la significancia estadística, la cual fue posteriormente ajustada con la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

6.3.4.4 Análisis de asignación a grupos por probabilidades bayesianas

Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007). Este programa asigna a cada individuo a uno de K grupos (donde K es un número desconocido) con cierta probabilidad de pertenecer a cada grupo. Para lograr esto, el programa asume un modelo en el que existen K grupos y los individuos son asignados aleatoriamente a 1 a K grupos buscando el modelo que maximice el equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento gamético dentro de los grupos. Para esto se trabaja con dos parámetros de interés, Z y P , que representan las poblaciones de origen de los individuos y la frecuencias alélicas en todas las poblaciones, respectivamente, y que son inferidos utilizando el método de cadenas de Markov Monte Carlo, el cual es útil para obtener muestras aproximadas de una distribución de probabilidad cuando ésta no puede ser simulada directamente.

El hecho de que este método trabaja con asignación de individuos, y de que no requiere información previa sobre la pertenencia de cada individuos a cierta población, lo hace muy versátil, pues puede usarse para aplicaciones tan variadas como demostrar la presencia de estructura genética dentro de la población global, identificar poblaciones distintas genéticamente e identificar migrantes e individuos de ancestría mezclada. Todas estas capacidades fueron aprovechadas en el presente estudio.

Todos los análisis fueron ejecutados bajo las mismas condiciones y parámetros: modelo de mezcla de poblaciones (apropiado en este caso porque se esperaba encontrar flujo genético entre varios de los sitios de muestreo) y modelo de frecuencias correlacionadas (recomendado cuando la diferenciación genética no es muy marcada); período de pre-simulación de 10,000 iteraciones seguido de 100,000 iteraciones para la cadena de Markov, de una a 12 poblaciones; y 15 repeticiones del análisis para verificar la consistencia de los resultados obtenidos.

Este análisis se realizó incluyendo los nueve sitios de muestreo y se repitió incluyendo solamente los ocho de *P. sierra*, para así quitar del análisis la influencia de la población de *P. atromedia* que, como se esperaba, resultó con marcada diferenciación genética (ver resultados).

Los resultados obtenidos en cada análisis de STRUCTURE fueron analizados en el programa STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl y vonHoldt, 2012), el cual implementa el método de Evanno *et al.* (2005) para estimar el número correcto de grupos (K). Para esto el programa utiliza un estadístico *ad hoc*, ΔK , que se basa en la razón de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos en valores sucesivos de K , con el cual se detecta el nivel más superficial de estructura de entre los escenarios probados.

Una vez que se determinó el número más probable de K , los resultados fueron ingresados al programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007) el cual utiliza diversos algoritmos de permutaciones para alinear los diferentes resultados obtenidos en cada réplica (en este caso 15) de análisis en STRUCTURE. Se utilizaron los algoritmos Greedy y LargeKGreedy, con hasta 100,000 permutaciones para obtener los resultados condensados de las 15 réplicas. Finalmente los resultados arrojados por el programa CLUMPP fueron graficados utilizando el programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2003).

6.3.4.5 Análisis de varianza molecular

El análisis de varianza molecular (AMOVA), implementado en el programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010), es un análisis que utiliza una aproximación parecida a la de un ANOVA para separar la variación genética total en componentes dentro y entre

poblaciones y agrupaciones, añadiendo niveles jerárquicos adicionales de los que se obtienen con índices de fijación similares a los de Wright (F_{CT} , F_{SC}). A partir de las frecuencias alélicas se crean vectores entre los cuales se calculan distancias euclidianas, y con ellas se conforma una matriz que es la que puede analizarse bajo un esquema similar al del ANOVA para así obtener los índices de fijación que describen la variación en los diferentes niveles jerárquicos (Excoffier *et al.*, 1992). La significancia estadística de estos índices se evalúa mediante una aproximación no paramétrica que utiliza permutaciones de frecuencias, individuos y sitios de muestreo para generar distribuciones nulas. Los análisis llevados a cabo en este estudio utilizaron 10,000 permutaciones. Al ser un método heurístico, el AMOVA pone a prueba diferentes modelos previamente definidos para determinar cuáles explican mayor varianza entre grupos en comparación a dentro de sitios y entre sitios dentro de grupos, y por lo tanto corresponden mejor con el número y la estructura genética real de las poblaciones. Para el presente estudio se pusieron a prueba varios modelos, de los cuales sólo se explican a continuación, los más relevantes por la significancia de los resultados o por la importancia del modelo en relación con las hipótesis planteadas. Con excepción del modelo “Especies”, el resto se pusieron a prueba en dos modalidades, utilizando los nueve sitios muestreados genéticamente y utilizando ocho, excluyendo a CCA que corresponde a *P. atromedia*, para así librar al análisis de su influencia. Por lo tanto en la modalidad de nueve sitios, siempre se incluyó un grupo adicional (conformado por CCA) a los descritos a continuación:

- a) Modelo “Especies”: se puso a prueba únicamente en la modalidad de nueve sitios. Un grupo incluyó a *P. atromedia* (CCA) y el otro, al resto de los sitios (NOV, ENS1-ENS4, TCT y SCA1-SCA2) que corresponden a *P. sierra*.
- b) Modelo “Linajes”: se comparó, en un grupo, el linaje mitocondrial de California (SCA1-SCA2), contra el linaje de la península de Baja California (NOV, ENS1-ENS4 y TCT) en el otro grupo.
- c) Modelo “Geográfico”: pretendió representar las distancias geográficas entre sitios de muestreo, con NOV en un grupo y todos los sitios de Ensenada, Tecate y California (ENS1-ENS4, TCT y SCA1-SCA2) en otro.

d) Modelo “Cortejos”: los grupos se constituyeron de acuerdo a los resultados de descripción de comportamientos en los que se encontró un tipo de comportamiento para *P. atromedia* (grupo CCA) y otro para *P. sierra* incluyendo algunos sitios de muestreo con el Patrón A (grupo ENS1-ENS3, TCT y SCA1-SCA2) y otros con el Patrón B (grupo NOV y ENS4).

e) Modelo “Structure K3”: basado en los resultados del análisis con F_{ST} y del programa STRUCTURE utilizando los 9 sitios de muestreo, en el que encontraron tres grupos definidos por los sitios CCA, TCT y NOV. Debido a que el resto de los sitios no constituyeron un grupo por sí mismos y a que la mayoría de los individuos que los componían mostraron más afinidad con NOV, el tercero grupo se conformó con NOV, ENS1-ENS4 y SCA1-SCA2.

f) Modelo “Structure K4”: basado en los resultados del análisis con F_{ST} y del programa STRUCTURE utilizando ocho sitios de muestreo y excluyendo a CCA. Un grupo constituido por NOV, otro por ENS1-ENS4, otro por TCT y otro por SCA1-SCA2.

6.3.4.6 Construcción de dendrograma

Se utilizaron varios programas que forman parte del paquete PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2005) para la construcción de un dendrograma que representa las relaciones de similitud genética actual entre las distintas poblaciones de *P. sierra* y *P. atromedia*. No se representa una historia de ancestría común entre ellas, debido a que las poblaciones no se encuentran reproductivamente aisladas unas de otras y existe flujo genético entre ellas, por lo que la diferenciación entre ellas no representa un proceso de bifurcación. Los árboles filogenéticos intraespecíficos deben ser interpretados tomando esto en cuenta (Nason, 2011). Como primer paso, se generaron múltiples conjuntos de datos a partir del original utilizando 10,000 remuestreos con el programa SEQBOOT. Luego estos conjuntos de datos se ingresaron al programa GENDIST donde se calcularon las distancias de la cuerda D_{CSE} de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), que es una distancia que asume que las diferencias entre poblaciones se deben únicamente a la deriva genética (no existe un

modelo mutacional de por medio) y que los tamaños de las poblaciones son diferentes y sujetos a cambios a través del tiempo, de modo que si el tamaño de la población se duplica, el efecto de la deriva genética se reduce y la magnitud de la distancia genética deberá aumentar a la mitad de la velocidad (Felsenstein, 1986-2008). Posteriormente a partir de las matrices de distancias genéticas se calcularon los árboles no enraizados mediante el método de Neighbor-Joining, utilizando para tal fin el programa NEIGHBOR. Por último, utilizando el programa CONSENSE se obtuvo un árbol consenso con los valores de confiabilidad de cada agrupación. Este árbol consenso fue visualizado en el programa DENDROSCOPE 3.2.3 (Huson y Scomavacca, 2012).

6.3.4.7 Aislamiento por distancia

Se llevó a cabo un análisis de aislamiento por distancia, el cual permite verificar una estructura que se determina mediante la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Dado que se trata de encontrar la correlación entre dos matrices, se requiere de una prueba de Mantel para evaluarla. En este caso, para cada par de sitios de muestreo se utilizaron distancias de la cuerda D_{CSE} de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) calculadas en el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007) y distancias geográficas calculadas a partir de las coordenadas geográficas de cada sitio de muestreo, usando el programa GEOGRAPHIC DISTANCE MATRIX GENERATOR 1.2.3 (Ersts, internet). Luego ambas matrices se ingresaron al programa IBDWS 2.23 (Jensen *et al.*, 2005) donde se estimó la correlación utilizando 30,000 repeticiones. Asimismo, se repitieron los análisis sustituyendo las distancias de la cuerda por valores pareados de F_{ST} , calculados en el programa GENETIX4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004).

La correlación entre ambos juegos de datos se obtuvo para todos los sitios de muestreo y diferentes subconjuntos, con el objetivo de evaluar el efecto producido por la supresión o adición de diversos sitios y poder ver si algunos en específico mostraban un patrón más marcado de aislamiento por distancia entre ellos.

6.4 Comparación entre los patrones de cortejo, los patrones filogenéticos mitocondriales, la estructuración genética actual de las poblaciones de *P. sierra* y los eventos vicariantes propuestos en la literatura.

Para evaluar si los procesos de especiación y diversificación de linajes se explican mejor por selección sobre el comportamiento de cortejo que por los eventos vicariantes que se han propuesto como determinantes de la historia geológica y biogeográficas de la península de Baja California (Grismer, 1994; Murphy y Aguirre-León, 2002) se compararon los patrones filogeográficos tal como los proponen Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) y se añadió la información de genética poblacional y de patrones de comportamiento que ha sido descrita en las secciones anteriores del presente estudio. En cuanto a los eventos vicariantes se tomaron en cuenta los citados por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) así como el canal transpeninsular cuya señal ha sido detectada en varias especies de vertebrados (Riddle *et al.*, 2000c; Riddle y Hafner, 2006; Grismer, 1994; Murphy y Aguirre León, 2002) y en una araña (Crews y Hedin, 2006), y la subdivisión de la Transgresión Norteña en las Formaciones Imperial y Bouse (Wood *et al.*, 2008). Ya que estas fuentes de información son de naturaleza distinta y no se tiene conocimiento de algún procedimiento que permita hacer una comparación estadística conjunta de todas ellas, se propone aquí un acercamiento que se basa en los principios de concordancia genealógica propuestos por Avise y Ball (1990), los cuales ofrecen un marco teórico mediante el cual se puede comparar y analizar esta información.

Para los objetivos e hipótesis perseguidos en este estudio, de los cuatro aspectos de concordancia propuestos por Avise (2004), el aspecto II, concordancia entre las genealogías de múltiples genes o loci dentro de una misma especie, es el que se tomó en cuenta debido a que es el que tiene lugar a nivel de especies.

Para facilitar la interpretación y comparación, la información analizada fue desglosada en un cuadro comparativo en el que se incluyeron los eventos vicariantes, las estimaciones de tiempos absolutos de divergencia del ADN, los valores de F_{ST} entre poblaciones y la cantidad de elementos de cortejo o movimientos compartidos entre

poblaciones. Cada una de estas cuantificaciones representa una discontinuidad, ya sea genética o conductual. A cada discontinuidad, se le dio un valor jerárquico de acuerdo a su magnitud (o antigüedad en el caso de los eventos vicariantes). Así la mayor discontinuidad en ADN mitocondrial es el nivel 1, la siguiente 2 y así sucesivamente, y lo mismo para las discontinuidades inferidas a partir de microsatélites y de movimientos de cortejo. Esto permitió evaluar si había o no concordancia temporal, es decir, si dos discontinuidades que concuerdan por los grupos de poblaciones en que se presentaron, también concuerdan por su orden cronológico de aparición (inferido a partir de su magnitud) con respecto a otras discordancias.

Los escenarios más simples, pero no exhaustivos, que se podrían esperar y sus interpretaciones de acuerdo a las hipótesis planteadas son:

- a) Que las discontinuidades genéticas, en especial las mitocondriales, concuerden con eventos vicariantes pero las discontinuidades de cortejo no. Esto indicaría que ha habido especiación alopátrica como resultado del aislamiento de las poblaciones por barreras físicas de gran magnitud.
- b) Que las discontinuidades genéticas, en especial las mitocondriales concuerden con las discontinuidades de cortejo pero no con eventos vicariantes. Esto daría lugar a interpretar que la aparición de cortejos diferenciados que han estado sujetos a selección por parte de las hembras han sido los responsables de procesos de especiación simpátrica que han provocado la diversificación de linajes y especies.
- c) Que tanto las discontinuidades de cortejo como las discontinuidades genéticas, en especial las mitocondriales, concuerden con los eventos vicariantes. La interpretación más plausible en este caso sería que la especiación ha sido alopátrica como se sugiere en el inciso a), acompañada de aparición de diferencias en el cortejo como subproducto del aislamiento entre poblaciones.
- d) Si ninguna de las discontinuidades concuerdan entre sí ni con los eventos vicariantes, podrían existir explicaciones alternativas como, entre otros, especiación ecológica o eventos vicariantes no propuestos con anterioridad, que tendrían que ponerse a prueba.

6.5 Evidencias de hibridación

Se evaluó la existencia de hibridación y el papel del cortejo como barrera de aislamiento a nivel de especies, particularmente entre *P. sierra* y *P. atromedia* y a nivel de los dos linajes mitocondriales previamente encontrados por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) dentro de *P. sierra*: el linaje de California, E.U.A. y el de la península de Baja California. Se utilizó tanto información de los experimentos de cortejo y apareamiento como de los análisis de genética poblacional.

6.5.1 Evidencias conductuales

Para el caso de obtener hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia*, se analizaron los cortejos de ambas especies en busca de cortejos intermedios, en el sentido de que presentaran una mezcla de los movimientos característicos de cada una de las especies parentales. No se realizaron experimentos de comportamiento porque no se contó con ejemplares de estas dos especies en cautiverio al mismo tiempo.

Para detectar la hibridación entre los dos linajes de *P. sierra* (el de California, E.U.A. y el de la península de Baja California) determinados por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) con base en análisis de ADN mitocondrial, se analizaron los cortejos de los dos linajes y además se llevaron a cabo experimentos de apareamiento con los que se comparó la frecuencia de aceptación de los machos por parte de las hembras en varios tipos de cruzas. Estas cruzas o emparejamientos se diseñaron de modo que permitieran evaluar el efecto de pertenecer a uno u otro linaje o de la proximidad geográfica entre sitios de origen. Se llevaron a cabo tres tipos de emparejamientos:

- a) Interlinaje corto, en las que se utilizó un macho o hembra del linaje de California (sitios de muestreo SCA1, SCA2 o SCA3) y un individuo del sexo complementario del linaje de la península de cualquiera de los sitios de muestreo de Ensenada o Tecate (ENS1, ENS2, ENS3, ENS4 o TCT).

b) Interlinaje largo, en las que se utilizó un macho o hembra del linaje de California (sitios de muestreo SCA1, SCA2 o SCA3) y un individuo del sexo complementario del sitio de muestreo NOV del linaje de la península.

c) Intralinaje, en las que se utilizó un macho y una hembra del mismo (cinco casos) o diferente (tres casos) sitio de muestreo, pero del mismo linaje.

En cada tipo de apareamiento se llevaron a cabo trece, ocho y ocho repeticiones de cruza, respectivamente. La conducción de estos experimentos se hizo bajo las condiciones descritas en el apartado precedente “Experimentos de cortejo”.

6.5.2 Evidencias genéticas

Las aproximaciones de asignación de individuos a grupos genéticos por probabilidades bayesianas utilizando marcadores moleculares se han implementado con frecuencia para determinar la existencia de híbridos y/o introgresión (Pritchard *et al.*, 2000; Mallet, 2005; Sanz *et al.*, 2009). Particularmente en el programa STRUCTURE, para esto se utiliza el modelo de mezcla de poblaciones que asume que cada individuo i puede tener ancestría mezclada, habiendo heredado una fracción q de su genoma a partir de ancestros de cada una de diversas k poblaciones. Como resultado se obtienen para cada individuo, los estimados medios posteriores de las proporciones de cada población K en su genoma. De este modo se puede detectar la existencia de hibridación y retrocruzas con las especies parentales, dependiendo de la proporción del genoma heredada de cada grupo en cada individuo.

En el presente estudio, con el fin de detectar evidencias de hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia* y entre los dos linajes mitocondriales dentro de *P. sierra*, se interpretaron los resultados de los dos análisis realizados en el programa STRUCTURE descritos en la sección “Determinación del número de poblaciones”. Se consideraron como individuos de ancestría mezclada todos los que tuvieron menos del 88% de proporción (q) de un solo grupo. En referencia específica a la hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia*, todos los individuos que no pertenecieran al sitio de CCA y que tuvieron más del 12% de proporción del grupo definido por CCA, se consideró que tenían ancestría mezclada entre las dos especies. En referencia a la ancestría mezclada entre los linajes mitocondriales

dentro de *P. sierra*, el de California y el de la península de Baja California, se consideró como individuos de ancestría mezclada entre estos dos linajes, a los recolectados en los sitios NOV, ENS1-ENS4 y TCT que tuvieran un mínimo de 12% de probabilidades de asignación o coeficiente de membresía al grupo definido por SCA, y a los recolectados en los sitios SCA1 y SCA2 que tuvieran un máximo de 88% de probabilidades de asignación o coeficiente de membresía al grupo definido por SCA.

RESULTADOS

6.6 Trabajo de campo y mantenimiento de ejemplares en cautiverio

No se encontraron hembras con morfotipos de diferentes especies en un mismo sitio de muestreo. Las hembras del sitio CCA pertenecieron a *P. atromedia* y en el sitio MTY, se recolectó a *P. sura*. En el resto de los sitios, que se encontraban en la península de Baja California y sur de California, se encontró a *P. sierra*. No se encontraron morfotipos de *P. atromedia* en los sitios del sur de California.

De los 120 ejemplares de *P. sierra* recolectados vivos durante los muestreos de mayo de 2011 (sitios de Ensenada, Tecate y California, E.U.A.), aproximadamente el 30% perecieron durante los días de recolectas o en las dos semanas posteriores a éstas. Para el momento de iniciar los experimentos de comportamiento, aproximadamente la mitad de los recolectados originalmente permanecían vivos.

6.7 Descripción del cortejo de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*

De un total de 49 experimentos realizados (29 de *P. sierra*, 4 de *P. sura* y 5 de *P. atromedia*, utilizando machos y hembras; y 11 de machos solos de *P. sierra*, ver Tabla III), en 40 (82%), los machos exhibieron alguna forma de cortejo. El tiempo efectivo de cortejo varió desde menos de un minuto (5% del tiempo total) hasta poco menos de 10 minutos (50% del tiempo total). El cortejo fue inmediato o pudo llegar a iniciarse hasta después de 10 minutos después de colocar al macho en el sustrato. El macho P14, además de no cortejar, fue atacado por dos hembras distintas, una del mismo sitio de muestreo y la otra de sitio y linaje distinto. El macho murió durante este segundo ataque.

En los experimentos de cortejo con machos solos de *P. sierra*, se observó que en general éstos realizaron los mismos movimientos (ver descripciones más adelante) que

cuando estaban en presencia de las hembras, apoyando la idea de que las feromonas de la hembra en el sustrato son suficientes para provocar la respuesta de cortejo de los machos.

El papel de las hembras durante el cortejo fue pasivo comparado con el de los machos. Sus movimientos fueron simples, poco variables y no aportaron información relevante para este estudio. Estos consistieron en tocar a los machos con sus patas delanteras en algunas ocasiones, sobre todo antes del apareamiento, o posicionarse frente a éste, realizando movimientos laterales, para dejarlo acercarse.

Tabla III. Experimentos de apareamiento y cortejo de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* ordenados cronológicamente. TE = Tipo de emparejamiento (IN =Intralinaje, L = Interlinaje largo, C = Interlinaje corto, M = Machos solos estimulados con feromonas de la hembra indicada pero sin su presencia física), ♀ y ♂ hembra y macho utilizados con sitio de origen entre paréntesis. C = presentó cortejo, A = presentó apareamiento. *Individuos vírgenes †No se utilizó la hembra, sólo sus feromonas.

Especie	TE	Fecha	Hora	♀	♂	C	A	Observaciones
<i>P. sierra</i>	IN	10/10/11	20:00	A5 (ENS4)	A11 (ENS4)	X		
<i>P. sierra</i>	IN	11/10/11	1:00	P11 (LPZ)	P14 (LPZ)			Macho atacado por hembra
<i>P. sierra</i>	IN	11/10/11	2:00	P17 (LPZ)	P9 (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	IN	14/10/11	5:00	C20 (SCA1)	C22 (SCA1)	X		
<i>P. sierra</i>	L	14/10/11	6:00	C7* (SCA1)	P3 (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	C	14/10/11	7:00	K1* (ENS1)	B13 (SCA2)	X		
<i>P. sierra</i>	L	16/10/11	20:30	C7* (SCA1)	P29 (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	IN	16/10/11	21:10	C9 (SCA1)	C22 (SCA1)	X	X	
<i>P. sierra</i>	C	18/10/11	21:50	A17* (ENS4)	B13 (SCA2)	X		
<i>P. sierra</i>	IN	18/10/11	22:30	K1* (ENS1)	F11 (TCT)	X		
<i>P. sierra</i>	IN	18/10/11	23:40	P11 (LPZ)	H14 (ENS5)	X		
<i>P. sierra</i>	L	19/10/11	21:30	C20 (SCA1)	P18 (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	IN	19/10/11	22:10	P21 (LPZ)	F6* (TCT)	X		
<i>P. sierra</i>	C	20/10/11	22:45	F17* (TCT)	B13 (SCA2)	X		
<i>P. sierra</i>	C	20/10/11	23:25	K4* (ENS1)	C22 (SCA1)	X	X	Hembra produjo ovisaco
<i>P. sierra</i>	C	22/10/11	3:25	C14* (SCA1)	J16* (ENS3)	X		
<i>P. sierra</i>	C	22/10/11	4:20	D6* (SCA3)	A2* (ENS4)	X		
<i>P. sierra</i>	L	24/10/11	4:50	C7* (SCA1)	P23 (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	C	24/10/11	5:30	C14* (SCA1)	J4 (ENS3)	X		
<i>P. sierra</i>	L	24/10/11	6:10	P21 (LPZ)	C22 (SCA1)	X		
<i>P. sierra</i>	L	25/10/11	23:15	C5* (SCA1)	P14 (LPZ)			Macho muerto por hembra
<i>P. sierra</i>	L	25/10/11	23:50	M3* (LPZ)	C22 (SCA1)	X		
<i>P. sierra</i>	L	26/10/11	0:25	P21 (LPZ)	B13 (SCA2)	X		
<i>P. sierra</i>	C	27/10/11	2:55	C14* (SCA1)	F6* (TCT)	X		
<i>P. sierra</i>	C	27/10/11	3:40	C7* (SCA1)	J16* (ENS3)	X		
<i>P. sierra</i>	C	27/10/11	4:30	D6* (SCA3)	K2 (ENS1)	X		
<i>P. sierra</i>	C	27/10/11	22:20	C5* (SCA1)	F11 (TCT)	X		
<i>P. sierra</i>	C	27/10/11	23:00	J23* (ENS3)	B13 (SCA2)	X		
<i>P. sierra</i>	C	27/10/11	23:40	J17* (ENS3)	C22 (SCA1)	X		

Tabla III. Continuación

Especie	TE	Fecha	Hora	♀	♂	C	A	Observaciones
<i>P. sura</i>	-	04/02/12	3:15	N2 (MTY)	N4 (MTY)			
<i>P. sura</i>	-	05/02/12	22:30	N1 (MTY)	N5 (MTY)	X		
<i>P. sura</i>	-	05/02/12	22:40	N2 (MTY)	N5 (MTY)	X		
<i>P. sura</i>	-	06/02/12	6:15	N2? (MTY)	N3? (MTY)	X		
<i>P. sierra</i>	M	14/01/12	17:50	C14* [†] (SCA1)	B2 (SCA2)			
<i>P. sierra</i>	M	14/01/12	18:05	C14* [†] (SCA1)	C22 (SCA1)			
<i>P. sierra</i>	M	14/01/12	18:20	J18* [†] (ENS3)	J20 (ENS3)	X		
<i>P. sierra</i>	M	14/01/12	18:50	M6* [†] (LPZ)	P3 (LPZ)			
<i>P. sierra</i>	M	07/01/12	17:15	M6* [†] (LPZ)	P23 (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	M	07/01/12	17:35	J13* [†] (ENS3)	J4 (ENS3)	X		
<i>P. sierra</i>	M	07/01/12	18:55	C14* [†] (SCA1)	C22 (SCA1)			
<i>P. sierra</i>	M	08/01/12	16:40	J13* [†] (ENS3)	J16* (ENS3)	X		
<i>P. sierra</i>	M	08/01/12	16:55	C14* [†] (SCA1)	B13 (SCA2)	X		
<i>P. sierra</i>	M	08/01/12	17:10	M6* [†] (LPZ)	M4* (LPZ)	X		
<i>P. sierra</i>	M	08/01/12	17:18	C14* [†] (SCA1)	C22 (SCA1)			
<i>P. atromedia</i>	-	09/12/12	1:25	MD1* (CCA)	MD7* (CCA)	X		
<i>P. atromedia</i>	-	09/12/12	1:48	MD1* (CCA)	MD8* (CCA)			
<i>P. atromedia</i>	-	09/12/12	3:43	MD1* (CCA)	MD9* (CCA)	X	X	Cópula interrumpida por observ.
<i>P. atromedia</i>	-	10/12/12	1:20	MD1* (CCA)	MD11* (CCA)	X	X	Cópula interrumpida por observ.
<i>P. atromedia</i>	-	10/12/12	2:00	MD1* (CCA)	MD12* (CCA)	X		

6.7.1 Elementos básicos de los cortejos

Los cortejos exhibidos por los machos de las tres especies fueron distintos, siendo los de *P. sura* y *P. atromedia* más parecidos entre sí y el de *P. sierra* el más diferenciado. Se identificaron siete movimientos estereotipados más conspicuos que componían la parte medular de los cortejos y se describen en el siguiente párrafo. *P. sierra* presentó, exclusivamente, los movimientos I, II, III y IV (un macho de LPZ presentó, en una única ocasión, un movimiento muy similar al V, pero no se descartaría que sea una coincidencia). Machos de *P. sierra* de todos los sitios presentaron los movimientos I, II, III y IV, con excepción del macho de ENS5 que sólo presentó movimiento I. *P. sura* y *P. atromedia* presentaron el movimiento VII en común entre las dos especies, así como un elemento similar pero exclusivo de cada una, el V en *P. sura* y el VI en *P. atromedia*. En la Tabla IV se sintetizan las diferencias en los cortejos entre especies y a continuación se describen estos movimientos:

a) Movimiento I. Percusión (Video 1, ver disco compacto con material adicional). El macho con sus ocho patas en el sustrato, levanta y baja todo su cuerpo enérgicamente y en sucesiones inmediatas de hasta ocho repeticiones en poco más de un segundo. Cada vez que lo baja, golpea el sustrato con abdomen y/o pedipalpos, casi siempre simultáneamente, produciendo un sonido corto y seco.

b) Movimiento II. Posible Estridulación (Video 2, ver disco compacto con material adicional). El macho levanta sus dos patas anteriores, y manteniendo las demás firmes en el sustrato, inclina ligeramente su cuerpo hacia atrás formando un ángulo de 20 grados con respecto a la horizontal, entonces recoge las patas anteriores y las eleva hacia los lados de su dorso, de tal manera que los fémures quedan en posición vertical y las tibias en posición horizontal moviéndolas en repetidas ocasiones, a muy alta velocidad con movimientos vibratorios hacia arriba y hacia abajo de modo que en la posición más extrema del movimiento, las tibias alcanzan ángulos de 15 a 20 grados con respecto de su posición inicial. Durante estos movimientos la araña produce un sonido similar al que se haría con un raspador. La limitada velocidad de filmación de las cámaras utilizadas, no permitió la identificación del mecanismo de producción de este sonido.

c) Movimiento III. Tremulación (Video 3, ver disco compacto con material adicional). Es un movimiento de vaivén del cuerpo hacia adelante y hacia atrás. Comienza con un golpe del abdomen en el sustrato y luego la proyección del cuerpo hacia el frente seguida de un vertiginoso movimiento hacia atrás, impulsado por las patas delanteras que se estiran también hacia atrás, al cabo del cual el cuerpo queda “rebotando” hasta cuatro veces entre la posición más adelantada (casi un cuerpo entero por delante de la posición original) y la más atrasada (un cuarto de cuerpo por detrás en la posición original), disminuyendo el recorrido total del movimiento con cada rebote. El eje del recorrido tiene quince grados de inclinación con respecto al sustrato. Durante estos rebotes los tres pares de patas posteriores permanecen fijos en el sustrato. Hacia el final del movimiento, cuando el cuerpo deja de moverse, el

abdomen permanece vibrando por fracciones de segundo e impactando con el sustrato al mismo tiempo que las patas delanteras se bajan y vuelven a apoyar. El efecto auditivo resultante de todo el movimiento es similar al que produce un banderín al ser agitado por una fuerte ráfaga de viento.

d) Movimiento IV. Levantamiento de patas delanteras (Video 4, ver disco compacto con material adicional). El macho eleva medio cuerpo por encima de su posición original y levanta sus patas delanteras estirándolas hasta una posición vertical pero con los tarsos hacia el frente formando una “L” invertida. Una pata siempre se levanta primero y se incorpora la otra en fracciones de segundo. Las dos patas permanecen en esta posición cerca de un segundo. A continuación, las patas delanteras se flexionan 45 grados hacia atrás y el cuerpo se recorre hacia abajo y hacia atrás casi hasta tocar el sustrato. Luego se proyecta hacia arriba y vuelve a caer (en ocasiones golpeando el sustrato de forma parecida a la del movimiento I; y en otras, ejecutando movimientos II), bajando las patas delanteras durante esta fase del movimiento. Por lo general, durante el tiempo que las patas delanteras permanecen despegadas del suelo, el macho cruza un pedipalpo sobre el otro y frota los cimbios con los bulbos de sus pedipalpos y alternando sus posiciones. Aunque no se percibió ningún sonido característico de este movimiento, es probable que el macho produzca algún tipo de estridulación al frotar sus pedipalpos.

e) Movimiento V. (Video 5, ver disco compacto con material adicional). Mientras mantiene los tres pares de patas posteriores en contacto con el sustrato, el macho levanta el par delantero, estirándolas completamente hacia arriba y hacia el frente en un ángulo de hasta 80 grados con respecto a la horizontal y las agita ligeramente con una amplitud de aproximadamente diez grados. Por lo general el macho se encuentra fijo al sustrato cuando agita sus patas de esta manera.

f) Movimiento VI. (Video 6, ver disco compacto con material adicional). Movimiento similar al anterior, pero en este caso las patas delanteras no están

completamente estiradas, sino ligeramente flexionadas hacia el frente y hacia fuera en las articulaciones entre fémur y tibia y entre tibia y tarso, de modo que quedan en un ángulo de aproximadamente 60 grados respecto a la horizontal, cuando están en su posición más elevada. Las patas delanteras no se mueven independientemente sino que lo hacen simultáneamente con el resto del cuerpo, como parte de las sacudidas cuando el cuerpo se desplaza hacia delante y atrás aproximadamente a un cuarto de su longitud total. El macho repite este movimiento de una a tres veces, mientras está quieto o caminando y deteniéndose para hacerlo.

g) Movimiento VII. (Video 7, ver disco compacto con material adicional) Comienza con la elevación de las dos patas delanteras (que quedan apuntando hacia arriba) y el cuerpo sobre el sustrato hasta una altura de entre tres y cuatro cuerpos, y la flexión del abdomen de modo que su extremo distal queda apundando hacia el sustrato mientras el rostro permanece dirigido hacia el frente. Luego, el macho baja una de sus patas delanteras, golpea el sustrato con el metatarso y la recoge de nuevo, primero con una pata y luego con la otra, repitiendo alternadamente hasta cuatro veces con cada una. Mientras va realizando esta marcha con las patas delanteras, avanza entrecortadamente, desplazándose un tercio de la longitud del cuerpo por cada avance hacia adelante, y descendiendo hasta dejar el cuerpo a la altura del sustrato hacia el final de la caminata. Las patas de atrás pueden moverse con desplazamientos muy cortos o ser arrastradas.

6.7.2 Desarrollo y patrones de los cortejos

El desarrollo general de los cortejos de *P. sierra* podría esquematizarse de la siguiente manera: tan pronto el macho es depositado sobre el sustrato, empieza a caminar rozándolo con la parte anterior de los cimbios de sus pedipalpos, percibiendo las feromonas de la hembra. Después de esta primera fase, que generalmente dura menos de un minuto, el macho empieza a ejecutar movimientos I y luego movimientos II, intercalándolos entre la caminata. Posteriormente comienza a hacer ciclos que se repiten continuamente y que

duran por lo general menos de dos minutos. Cada ciclo, en términos generales, empieza con el movimiento IV, inmediatamente después el movimiento II o el I y a continuación realiza una caminata errática buscando a la hembra y durante la cual va alternando pausas para ejecutar movimientos I y/o II entre cada caminata. Eventualmente el macho se detiene más o menos cerca de la hembra y ejecuta el movimiento IV hasta cuatro veces, concluyendo así un ciclo normal. El macho permanece inmóvil un rato y luego vuelve a empezar el ciclo. En los casos en que hubo apareamientos, luego de que el macho desplegara uno o varios ciclos completos, la hembra le permitía acercarse para que ambos se tocaran en repetidas ocasiones con sus patas delanteras, antes de permitirle montarla.

El desarrollo del cortejo de *P. sura* es más sencillo. En éste se presenta con frecuencia el movimiento V, el cual en algunas ocasiones va seguido del movimiento VII. Entre los despliegues, transcurren largos períodos de inactividad en que el macho simplemente permanece inmóvil. En una única ocasión se observó que un macho golpeó el sustrato con sus pedipalpos. No se observaron apareamientos en esta especie.

Similar al anterior, en el cortejo de *P. atromedia*, los machos presentan primero el movimiento VI y a continuación el VII. Dado que el VII se despliega con mayor frecuencia, en subsiguientes repeticiones puede o no ir precedido del VI. También aquí los intervalos de inactividad son prolongados. Ambos movimientos, VI y VII, deben presentarse al menos en una ocasión para que la hembra acepte al macho, el cual se aproxima ejecutando el movimiento VII para luego intercambiar con ella toqueteos con las patas delanteras, montarla y copular. En una única ocasión se observó que un macho mantuvo sus patas delanteras inmóviles en el aire durante algunos segundos estirándolos hacia los lados y bajándolos con movimientos pausados.

Frecuentemente los machos de las tres especies fueron interrumpidos antes de terminar el ciclo o despliegue porque la hembra reaccionó, ya sea corriendo o atacando al macho. En estos casos el macho se detiene y vuelve a comenzar el cortejo después de una pausa, que puede llegar a durar varios minutos, aunque la reacción de la hembra no siempre interrumpe el cortejo del macho, pues éste a veces lo continúa a pesar de las reacciones de la hembra.

Las descripciones anteriores de cada movimiento y de los esquemas generales de desenvolvimiento de cortejo para cada especie, corresponden a sus arquetipos, pero en realidad son relativamente variables y se presentan en una gama continua de intensidades y fidelidades. En los casos de *P. sura* y *P. atromedia* hubo un número bajo de réplicas por lo que no se encontraron patrones interespecíficos. Pero en *P. sierra*, dentro de la mencionada variabilidad, y a pesar de que, en todos los sitios menos uno, se presentaron los mismos movimientos, los cortejos se pudieron agrupar en dos patrones que se describen a continuación (Tabla IV):

a) Patrón A (Video 8, ver disco compacto con material adicional). Fue exhibido por los machos de los sitios SCA1, SCA2, TCT, ENS3 y ENS1. Este patrón se caracteriza porque los movimientos I y II se despliegan con baja frecuencia, los I con poca intensidad. La mayoría de los ciclos (más del 70%) incluyen todos los movimientos, pero los I y II no son tan notorios y los III y IV resultan más llamativos. La caminata inmediatamente después del movimiento IV, la realizan con las patas recogidas, más cercanas al cuerpo que al sustrato. Las delanteras, incluso llegan a ir despegadas del sustrato y no se usan para caminar, por lo que resulta un desplazamiento torpe y atropellado, muy a menudo de lado en relación al eje del cuerpo de la araña. Por su parte, el cuerpo va bien despegado del sustrato, de modo que los pedipalpos quedan completamente estirados hacia abajo casi tocando el sustrato. Otra característica es que cuando los machos detienen la caminata, mueven los pedipalpos lateralmente, dibujando un abanico de aproximadamente 45 grados.

b) Patrón B (Video 9, ver disco compacto con material adicional). Fue exhibido por los machos de los sitios LPZ, ENS4 y ENS5. Se trata de un patrón en general menos homogéneo que el anterior. Está caracterizado principalmente porque los movimientos I se realizan con mucha intensidad y junto con los II, son ejecutados con mayor frecuencia (más de 70% de los ciclos), mientras que los movimientos tipo III y IV se exhiben con menor frecuencia (sólo en menos de 30% de los ciclos) y en el caso de los IV a veces son incompletos. Además durante las caminatas, que son

cortas en comparación con las de los machos que presentaron el patrón A, el macho lleva las patas más estiradas hacia fuera y el cuerpo más cerca del sustrato, moviéndolo en forma de vaivén, de lado a lado pero sin despegar las patas del sustrato y caminando siempre hacia el frente. Esto es en el caso de los machos cuyo cortejo es menos diferenciado de los del patrón A. Los más disímiles no presentan movimiento IV en lo absoluto e incluso hubo un caso en el que únicamente se presentó el movimiento I. Además los ciclos suelen ser relativamente cortos y con frecuencia los machos se desplazan persiguiendo a las hembras intentando tocarlas con sus patas delanteras.

Tabla IV. Elementos y patrones de comportamiento desplegados por machos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*. Referirse al texto de resultados para ver descripciones. N(Exp) = Número de experimentos realizados, N (Ind) = Número de machos utilizados. PBC = Linaje de la península de Baja California, C = Linaje de California, E.U.A. De acuerdo con los linajes mitocondriales propuestos por Correa *et al.* (en preparación).

Sitio de muestreo	Especie (linaje)	N (Exp)	N (Ind)	Elementos de Comportamiento (Tipo de Movimiento)							Patrones de Cortejo
				I	II	III	IV	V	VI	VII	
LPZ	<i>P. sierra</i> (PBC)	10	7	X	X	X	X				B
ENS1	<i>P. sierra</i> (PBC)	1	1	X	X	X	X				A
ENS3	<i>P. sierra</i> (PBC)	6	3	X	X	X	X				A
ENS4	<i>P. sierra</i> (PBC)	2	2	X	X	X	X				B
ENS5	<i>P. sierra</i> (PBC)	1	1	X							B
TCT	<i>P. sierra</i> (PBC)	4	2	X	X	X	X				A
SCA1	<i>P. sierra</i> (C)	9	1	X	X	X	X				A
SCA2	<i>P. sierra</i> (C)	7	2	X	X	X	X				A
CCA	<i>P. atromedia</i>	5	5						X	X	-
MTY	<i>P. sura</i>	4	3					X		X	-

Según los análisis estadísticos que compararon los dos patrones de cortejo dentro de *P. sierra* (Tabla V) las diferencias entre patrón A y patrón B, independientemente de los linajes, fueron significativas (después de la corrección de Bonferroni, $P = 0.01$) y tuvieron los valores más altos de probabilidad. Al comparar entre el linaje mitocondrial de California y el de la península de Baja California, independientemente de los patrones, se

encontró que no fue significativo cuando se condensaron las pseudorélicas en un solo dato por individuo, pero, al contrario de lo que se esperaba, sí fue significativo cuando se tomaron las pseudorélicas por separado. El patrón de cortejo A fue desplegado por individuos de los dos linajes mitocondriales, por lo tanto se compararon entre los dos linajes dentro del patrón de cortejo A.

Por otro lado, aunque el patrón B fue exhibido por individuos de un solo linaje, se comparó entre aquellos de Ensenada contra los de La Paz, para ver si la gran distancia geográfica provocaba alguna diferenciación. En todos estos casos, los resultados fueron no significativos, sugiriendo que adentro de cada patrón, la distancia geográfica o la disimilitud genética no tienen efecto sobre el cortejo. Por último, y también de acuerdo a lo esperado, cuando se consideró dentro del linaje con dos patrones (el de la península de Baja California), las diferencias entre ambos sí fueron significativas. Todos estos resultados indican que las diferencias entre patrones de comportamiento, son patentes pero no están determinados por la latitud geográfica de la que provienen los individuos, ni por el linaje mitocondrial al que pertenecen. Además, que en el caso único en que los dos linajes resultaron estadísticamente diferentes, probablemente sea debido a que dentro de uno de ellos se presentaba un fuerte contraste en los cortejos, porque dentro del mismo linaje había sitios con patrón A y otros sitios con patrón B, y no tanto a diferenciación entre linajes *per se*. Estas diez pruebas estadísticas se realizaron también con los datos de movimientos III y IV sin estandarizar (ver sección “Análisis de datos de cortejo” en Materiales y métodos) y en todos los casos los resultados fueron muy similares.

Por último, para descartar la posibilidad de que el tipo de cruce (intra linaje o interlinaje) en el que estuvieran participando los machos, tuviera influencia sobre la intensidad del cortejo, todas las réplicas y pseudorélicas se agruparon sólo bajo el criterio de si los consortes pertenecían al mismo linaje o no y se compararon ambos grupos, una vez más por duplicado, considerando pseudorélicas y condensándolas en un valor por individuo. Las diferencias no fueron significativas ($P= 0.1151$ y 0.3446), por lo que se puede descartar que el diseño experimental utilizado afectara las comparaciones a las que se sometieron los patrones de cortejo.

Tabla V. Pruebas de estadística no paramétrica U de Mann-Whitney para diferenciar cortejos dentro de *P. sierra*, entre patrones (descritos en el texto) y entre los linajes mitocondriales de California, E.U.A. (C) y de la península de Baja California (PBC) considerando pseudorélicas condensadas y sin condensar. “N” = número de réplicas. Como resultados de las pruebas U de Mann-Whitney se indican “Límites Inf - Sup” = intervalos de valores críticos de acuerdo a los tamaños de muestra, “U_A” = valores del estadístico U y “P” = valores de probabilidad. Valor de significancia después de la corrección de Bonferroni P = 0.01

Prueba estadística	Pseudorélicas condensadas				Pseudorélicas sin condensar			
	N	Límites Inf - Sup	U _A	P	N	Límites Inf - Sup	U _A	P
Patrón A vs Patrón B (ENS1, ENS3, TCT, SCA1 y SCA2) vs (LPZ, ENS4 y ENS5)	7 vs 9	15 - 48	60	0.0015	19 vs 10	58 - 132	7	<.0001
Linaje PBC vs Linaje C (LPZ, ENS1, ENS3, ENS4, ENS5 y TCT) vs (SCA1 y SCA2)	14 vs 2	2 - 26	24	NS	18 vs 11	61 - 137	165	0.0016
Linaje PBC vs Linaje C dentro de Patrón A (ENS1, ENS3 y TCT) vs (SCA1 y SCA2)	5 vs 2	1 - 9	8	NS	8 vs 11	23 - 65	33	NS
Sitios extremos dentro de Patrón B (LPZ) vs (ENS4 y ENS5)	6 vs 3	2 - 16	9.5	NS	7 vs 3	2 - 19	12	NS
Patrón A vs Patrón B dentro Linaje PBC (ENS1, ENS3 y TCT) vs (LPZ, ENS4 y ENS5)	5 vs 9	9 - 36	42	0.0057	8 vs 10	20 - 60	73	0.0019

6.8 Calibración de loci microsatélites

De un total de 343 individuos utilizados para la genotipificación, se obtuvieron genotipos multilocus completos (7 loci) para 228 individuos (NOV = 34 de 42, 81%; ENS1 = 21 de 30, 70%; ENS2 = 27 de 34, 79%; ENS3 = 35 de 40, 88%; ENS4 = 34 de 40, 85%; TCT = 23 de 40, 58%; SCA1 = 18 de 24, 75%; SCA2 = 21 de 40, 53%; CCA = 15 de 53, 28%). El locus Psier51 fue descartado durante el trabajo de laboratorio por su baja tasa de amplificación exitosa.

6.8.1 Validación de la base de datos

Una muestra de 47 de estos 228 individuos (aproximadamente 20%) fueron reamplificados y genotipificados por segunda ocasión. Tal como sucedió al obtener la base de datos original, no se obtuvieron productos de amplificación de todos los individuos reamplificados por lo que se lograron sólo 290 de 329 genotipos por locus, lo que da un éxito de amplificación de 88%. A partir de la comparación de estos genotipos con los de la base de datos original, se calculó una tasa media de error por alelo (razón entre el número de inconsistencias alélicas y el número de alelos replicados) de 15% y una tasa media de error por locus (razón entre el número genotipos unilocus que incluyen al menos una inconsistencia alélica y el número de genotipos unilocus replicados) de 21%.

6.8.2 Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci y por sitio de muestreo

Para cada par de loci se hizo una prueba por sitio de muestreo y una global, para totalizar 210 pruebas. La prueba global de desequilibrio de ligamientos indicó que Psier20 y Psier21 y Psier17 y Psier19 estuvieron ligados. Sin embargo, al revisar por sitio de muestreo, ambos pares de loci se encontraron ligados sólo en el sitio NOV después de la corrección de Bonferroni (9 sitios x 21 pares de loci = $P=0.000265$). Esta información se detalla en la Tabla VI.

Tabla VI. Valores de probabilidad de la prueba de desequilibrio gamético por pares de loci microsatélites, por sitio de muestreo y global en *P. atromedia* y *P. sierra* de California y la península de Baja California. * y en rojo, significativos después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.000265$).

Par de Loci	NOV	ENS1	ENS2	ENS3	ENS4	TCT	SCA1	SCA2	CCA	Global
Psier04/Psier40	0.0434	1	0.8261	0.3302	1	0.6317	0.3155	1	0.4647	0.7528
Psier04/Psier20	0.7168	1	1	1	0.4994	0.3811	0.0385	0.2240	0.0529	0.3696
Psier40/Psier20	0.3158	1	0.4923	0.00016*	1	0.0178	0.6978	0.9616	0.6161	0.0286
Psier04/Psier21	0.4955	0.8041	0.6058	0.7946	0.6315	0.9972	0.1187	0.2290	0.3544	0.7602
Psier40/Psier21	0.8949	0.9569	0.5545	0.5154	0.9168	0.3989	0.5384	0.9823	0.8923	0.9947
Psier20/Psier21	0*	0.2926	0.0283	0.0183	0.0442	0.1814	0.0030	0.0007	0.0061	0*
Psier04/Psier19	0.4164	0.7155	0.6147	1	0.1650	0.9327	1	0.4001	0.9965	0.9603
Psier40/Psier19	0.5068	0.1775	0.4375	0.0709	0.6096	0.7143	1	0.5656	0.0121	0.1757
Psier20/Psier19	0.5437	0.2665	0.3412	0.7364	1	0.5862	0.3360	0.0299	0.8496	0.5079
Psier21/Psier19	0.8307	0.0812	0.9504	0.0953	0.7328	0.6278	0.7506	0.0335	0.8093	0.3593
Psier04/Psier29	0.1754	1	1	1	0.3288	0.5325	0.0747	0.5199	0.1708	0.5232
Psier40/Psier29	0.4349	0.4885	0.6698	0.2582	0.1570	0.0926	0.8980	0.2578	0.6838	0.4070
Psier20/Psier29	1	1	0.2262	1	0.6873	0.5534	0.2614	0.3281	0.2113	0.7958
Psier21/Psier29	1	0.5320	0.6709	0.5792	0.3681	0.8874	0.8416	0.2913	0.0903	0.7909
Psier19/Psier29	1	1	0.1561	0.0614	0.3620	0.8285	1	0.0570	1	0.4934
Psier04/Psier17	0.3387	0.5399	1	1	0.7511	0.6842	0.2674	0.0866	0.0060	0.2112
Psier40/Psier17	0.5291	0.0789	0.4916	0.8042	0.3565	0.2813	0.5337	0.6235	0.2456	0.4678
Psier20/Psier17	0.5924	0.5256	0.4262	0.8911	0.3626	0.4394	0.6164	0.0996	0.2570	0.5757
Psier21/Psier17	0.9806	0.8448	0.6960	0.9884	0.2321	0.0424	0.4508	0.0192	0.4945	0.2656
Psier19/Psier17	0*	0.0140	0.7020	0.6359	0.4421	0.8381	1	0.4723	1	0*
Psier29/Psier17	0.0540	0.0745	0.6314	1	0.8616	0.3005	0.8506	1	0.4178	0.5422

6.8.3 Desequilibrio de Hardy-Weinberg y alelos nulos por sitio de muestreo

De las 63 combinaciones de loci y sitios de muestreo, 35 se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg, calculado en base al índice de endogamia F_{IS} (ver valores en la sección “Diversidad Genética de los Sitios de Muestreo”) después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989), el cual fue de 9 sitios de muestreo x 7 loci, $P = 0.0008$. Sin embargo, ningún sitio se desvió significativamente para todos los loci. De igual manera, ningún locus se desvió significativamente en todos los sitios (Tabla VII).

Los resultados del programa MICRO-CHECKER indicaron que 45 de las 63 combinaciones de loci y sitios de muestreo pudieron haber tenido errores de genotipificación debido a alelos nulos (Tabla VII). Entre ellas estaban comprendidas todas las 35 combinaciones que se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg mencionadas en el párrafo anterior. Además al comparar con las estimaciones de frecuencia de alelos nulos realizadas en el programa FREENA (Tabla VII) coinciden, pues los 45 estaban entre los que tenían estimaciones de frecuencia de alelos nulos más altas partiendo de 0.09 y hasta un valor máximo de 0.40, con excepción del locus Psier 19 en SCA1 y los loci Psier 19, Psier 21 y Psier40 en CCA, que tuvieron estimaciones de alelos nulos de 0.09, 0.09, 0.11 y 0.15, respectivamente pero que en MICRO-CHECKER no resultaron proclives a errores de genotipificación por alelos nulos. En el mismo sentido, 32 de las 35 combinaciones de sitios por locus que se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg correspondían con los valores de frecuencia de alelos nulos más altos en el rango de 0.18 y 0.40. Las excepciones a este patrón fueron Psier17 en CCA y Psier20 y Psier29 en ENS4 que tuvieron estimaciones de alelos nulos más pequeñas, de 0.13, 0.15741 y 0.15, respectivamente, pero presentaron desviaciones significativas y Psier21 en SCA1 que a pesar de tener una estimación de 0.22 no se desvió significativamente.

Los resultados del programa MICRO-CHECKER también indicaron que los individuos genotipificados con Psier20 en SCA1 y CCA; Psier21 en ENS3, ENS4, SCA1 y SCA2; Psier29 en ENS4; y Psier40 en NOV, ENS2 y ENS3 pudieron haber tenido errores por la presencia de bandas numerarias (“stutters” en inglés), pues se encontró una ausencia significativa de heterocigotos con diferencia de una unidad repetitiva. Salvo Psier 21 en ENS3, ENS4 y SCA1, las otras siete, se encontraron en desequilibrio de Hardy-Weinberg.

No se detectaron evidencias de errores por competencia de alelos de menor talla siendo amplificados más rápido y en mayor cantidad que los de mayor talla (“allelic dropout” en inglés) en ningún sitio ni locus.

Tabla VII. Frecuencias de alelos nulos por sitio de muestreo, por locus y promedios estimados en el programa FREENA para *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. †Combinaciones de sitio de muestreo y locus que podrían presentar alelos nulos según el programa MICRO-CHECKER.

Sitio de muestreo	Locus							Promedio
	Psier04	Psier17	Psier19	Psier20	Psier21	Psier29	Psier40	
NOV	0.05748	0.1642 [†]	0.00002	0.2713 [†]	0.15209 [†]	0.24266 [†]	0.32859 [†]	0.1738
ENS1	0.00006	0.23575 [†]	0.26064 [†]	0.31034 [†]	0.02921	0.23933 [†]	0.28315 [†]	0.1941
ENS2	0.05619	0.24394 [†]	0.1776 [†]	0.06271	0	0.22215 [†]	0.25015 [†]	0.1447
ENS3	0.08871 [†]	0.34951 [†]	0.2444 [†]	0.20924 [†]	0.15129 [†]	0.22982 [†]	0.30369 [†]	0.2252
ENS4	0.05512	0.30408 [†]	0.19336 [†]	0.15741 [†]	0.13535 [†]	0.148 [†]	0.24689 [†]	0.1772
TCT	0.12635 [†]	0.14613 [†]	0.25614 [†]	0.20491 [†]	0.05526	0.36505 [†]	0.1844 [†]	0.1912
SCA1	0.05674	0.14451 [†]	0.08666	0.39939 [†]	0.22068 [†]	0.18283 [†]	0.2429 [†]	0.1905
SCA2	0.26571 [†]	0.02837	0.02218	0.30555 [†]	0.24219 [†]	0.09249 [†]	0.29415 [†]	0.1787
CCA	0	0.13522 [†]	0.09238	0.27458 [†]	0.11111	0.0489	0.15456	0.1167
Promedio	0.0785	0.1946	0.1482	0.2439	0.1219	0.1968	0.2543	

6.8.4 Prueba de neutralidad de los loci microsatélites

De acuerdo con los análisis realizados con el programa LOSITAN ninguno de los loci microsatélites sería candidato a encontrarse bajo efecto de selección, pues todos ellos se encontraron en la región de neutralidad. Los resultados fueron muy similares al utilizar el modelo mutacional de alelos infinitos y el de un paso (“stepwise”, en inglés) por lo que en la Figura 2 sólo se muestran los resultados del segundo.

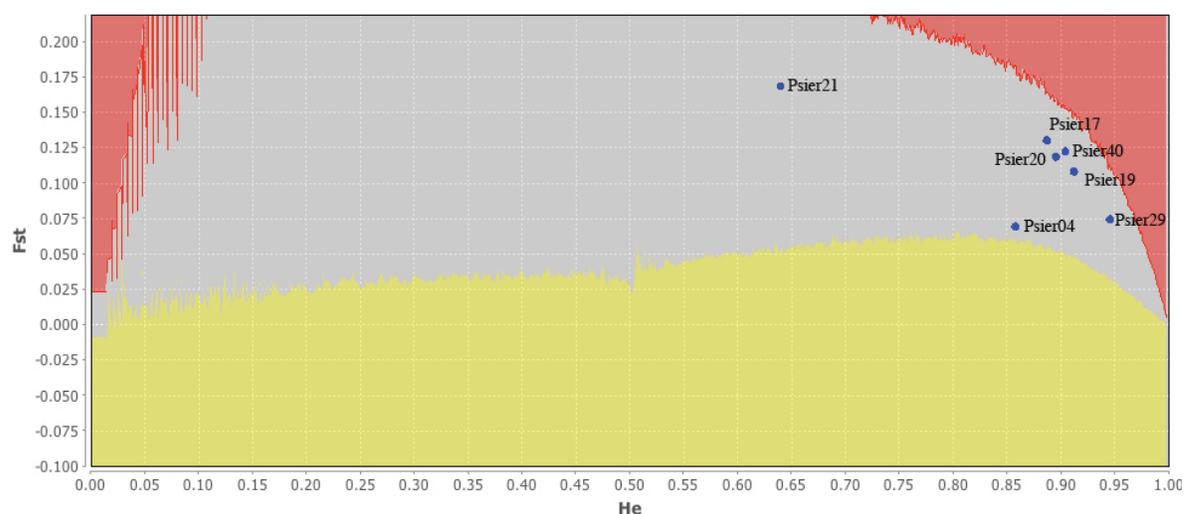


Figura 2. Resultado de la prueba de neutralidad para siete loci microsatélites utilizados para genotipificar sitios de muestreo de *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. El análisis se realizó en el programa LOSITAN. En el área gris se ubican los loci candidatos a ser neutrales, mientras que en las áreas roja y amarilla se ubican los loci candidatos a estar bajo selección, positiva y balanceadora, respectivamente.

6.9 Diversidad genética al interior de los sitios de muestreo

Todos los loci fueron polimórficos con 17, 15, 20, 22, 5, 34 y 19 alelos para el locus Psier04, Psier17, Psier19, Psier20, Psier21, Psier29 y Psier40, respectivamente. Los promedios de alelos por locus fueron 8, 7.89, 9.44, 8.56, 3.44, 14 y 8 alelos, respectivamente, y por sitio de muestreo, 11.71, 7.71, 9.43, 12.71, 10.14, 5.71, 6.43, 7.29 y 5.14 alelos para los sitios de NOV, ENS1, ENS2, ENS3, ENS4, TCT, SCA1, SCA2 y CCA, respectivamente. El gran promedio por locus por sitio fue 8.48 alelos (Tabla VIII).

Se encontraron 28 alelos privados. Ocho en el sitio NOV, siete en ENS3, cinco en CCA, cuatro en ENS4, tres en SCA2 y uno en SCA1. De todos estos, Psier20-181, Psier19-157, Psier19-159 y Psier40-134 en CCA tuvieron frecuencias de 37% los tres primeros y 53% el último; Psier20-135 y Psier20-175 en NOV tuvieron frecuencias de 6% cada uno; y Psier04-146 de SCA2 tuvo una frecuencia de 7%. El resto de los alelos nulos tuvieron frecuencias inferiores al 5%.

Tanto la cantidad de alelos, así como la de alelos efectivos y la riqueza alélica (basada en un tamaño de muestra mínimos de 15 muestras) por locus por sitio de muestreo (Tabla VIII, Figura 3), tuvieron sus valores mínimos en el sitio CCA con cifras de 5.1, 3.2 y 5.1 alelos respectivamente; y sus valores máximos, en ENS3 con valores de 12.7, 8.1 y 10.1 alelos respectivamente. De igual manera, los valores mínimos para estos tres parámetros se presentaron siempre en el locus Psier21 y los máximos en Psier29, con valores de 3.4, 2.2 y 3.2, y 14, 8.4 y 11.3 alelos respectivamente. Los promedios equivalieron a 8.5, 5.2 y 7.4 alelos por locus por sitio de muestreo, respectivamente. Los valores mínimos y máximos de heterocigosidad estimada por sitio de muestreo por locus se presentaron en los mismos sitios y locus ya mencionados, correspondiendo los mínimos a 0.64 y 0.53; y los máximos, a 0.85 y 0.87, respectivamente, con promedio de 0.77. Las heterocigosidades observadas mínimas por sitio de muestreo por locus fueron de 0.36 en el sitio TCT y 0.33 en el locus Psier40; y las máximas, de 0.56 en el sitio ENS2 y 0.67 en el locus Psier04, con un promedio de 0.45. Por último, los valores del índice de endogamia por sitio de muestreo por locus más bajos fueron de 0.34 en el sitio ENS2 y 0.22 en el locus Psier04; y los más altos,

0.5 en el sitio ENS3 y 0.59 en el locus Psier40, con un promedio de 0.43. Los valores se desglosan para cada una de las 63 combinaciones de sitios de muestreo por locus y sus promedios en la Tabla VIII.

Tabla VIII Medidas de diversidad genética estimadas por locus microsatélite, por sitio de muestreo y promedios para *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. SM = Sitio de muestreo, Param. = Parámetro, Prom = Promedio, N = Número de individuos, Na = Número de alelos, Ne = Alelos efectivos, R = Riqueza alélica, Ho = Heterocigosidad observada, He = Heterocigosidad esperada no sesgada, F = Índice de endogamia. *Desviado significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg después del ajuste de Bonferroni ($P < 0.0008$).

SM	Param.	Locus							Prom.
		Psier04	Psier17	Psier19	Psier20	Psier21	Psier29	Psier40	
NOV	N	34	34	34	34	34	34	34	34
	Na	9	10	9	14	5	24	11	11.713
	Ne	5.943	2.756	3.973	7.18	2.676	16.056	4.951	6.2191
	R	8.008	7.249	6.428	10.603	4.368	17.271	8.461	8.9126
	Ho	0.7353	0.3824	0.7353	0.3529	0.3824	0.4706	0.2059	0.4664
	He	0.8442	0.6466	0.7594	0.8736	0.6356	0.9517	0.8099	0.7887
	F	0.1307	0.4123	0.0323	0.5996*	0.4021	0.5093*	0.7486*	0.4050
ENS1	N	21	21	21	21	21	21	21	21
	Na	7	8	10	9	4	10	6	7.7143
	Ne	5.313	5.04	4.927	6.945	2.222	7.35	4.768	5.2235
	R	6.69	7.386	8.836	8.552	3.714	9.471	5.919	7.224
	Ho	0.8571	0.381	0.3333	0.2857	0.5238	0.4286	0.2857	0.4422
	He	0.8316	0.8211	0.8165	0.8769	0.5633	0.885	0.8095	0.8006
	F	-0.0315	0.5422*	0.5977*	0.6796*	0.0717	0.5219*	0.6527*	0.4425
ENS2	N	27	27	27	27	27	27	27	27
	Na	8	9	11	12	3	16	7	9.4286
	Ne	5.608	7.01	6.284	6.339	2.271	10.721	5.544	6.2537
	R	7.664	8.683	9.687	9.716	2.999	13.404	6.473	8.3751
	Ho	0.7407	0.4074	0.5185	0.7407	0.6296	0.4815	0.3704	0.5555
	He	0.8372	0.8735	0.8567	0.8581	0.5702	0.9238	0.8351	0.8221
	F	0.1171	0.5383*	0.3993*	0.1391	-0.1064	0.4836*	0.5612*	0.3350
ENS3	N	35	35	35	35	35	35	35	35
	Na	14	10	14	12	3	24	12	12.7143
	Ne	8.942	6.38	8.909	7.538	2.189	14.162	8.781	8.1289
	R	11.102	8.469	11.495	10.379	2.998	16.165	10.365	10.139
	Ho	0.7429	0.2	0.4286	0.4857	0.3143	0.4857	0.3143	0.4245
	He	0.901	0.8555	0.9006	0.8799	0.5511	0.9429	0.899	0.8471
	F	0.1777	0.7688*	0.5278*	0.4516*	0.4333	0.4885*	0.6537*	0.5002
ENS4	N	34	34	34	34	34	34	34	34
	Na	8	10	10	12	4	15	12	10.1429
	Ne	5.695	6.943	6.701	6.964	2.287	4.787	7.434	5.83
	R	7.058	9.073	8.478	9.317	3.441	10.565	9.704	8.2337
	Ho	0.7059	0.2941	0.5	0.5588	0.3529	0.5294	0.4118	0.479
	He	0.8367	0.8687	0.8635	0.8692	0.5711	0.8029	0.8784	0.8129
	F	0.1583	0.6648*	0.4246*	0.3605*	0.3856	0.344*	0.535*	0.4104

Tabla VIII. Continuación

SM	Param.	Locus							Prom.
		Psier04	Psier17	Psier19	Psier20	Psier21	Psier29	Psier40	
TCT	N	23	23	23	23	23	23	23	23
	N _a	5	5	5	6	4	9	6	5.7143
	N _e	2.3	2.501	2.829	3.306	2.762	6.373	4.182	3.4649
	R	4.188	4.604	4.304	5.267	3.884	8.656	5.869	5.2531
	H _o	0.3478	0.3913	0.2174	0.3478	0.5652	0.1739	0.4783	0.3602
	H _e	0.5778	0.6135	0.6609	0.713	0.6522	0.8618	0.7778	0.6939
	F	0.4034	0.3674	0.676*	0.5178*	0.136	0.8018*	0.3904*	0.4704
SCA1	N	18	18	18	18	18	18	18	18
	N _a	8	5	8	4	3	9	8	6.4286
	N _e	4.836	4.320	5.184	2.945	2.242	5.226	3.951	4.1006
	R	7.476	4.997	7.801	3.976	2.997	8.45	7.64	6.191
	H _o	0.7222	0.5	0.6667	0	0.2222	0.5	0.3333	0.4206
	H _e	0.8159	0.7905	0.8302	0.6794	0.5698	0.8317	0.7683	0.7551
	F	0.1178	0.3742	0.2016	1*	0.6169	0.4058*	0.5732*	0.4699
SCA2	N	21	21	21	21	21	21	21	21
	N _a	9	7	12	3	3	9	8	7.2857
	N _e	5.281	4.570	8.092	2.291	1.726	5.011	5.690	4.666
	R	8.312	6.561	10.899	2.999	2.714	8.056	7.542	6.7261
	H _o	0.3333	0.7143	0.8571	0.0952	0.0952	0.619	0.2857	0.4285
	H _e	0.8304	0.8002	0.8978	0.5772	0.4309	0.82	0.8444	0.743
	F	0.6045*	0.1098	0.0464	0.8384*	0.7832*	0.2496	0.6671*	0.4713
CCA	N	15	15	15	15	15	15	15	15
	N _a	4	7	6	5	2	10	2	5.1429
	N _e	3.147	2.83	3.409	3.913	1.301	5.696	1.991	3.1839
	R	4	7	6	5	2	10	2	5.1429
	H _o	0.8667	0.4	0.5333	0.2667	0.1333	0.8	0.2667	0.4667
	H _e	0.7057	0.669	0.731	0.7701	0.2391	0.8529	0.5149	0.6404
	F	-0.2381	0.4105*	0.2774	0.6616*	0.451	0.0641	0.4909	0.3705
Prom.	N	25.3333	25.3333	25.3333	25.3333	25.3333	25.3333	25.3333	25.3333
	N _a	8	7.8889	9.4444	8.5556	3.4444	14	8	8.4762
	N _e	5.2294	4.7055	5.5898	5.2691	2.1862	8.3757	5.2547	5.2301
	R	7.1664	7.1136	8.2142	7.3121	3.235	11.3376	7.1081	7.3553

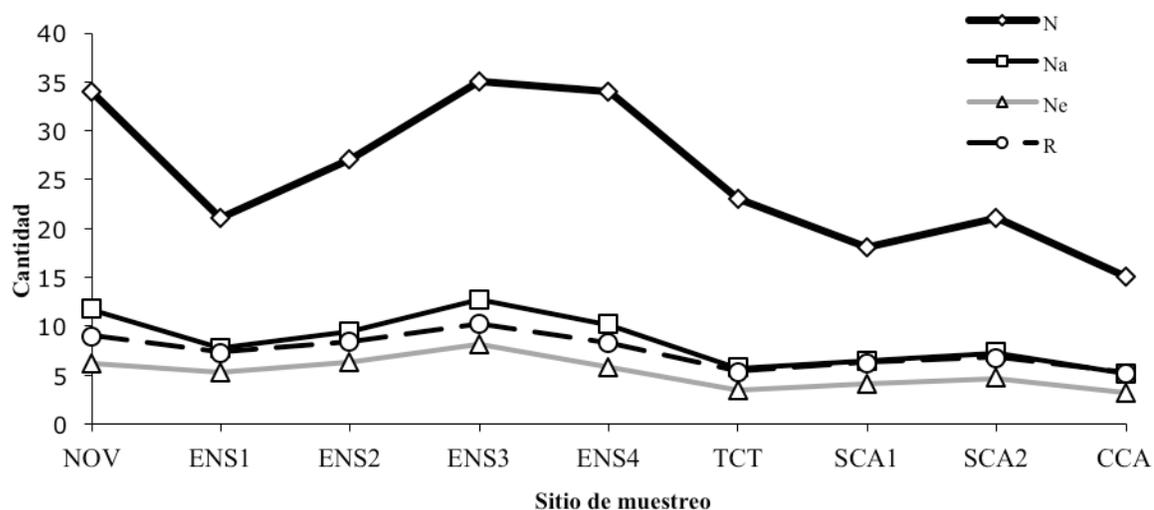


Figura 3. Medidas de diversidad genética por sitio de muestreo para siete loci microsatélites en *P. sierra* en la península de Baja California y *P. atromedia* en California, E.U.A. Se muestran los promedios de todos los loci por sitio de muestreo. Línea gruesa con rombos = número de individuos, línea negra con cuadros = número de alelos, línea intermitente con círculos = riqueza alélica, línea gris con triángulos = alelos efectivos. Para los acrónimos referirse a la Tabla 1.

6.10 Número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional

6.10.1 Análisis Factorial de Correspondencia

El análisis factorial de correspondencia alcanzó a explicar, con el primer factor, 35% de la varianza; con el segundo, 15.09%; y con el tercero, 12.85% para totalizar un 63.25% de la variación total. En la Figura 4 se aprecian, dos nubes de puntos en extremos opuestos del eje 1. La más pequeña contiene únicamente a los individuos del sitio CCA, en color azul añil, que corresponden a *P. atromedia*. La otra nube contiene al resto de los sitios, los que constituyen a la especie *P. sierra*. Se repitió el análisis excluyendo a todos los individuos de *P. atromedia* sin que esto mostrara ninguna alteración en la distribución de los puntos que representan a los individuos de *P. sierra* (resultados no mostrados).

Dentro de la nube de *P. sierra*, se pudieron identificar algunas agrupaciones relativas a los sitios de muestreo. El conjunto de puntos más distinguible es el del TCT y después el de NOV, que se segregaron en extremos opuestos del eje 2 en color rojo y verde oscuro respectivamente (Figura 4A). Por su parte, los puntos pertenecientes a los sitios SCA1 y SCA2 en color morado y vino, están completamente traslapados entre sí pero se separaron del resto de la nube en el eje 1 (Figura 4A y 4B) y sobre todo en el eje 3 (Figura 4B). Los sitios ENS1, ENS2, ENS3 y ENS4 se encuentran traslapados y no pudieron distinguirse entre sí en ninguno de los ejes.

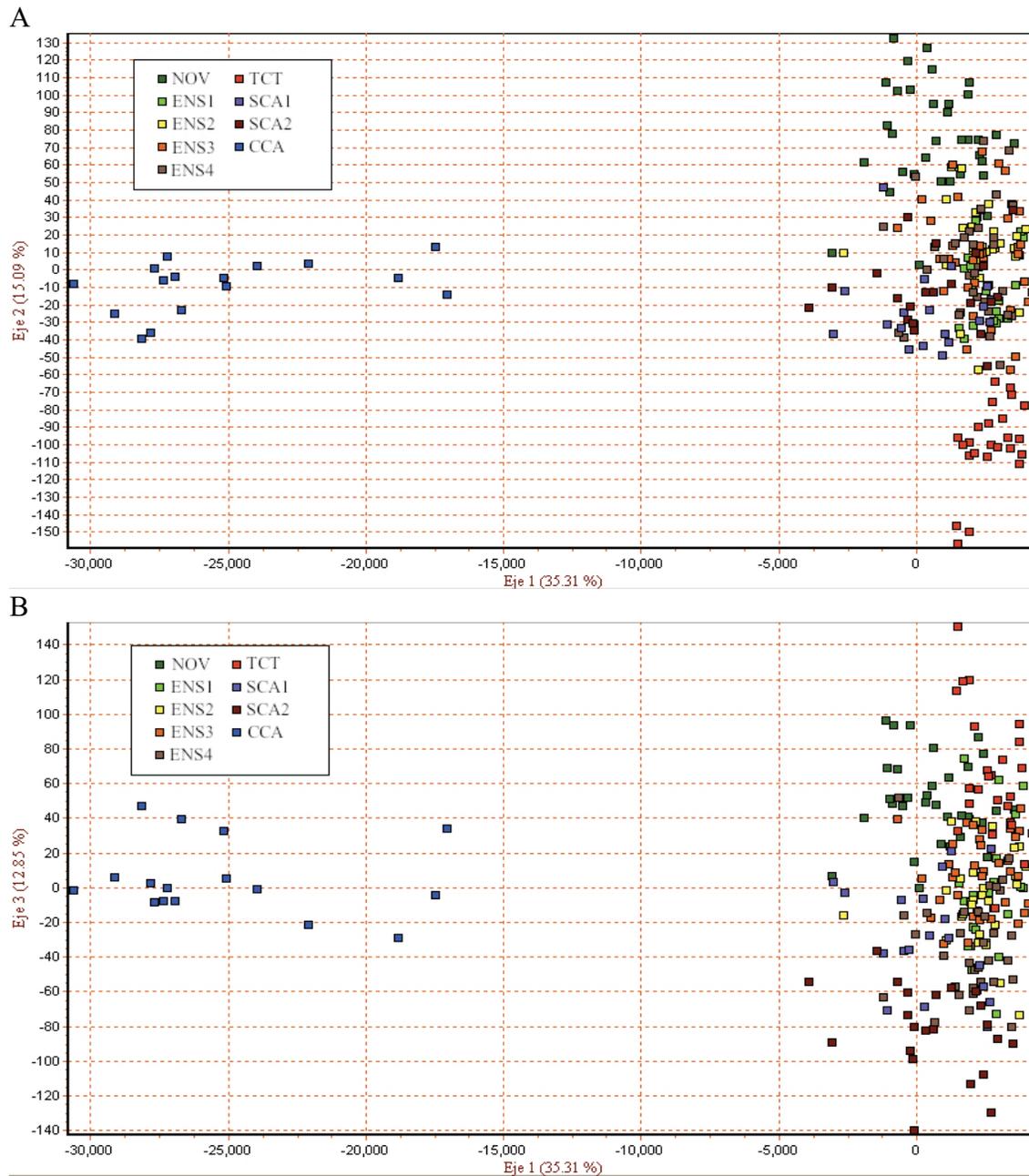


Figura 4. Análisis factorial de correspondencia realizado con las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites para *P. sierra* y *P. atromedia* en la península de Baja California y California, E.U.A. Cada punto representa un individuo proveniente de: NOV = verde oscuro, ENS1 = verde claro, ENS2 = amarillo, ENS3 = anaranjado, ENS4 = marrón, TCT = rojo, SCA1 = morado, SCA2 = vino, CCA = azul añil. **A.** Se grafica el eje 1 contra el eje 2. **B.** Se grafica el eje 1 contra el eje 3.

6.10.2 Análisis discriminante de componentes principales

Mediante el análisis discriminante de componentes principales (Figura 5) se obtuvieron resultados prácticamente idénticos a los anteriores. Una nube de puntos que representa a *P. atromedia* y otra que representa a *P. sierra*, dentro de la cual, se separan claramente los sitios de NOV y TCT mientras el resto permanece con considerable traslape. La única diferencia es que en este caso los puntos que representan a los sitios SCA1 y SCA2 no se encuentran tan traslapados entre sí, y son sólo los del segundo los que se encuentran ligeramente desplazados en dirección a *P. atromedia*, mientras que los del primero permanecen con los puntos de los sitios ENS. Cuando se repite el análisis dejando fuera a *P. atromedia*, el patrón general se mantiene, pero a través del eigenvalor 3 (eje 3), la segregación del sitio SCA2 se hace más acusada y además el sitio ENS3 también se desplaza hacia el lado opuesto y se separa ligeramente del resto de los sitios. Por último, cuando los cuatro sitios de ENS y los dos de SCA se condensan en dos grupos, la separación entre cuatro poblaciones, NOV, ENS, TCT y SCA, se hace aún más notoria.

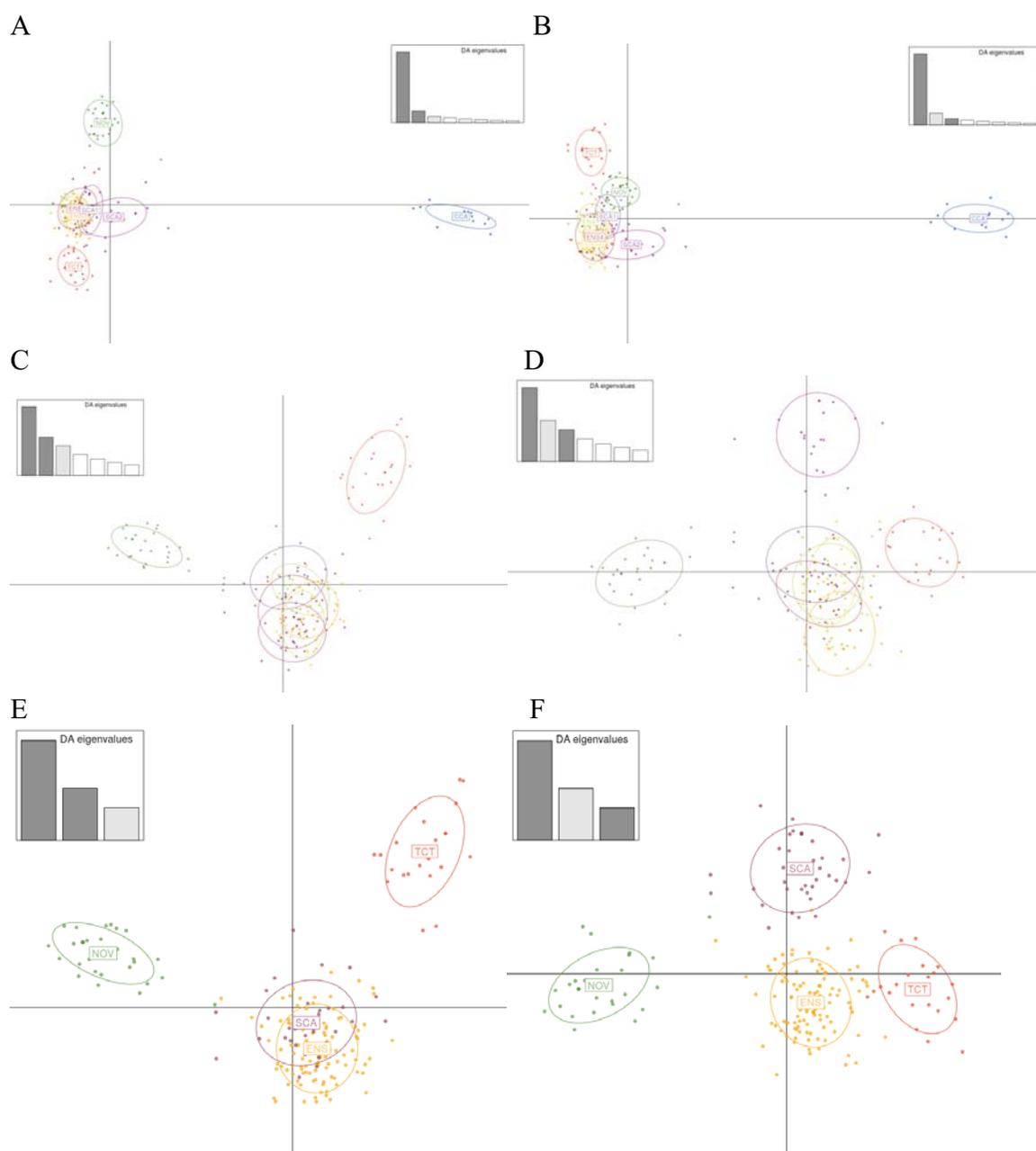


Figura 5. Análisis discriminante de componentes principales realizado con las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites. **A** y **B** nueve sitios de muestreo incluyendo *P. sierra* y *P. atromedia*, ejes 1 y 2 y 1 y 3 respectivamente; **C** y **D**. ocho sitios de muestreo incluyendo solo a *P. sierra*, ejes 1 y 2 y 1 y 3 respectivamente; **E** y **F**. ocho sitios de muestreo condensados en cuatro grupos, NOV (1 sitio), ENS (4 sitios), TCT (1 sitio) y SCA (2 sitios), ejes 1 y 2 y 1 y 3 respectivamente.

6.10.3 Estadísticos F de Wright

Las pruebas de diferenciación genética utilizando valores de F_{ST} entre todos los pares posibles de sitios de muestreo arrojaron valores bajos y significativos (después de la corrección de Bonferroni, 36 pares posibles, $P=0.0014$) para la mayoría de los sitios de muestreo (Tabla IX). El rango total de valores fue de 0.00 a 0.28. CCA difiere significativamente de todos los demás sitios, con valores por encima de 0.19, que corresponden a la diferenciación entre *P. sierra* y *P. atromedia*. TCT y NOV también presentan diferencias significativas con respecto al resto de los sitios con rangos de 0.9 a 0.14 y 0.5 a 0.10, respectivamente. SCA1 y SCA2 presentan valores de diferenciación de 0.05 a 0.07 con respecto a los sitios restantes. Los valores de F_{ST} entre la tríada ENS1, ENS2 y ENS3; y el par SCA2 y ENS1 no fueron estadísticamente diferentes después de la corrección de Bonferroni.

Tabla IX. Valores de F_{ST} por pares de sitios de muestreo estimados a partir de las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites para *P. sierra* y *P. atromedia* en la península de Baja California y California, E.U.A. Bajo la diagonal se muestran los valores de F_{ST} . En rojo se resaltan los valores más altos, entre 0.19 y 0.28; en amarillo, entre 0.09 y 0.14; en verde, entre 0.05 y 0.07; y los inferiores a 0.05 aparecen en blanco. Los asteriscos denotan significancia estadística. Sobre la diagonal se muestran los valores de probabilidad correspondientes. Significancia estadística después de la corrección de Bonferroni $P=0.0014$.

	NOV	ENS1	ENS2	ENS3	ENS4	TCT	SCA1	SCA2	CCA
NOV		0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
ENS1	0.05*		0.0158	0.0156	0*	0*	0*	0.0014	0*
ENS2	0.05*	0.02		0.3078	0*	0*	0*	0*	0*
ENS3	0.05*	0.01	0.00		0.0008*	0*	0*	0*	0*
ENS4	0.06*	0.03*	0.04*	0.02*		0*	0.0002*	0*	0*
TCT	0.14*	0.09*	0.10*	0.09*	0.11*		0*	0*	0*
SCA1	0.09*	0.07*	0.07*	0.06*	0.05*	0.13*		0.0008*	0*
SCA2	0.10*	0.05	0.07*	0.07*	0.05*	0.14*	0.07*		0*
CCA	0.20*	0.22*	0.20*	0.19*	0.20*	0.28*	0.19*	0.22*	

6.10.4 Análisis de Varianza Molecular

Los resultados de los AMOVAS fueron parecidos a los obtenidos en el programa STRUCTURE utilizando ocho y nueve sitios de muestreo respectivamente. Al analizar la modalidad con los nueve sitios muestreados en su conjunto (Figura 6A), si bien el modelo “Especies” encontró el menor porcentaje de varianza explicada dentro de sitios de muestreo (79.25%) y el mayor por diferencias entre grupos (14.66%), éste último no fue estadísticamente significativo ($P = 0.11$). El modelo que le siguió fue el de “Structure K3” el cual resultó con una varianza dentro de sitios de 84.34% y entre grupos de 10.46% que fue estadísticamente significativa ($P = 0.03$). El resto de los modelos resultaron con valores mayores de varianza dentro de sitios y menores de varianza entre grupos, por lo que “Structure K3” es el modelo que mejor explica la estructura genética sobre las poblaciones.

Al analizar en la modalidad con ocho sitios, excluyendo al sitio CCA, es decir a *P. atromedia* (Figura 6B), volvió a presentarse la situación en la que en el modelo que resultó con el valor más bajo de varianza explicada dentro de sitios y más alto entre grupos (“Structure K3”, 88.64 y 5.97%, respectivamente), no fue estadísticamente significativo para este último nivel de diferenciación ($P = 0.12$). Por lo tanto el mejor modelo fue el “Structure 4”, que resultó en una varianza entre individuos dentro de sitios de 91.76% y entre grupos de 4.69% que sí fue estadísticamente significativa ($P = 0.002$).

De este análisis también resalta, que los modelos “Linajes”, “Geográfico” y especialmente “Cortejos”, tuvieron un desempeño pobre con valores de varianza entre individuos dentro de sitios y entre grupos de 91.66, 91.93 y 92.93, y 2.15, 1.62, y 0.07% (estos tres últimos, no significativos, $P = 0.07, 0.38, 0.5$), respectivamente.

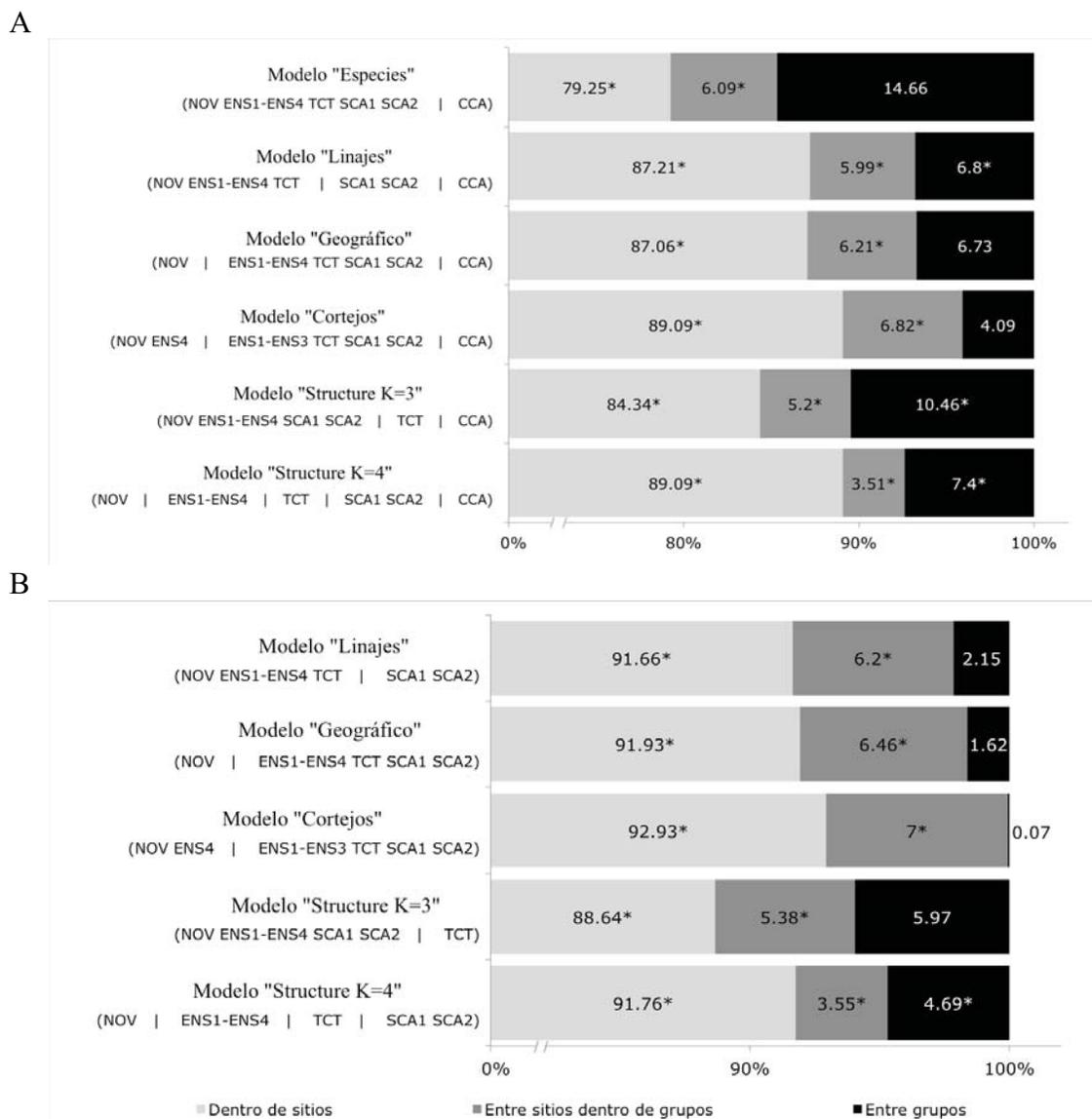


Figura 6. Resultados del análisis de varianza molecular, para cada modelo, construídos a partir de las frecuencias alélicas de siete loci microsatélites en *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. En gris claro se muestran los porcentajes de varianza entre individuos dentro de los sitios de muestreo; en gris oscuro, entre sitios dentro de grupos; y en negro, entre grupos. Los asteriscos denotan significancia estadística. **A.** Análisis realizados en la modalidad nueve sitios, incluyendo *P. sierra* y *P. atromedia*. **B.** Análisis realizados en la modalidad 8 sitios, incluyendo sólo *P. sierra*.

6.10.5 Análisis de asignación por probabilidades bayesianas

En el primer análisis realizado en STRUCTURE, que incluyó los nueve sitios de muestreo genético, el análisis de los resultados por el método de Evanno *et al.* (2005) indicó una sola moda para ΔK en $K = 3$ (Figura 7C), por lo que el modelo de tres grupos genéticos sin duda es el que mejor explica los datos. Este modelo presentó tres grupos, que correspondieron a tres de los sitios de muestreo, abarcando al menos dos especies: NOV (*P. sierra*), TCT (*P. sierra*) y CCA (*P. atromedia*) con probabilidades de asignación o coeficientes de membresía grupales de 0.88, 0.97 y 0.98% respectivamente (Figura 7A). El resto de los sitios no se definieron como grupos sino que sus probabilidades de asignación se repartieron casi en su totalidad entre dos de los tres grupos anteriores. Los sitios de ENS1, ENS2 y ENS3 fueron más afines al grupo definido por NOV con probabilidades de pertenecer a este grupo de 0.53, 0.73 y 60% respectivamente; mientras que ENS4, SCA1 y SCA2 fueron más afines al grupo definido por TCT con probabilidades de pertenecer a este grupo de 51, 78 y 68% respectivamente. Entre los sitios en los que se muestreó *P. sierra*, ninguno mostró probabilidades de asignación o coeficientes de membresía altos para el grupo definido por el sitio de muestreo de *P. atromedia*, CCA (NOV=0.02, ENS1=0.01, ENS2=0.01, ENS3=0.01, ENS4=0.01, TCT<0.01, SCA1=0.07 y SCA2=0.06). El excluir del análisis al sitio TCT (para verificar si el modelo $K=2$ resultaba más probable, no provocó ningún efecto importante, pues $K=3$ siguió siendo el que tuvo mayor verosimilitud y el resto de sitios muestreados presentaron variaciones menores a 5% en sus probabilidades de asignación con respecto al análisis original que incluía a TCT.

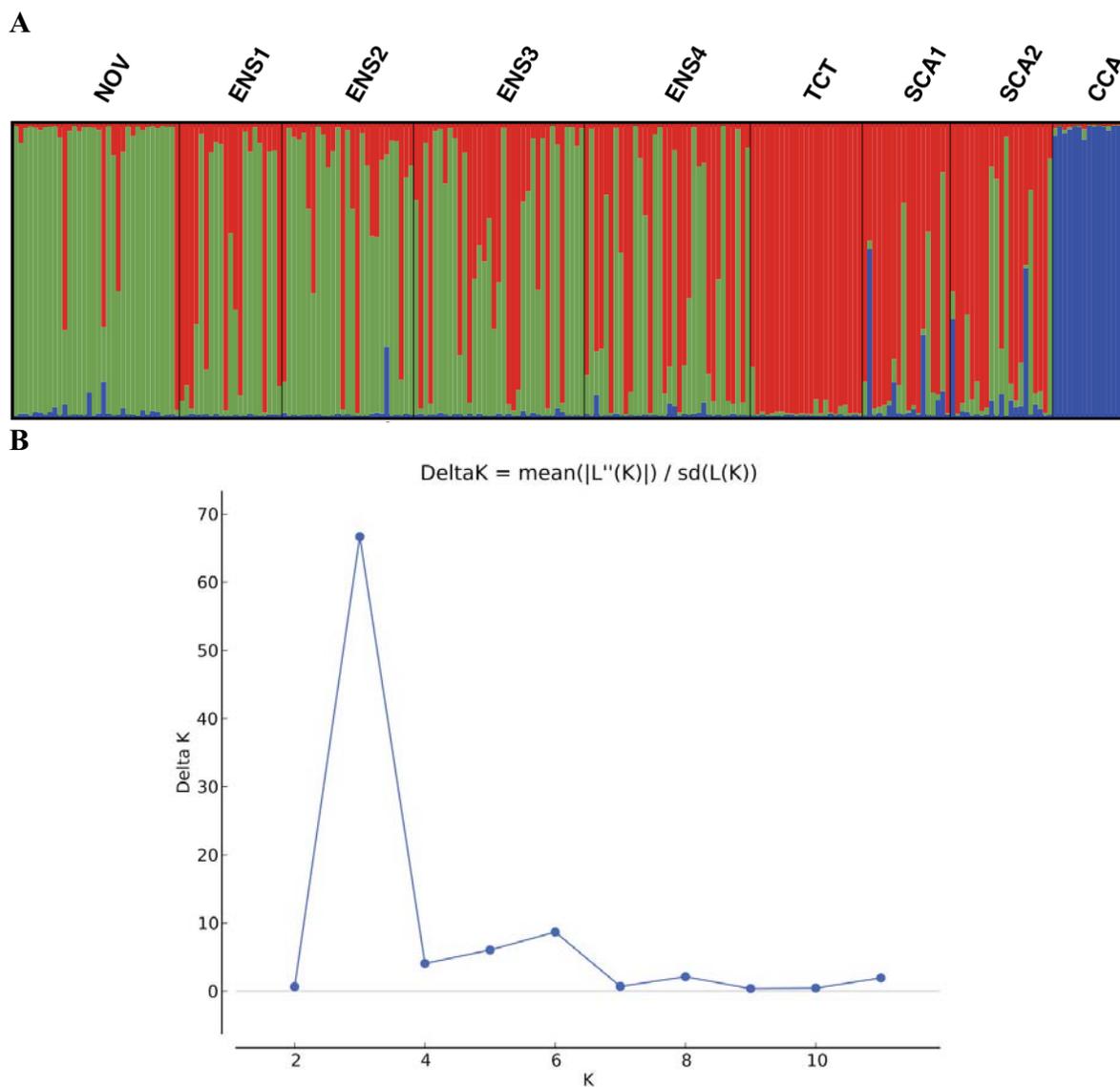


Figura 7. Resultados del análisis de asignación por probabilidades bayesianas en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007), utilizando siete loci microsatélites para nueve sitios de muestreo de *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. **A.** Diagrama en el que cada barra representa un individuo y cada color representa la proporción del genoma que corresponde al grupo definido por NOV (en verde), TCT (en rojo) o CCA (en azul). **B.** Número de grupos genéticamente homogéneos inferidos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud (Evanno *et al.*, 2005).

El segundo análisis se realizó únicamente con los sitios de *P. sierra*, es decir que se excluyó el sitio de CCA para remover la influencia de *P. atromedia* del análisis. En este caso el valor más alto de ΔK fue para $K = 4$ (Figura 8C). $K = 5$ también tuvo un valor alto pero la adición de un grupo no produjo resultados más claros o interpretables por lo que se prefirió el modelo de cuatro grupos. En éste se presentaron dos grupos definidos por un solo sitio de muestreo NOV y TCT, con probabilidades de asignación o coeficientes de membresía de 75 y 91%, respectivamente y dos grupos definidos por varios sitios, los de California, SCA1 y SCA2 con probabilidades de asignación de 77 y 85% respectivamente, y por los cuatro sitios de Ensenada, ENS1, ENS2, ENS3 y ENS4 con probabilidades de asignación de 41, 45, 50 y 43% que fueron mayoría relativa (Figura 8A). También se puso a prueba si excluir adicionalmente el sitio NOV, por la distancia geográfica con respecto a los sitios restantes, develaba algún patrón distinto. El resultado fue que $K=4$ siguió siendo el modelo favorecido y los grupos se conformaron sin variaciones importantes.

Entre los resultados de ambos análisis también resalta, en todos los sitios con excepción de TCT y CCA, la presencia de individuos con probabilidades de asignación o coeficientes de membresía altos para más de un grupo, lo que puede interpretarse como ancestría mezclada (SCA1-03, SCA2-33, SCA2-01, SCA1-17, ENS2-25 y NOV-24, esto se trata con mayor profundidad en la sección de “Evidencias de hibridación”) así como de individuos que tienen probabilidades de asignación muy altas (>0.88) para un grupo pero que se recolectaron en sitios que tienen mayoría de asignación a otro grupo, lo cual puede interpretarse como existencia de migrantes (por ejemplo NOV-24, NOV-42, ENS1-04, ENS2-09, ENS3-02, ENS4-19, SFC-12).

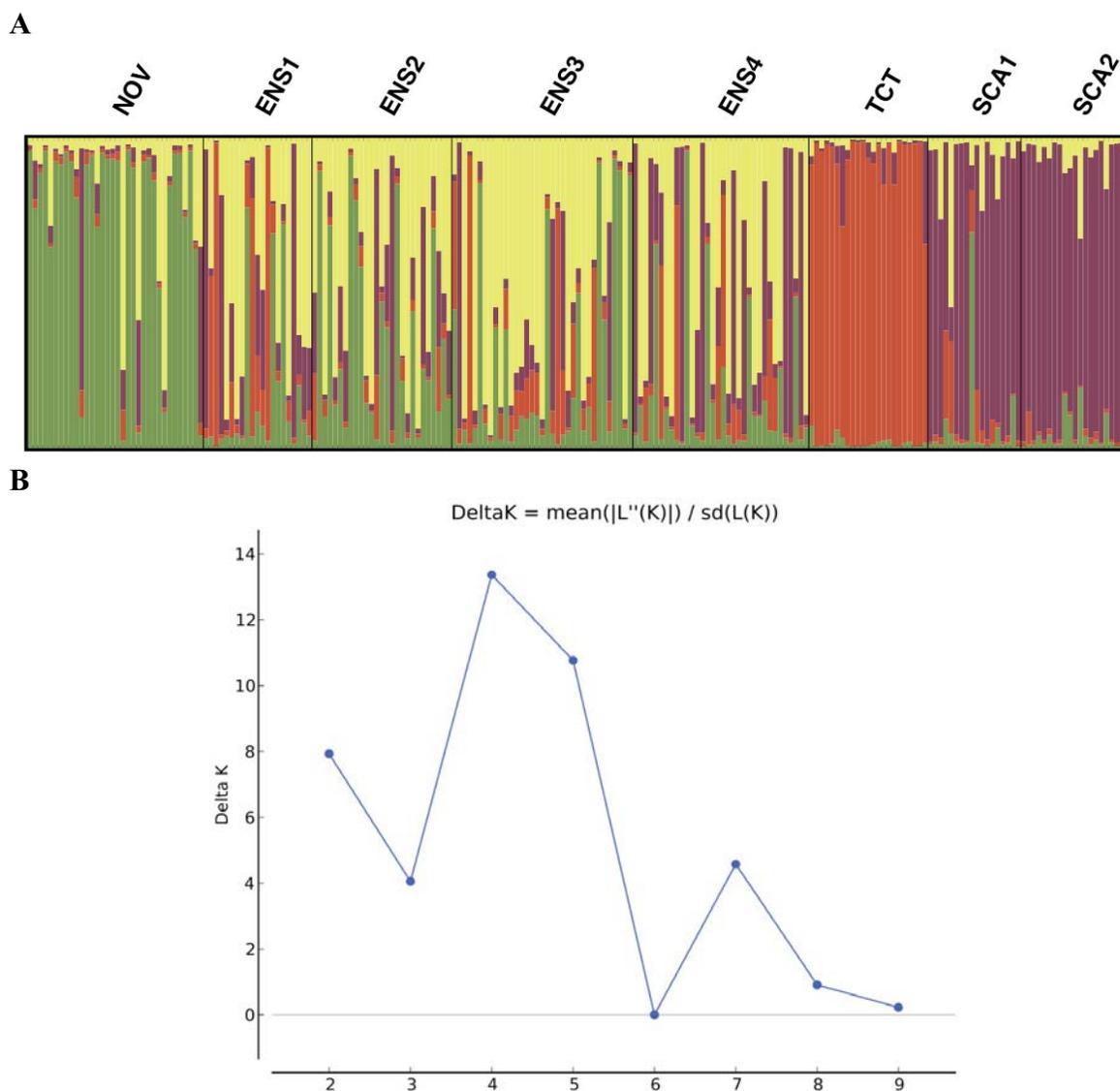


Figura 8. Resultados del análisis de asignación por probabilidades bayesianas en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007) utilizando siete loci microsatélites para ocho sitios de muestreo de *P. sierra* de la península de Baja California y California, E.U.A. **A.** Diagrama en el que cada barra representa un individuo y cada color representa la proporción del genoma que corresponde al grupo definido por NOV (en verde), ENS (en amarillo), TCT (en rojo) o SCA (en vino). **B.** Número de grupos genéticamente homogéneos inferidos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud (Evanno *et al.*, 2005).

6.10.6 Construcción de dendrograma

La conformación general del dendrograma (Figura 9) muestra un patrón de clados anidados con un par de ramificaciones en el clado más interno. Una rama agrupó a ENS1 con TCT (67% de soporte) y la otra a ENS2 con ENS3 (63% de soporte) y la agrupación de ambas ramas entre sí tuvo un soporte de 37%. A partir de esta bifurcación se anidaron primero con ENS4 (42% de soporte), luego con NOV (56% de soporte), después con SCA2 (40% de soporte) y por último CCA y SCA1 con un 100% de soporte, quedando CCA como el grupo con mayor distancia genética.

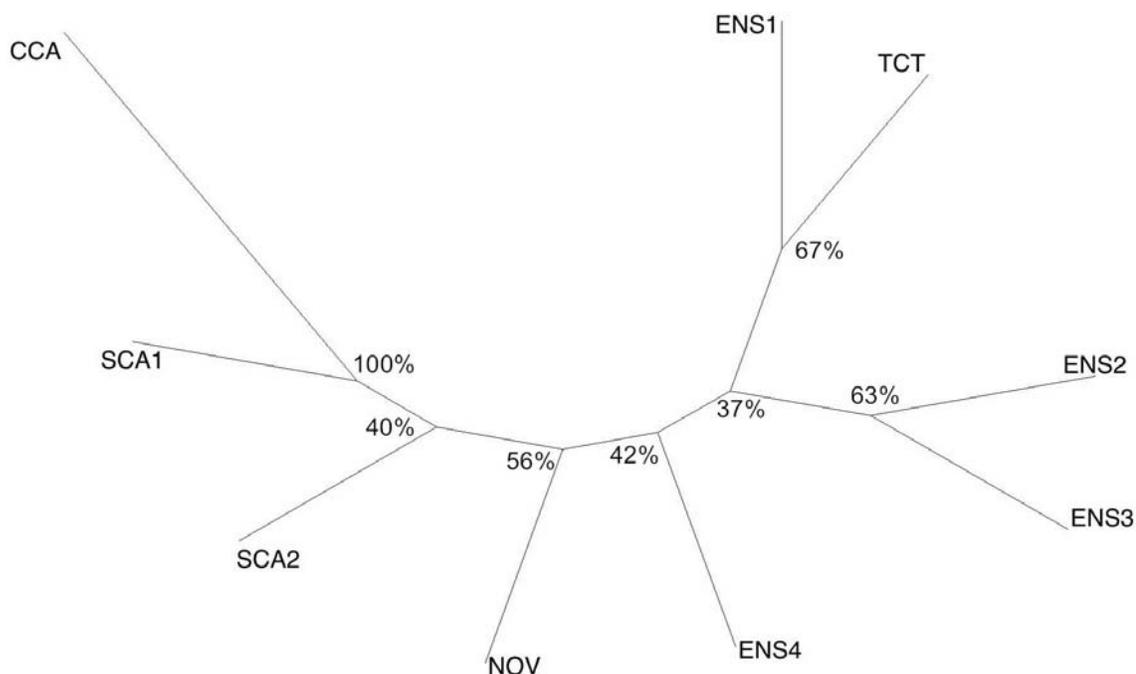


Figura 9. Dendrograma reconstruido mediante el algoritmo del vecino más cercano basado en distancias de la cuerda D_{CSE} de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), construidas a partir de frecuencias alélicas de siete loci microsatélites de *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. En cada nodo se muestran los valores de soporte obtenidos con un remuestreo de 10000 iteraciones.

6.10.7 Aislamiento por distancia

El resumen de los valores de estos análisis se muestra en la Tabla X. Ningún análisis arrojó un valor estadísticamente significativo de aislamiento por distancia después de la corrección de Bonferroni (ver valores en la Tabla X).

Tabla X. Pruebas de Mantel de aislamiento por distancia para *P. sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. Se muestran los valores de correlación entre las matrices de distancias genéticas y el logaritmo de las distancias geográficas. Los valores de probabilidad corregida corresponden a un error de 0.05% ajustados con la corrección de Bonferroni de acuerdo a la cantidad de sitios analizados.

Descripción del modelo	Valor de r	Probabilidad	Probabilidad corregida	Sitios incluidos en el modelo				
				NOV	ENS1-4	TCT	SCA	CCA
<i>P. atromedia</i> y <i>P. sierra</i>	0.602	0.0622	0.0014	X	X	X	X	X
<i>P. sierra</i>	0.37	0.172	0.0018	X	X	X	X	
<i>P. sierra</i> sin linaje de California	0.3975	0.2129	0.0033	X	X	X		
<i>P. sierra</i> sin Tecate	0.6853	0.0061	0.0024	X	X		X	
<i>P. sierra</i> sin Novillo	0.4044	0.1155	0.0024		X	X	X	
<i>P. sierra</i> sin Novillo y sin Tecate	0.8275	0.009	0.0033		X		X	
Ensenada	0.7233	0.1247	0.0083		X			
Ensenada y Tecate	0.264	0.2561	0.0050		X	X		
Ensenada y Novillo	0.9122	0.0253	0.0050	X	X			

6.11 Concordancias y discordancias entre patrones de cortejo y genéticos y eventos vicariantes.

Al comparar los patrones obtenidos de acuerdo con los análisis de ADN mitocondrial, de loci microsatélites y de cortejos (Tabla XI, Figura 10) se observó que hay concordancia mayoritaria entre los dos primeros y limitada con el tercero. La discontinuidad genética de mayor jerarquía observada a nivel de ADN mitocondrial fue entre el linaje que dio origen a *P. sura* con respecto al que dio origen a *P. sierra* y *P. atromedia*, una divergencia estimada de 5.6 millones de años entre ambos linajes (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación). Esta discontinuidad genética en el ADN mitocondrial no se pudo comparar con datos de loci microsatélites debido a que en la genotipificación no se incluyeron ejemplares de *P. sura* (Figura 10).

El segundo nivel jerárquico mitocondrial correspondió a la discontinuidad entre *P. atromedia* y *P. sierra*, un tiempo de divergencia estimado en 4.17 millones de años (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación). La discontinuidad genética observada con los loci microsatélites entre *P. atromedia* y *P. sierra* fue la de mayor jerarquía con un valor medio de F_{ST} de 0.212 entre todos los pares de sitios que comparaban a estas dos especies.

En lo que respecta a los cortejos, se observó que el nivel de jerarquía más alto se encontró entre *P. sierra* con respecto a las otras dos especies, en donde la discontinuidad consistió en que de siete elementos de cortejo exhibidos entre las tres especies no hubo ninguno compartido entre *P. sierra* y cualquiera de las otras dos. Por su parte, entre los tres elementos observados conjuntamente en *P. sura* y *P. atromedia* uno era compartido por ambas especies. Esta discontinuidad conductual de un movimiento compartido entre tres totales, ocupó el segundo nivel jerárquico entre los cortejos.

En lo que concierne a los patrones y discordancias a nivel de especies, se puede decir que , existe una concordancia completa entre los datos provenientes de los análisis de ADN mitocondrial y loci microsatélites, pero la concordancia con los cortejos es solo parcial, ya que si bien cada especie tiene un cortejo propio con elementos característicos, el

de *P. atromedia* es notablemente más parecido al de *P. sura* que al de *P. sierra*, lo cual no concuerda con el nivel de jerarquía más alto encontrado en el ADN mitocondrial.

La siguiente parte del análisis corresponde a los patrones que se observaron dentro de las poblaciones de *P. sierra*. La discontinuidad mitocondrial de tercer nivel jerárquico fue aquella entre los dos linajes mitocondriales de *P. sierra*, el de California y el de la península de California (2.05 millones de años de divergencia estimada (Tabla XI).

Esta discontinuidad también fue evidente en los loci microsatélites, pero en el tercer nivel jerárquico, con un valor promedio de F_{ST} de 0.079, ya que en el segundo nivel jerárquico, con valor promedio de F_{ST} de 0.112, se situó la discontinuidad entre TCT y el resto de poblaciones de *P. sierra*. Por su parte, la discontinuidad de cuarto nivel jerárquico con los loci microsatélites fue la que se observó entre NOV y el resto de poblaciones de *P. sierra*, con un valor promedio de F_{ST} de 0.078 (Tabla XI, Figura 10).

En el cuarto nivel jerárquico de discontinuidades mitocondriales, se ubicó la divergencia que hubo entre las distintas poblaciones al interior de cada linaje, las cuales tienen tiempos estimados de divergencia de entre ocho y once mil años (Tabla XI).

En el aspecto conductual, la discontinuidad entre cortejos dentro de *P. sierra* fue menor. Todos los sitios, menos ENS5, presentaron los cuatro elementos de cortejo característicos de *P. sierra*, sin embargo, pudieron diferenciarse dos patrones distintos, uno que fue propio de los sitios SCA1, SCA2, TCT, ENS3 y ENS4, y otro que caracterizó a los sitios LPZ, ENS1 y ENS5. Este patrón observado en los cortejos no concuerda con ninguno de los patrones evidenciados utilizando marcadores moleculares (Tabla XI, Figura 10).

En resumen, dentro de *P. sierra*, la única concordancia observada fue entre los resultados del ADN mitocondrial y de los loci microsatélites pues ambos métodos detectaron la discontinuidad genética que separa al linaje de California del linaje de la península de Baja California, sin embargo, dependiendo del marcador molecular utilizado, estas ocuparon diferentes niveles jerárquicos, por lo que no concordaron en lo referente a la magnitud u orden secuencial de ésta con respecto a otras discontinuidades.

En general, para todas las discontinuidades genéticas observadas, se puede encontrar algún evento vicariante (Tabla XI) que explique la interrupción en el flujo genético y la consecuente divergencia entre especies, linajes o poblaciones. En particular

destacan dos, 1) la separación de la península de Baja California y la formación del Golfo de California desde mitad del Mioceno hasta principios del Pleistoceno, y 2) la Transgresión Norteña del Golfo hasta el paso de San Gorgonio (Formación Imperial) y del Lago Mojave a través del Río Colorado (Formación Bouse) a finales del Pleistoceno, por concordar relativamente bien, geográfica y cronológicamente, con las dos principales discontinuidades genéticas observadas en esta investigación, respectivamente: 1) la separación entre el linaje que dio origen a *P. sura* del que dio origen a *P. sierra* y *P. atromedia*, y 2) la separación entre los linajes que dieron origen a estas dos últimas especies así como la que dio origen a los linajes mitocondriales, de California y Peninsular, observados dentro de *P. sierra*.

Destaca que la datación de eventos vicariantes basada en un grupo de autores coincide mejor con las discontinuidades mitocondriales, mientras que la datación basada en otro grupo de autores, coincide mejor con las discontinuidades de cortejo (Tabla XI).

Tabla XI. Cuadro comparativo de las discontinuidades genéticas (mitocondriales y nucleares) y de comportamiento entre *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* y dentro de *P. sierra*, y los posibles eventos vicariantes que los explican. Precediendo a cada valor de discontinuidad, se indica entre corchetes su respectivo valor jerárquico. ¹ Los tiempos estimados de divergencia de ADN mitocondrial se obtuvieron de Correa-Ramírez *et al.* (en preparación). ^{2 y 3} Las dataciones aproximadas de los eventos vicariantes se obtuvieron de ² Grismer (1994), Riddle *et al.* (2000c), y/o Murphy y Aguirre-León (2002) y ³ Wood *et al.* (2008). [†] Tiempos estimados de divergencia no específicos a los sitios indicados, sino a todas las poblaciones del linaje Peninsular de *P. sierra* (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación).

Linajes o poblaciones	Discontinuidad			Evento vicariante ^{2,3}
	ADN mitocondrial (tiempo de divergencia) ¹	Loci microsatélites (F _{ST} medio)	Cortejo (Elementos compartidos)	
<i>P. sura</i> y <i>P. atromedia</i>	[1] 5.6 ma	-	[2] 1 de 3	[1 ^{2,3}] Golfo de California (aprox. 12-5 ma) ^{2,3} [3 ³] Formación Bouse (aprox. 6-5.3 ma) ³
<i>P. sura</i> y <i>P. sierra</i>	[1] 5.6 ma	-	[1] 0 de 7	[1 ^{2,3}] Golfo de California (aprox. 12-5 ma) ^{2,3}
<i>P. sierra</i> y <i>P. atromedia</i>	[2] 4.17 ma	[1] 0.212	[1] 0 de 7	[2 ²] Transgresión Norteña (aprox. 3 ma) ² [2 ³] Formación Imperial (aprox. 10-6 ma) ³
<i>P. sierra</i> California y <i>P. sierra</i> península BC	[3] 2.05 ma	[3] 0.079	-	[2 ²] Transgresión Norteña (aprox. 3 ma) ² [3 ³] Formación Bouse (aprox. 6-5.3 ma) ³
Sitio TCT y resto sitios <i>P. sierra</i>	[4] [†] 8-11 ka	[2] 0.112	-	[4 ²] Desertificación post-glaciación (10 ka) ²
Sitio NOV y resto sitios <i>P. sierra</i>	[4] [†] 8-11 ka	[4] 0.078	-	[2 ²] Inundación Istmo de La Paz (aprox. 3 ma) ² [3 ²] Canal Vizcaíno (aprox. 1.5 ma) ² [4 ²] Desertificación post-glaciación (10 ka) ²
Sitios LPZ, ENS4, ENS5 y sitios ENS1, ENS3, TCT, SCA1, SCA2	[4] [†] 8-11 ka	-	4 de 4 [3] (patrones distintos)	[4 ²] Desertificación post-glaciación (10 ka) ²

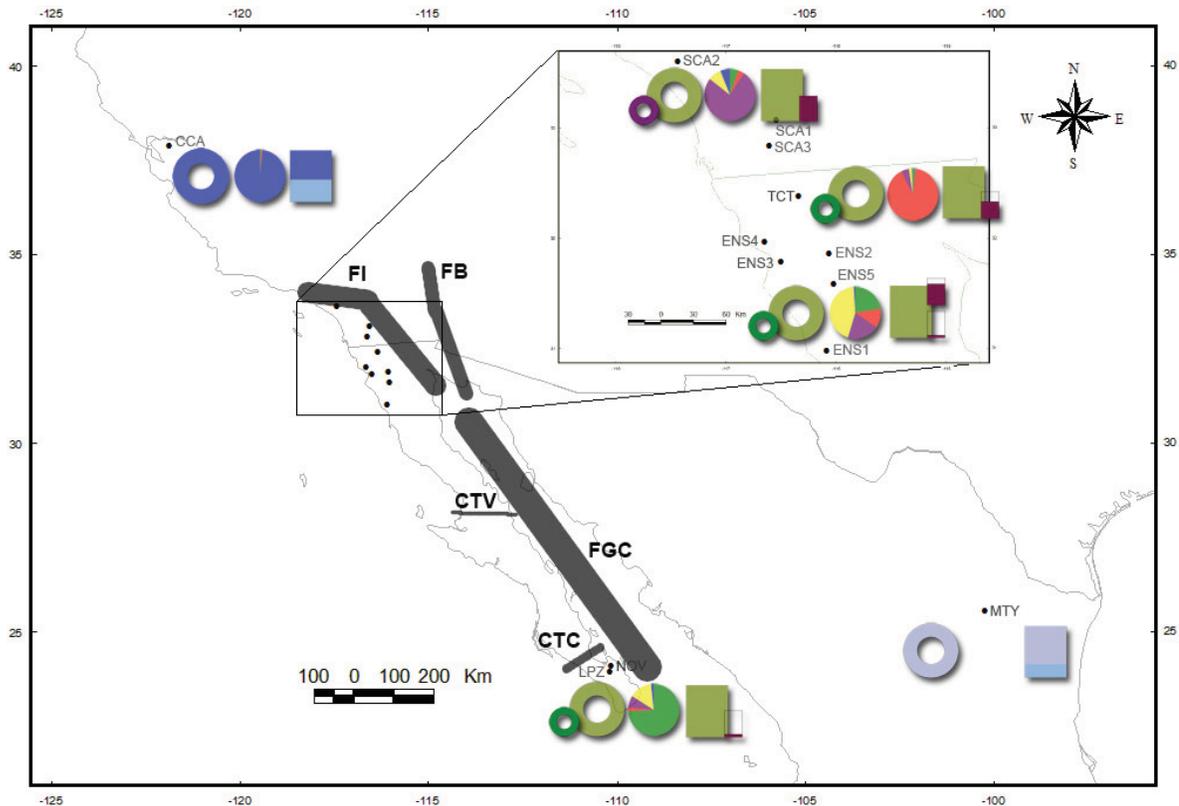


Figura 10. Mapa que representa el patrón de concordancias entre la filogenia mitocondrial propuesta por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), y los datos de genética poblacional y de conducta generados en el presente estudio para cinco poblaciones: Centro de California (CCA), El Novillo/La Paz (NOV, LPZ), Ensenada (ENS1-5), Tecate (TCT), Sur de California (SCA1-3) y Monterrey (MTY). Los anillos grandes representan la filogenia basada en ADN mitocondrial para especies (azul = *P. atromedia*; gris = *P. sura*; verde = *P. sierra*) y linajes (verde = linaje Peninsular; vino = linaje Californiano), datos obtenidos de Correa-Ramírez *et al.* (en preparación). Los gráficos de pastel representan las proporciones de los coeficientes de membresía a grupos según los análisis realizados en STRUCTURE con base en frecuencias alélicas de siete loci microsátelites (relaciones color-grupo definido por: azul oscuro = CCA; verde = NOV; amarillo = ENS; rojo = TCT; vino = SCA). Los gráficos de barra representan las frecuencias relativas de movimientos de cortejo (azul oscuro = movimiento tipo VI; gris = movimiento tipo V; azul claro = movimiento tipo VII; verde = movimientos tipo I, II, III y IV); en el caso de *P. sierra* también se muestran barras con las frecuencias relativas de los movimientos III y IV. Las líneas representan eventos vicariantes con grosores proporcionales a la antigüedad del evento, del más antiguo al más reciente, formación del Golfo de California = FGC (hace 12-5 ma), Formación Imperial = FI (10-6 ma), Formación Bouse = FB (6-5.3 ma), Canal Transpeninsular de la Región del Cabo = CTC (3 ma), Canal Transpeninsular del Vizcaíno = CTV (1.5 ma). Ver datación según autores en la Tabla XI.

6.12 Evidencias de hibridación

6.12.1 Hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia*

No se llevaron a cabo experimentos de apareamiento entre especies, por lo que las evidencias de hibridación entre las dos especies sólo se evaluaron por comparación de sus cortejos en busca de algunos que fueran intermedios. Como ya se describió en la sección anterior, no se presentó ningún traslape entre los cortejos de *P. sierra* y *P. atromedia*. El primero constó de cuatro elementos característicos; y el segundo, de tres. Ningún elemento de una especie fue observado en la otra especie. Por lo tanto, los experimentos de conducta no produjeron ninguna evidencia de hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia*.

Por el tipo de muestreo realizado en esta investigación, en el que la gran mayoría de los sitios se encontraban en la zona en que hipotéticamente podrían encontrarse híbridos y sólo dos sitios fueron analizados como referencia, una de cada especie (NOV por *P. sierra* y CCA por *P. atromedia*), la identificación de alelos privados no fue el procedimiento más indicado para detectar híbridos entre las dos especies. En su lugar se requirió identificar alelos con frecuencias altas (al menos en relación con las frecuencias en otros sitios) en CCA, ausentes (o de muy baja frecuencia) en NOV y con frecuencias intermedias en las poblaciones de distribución media (Ensenada, Tecate y sur de California). Los tres alelos que más se aproximaron a esta condición y por lo tanto se pueden utilizar para la detección de híbridos, fueron Psier04-136, Psier21-98 y Psier40-136 y se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII Frecuencias alélicas de los alelos casi diagnósticos entre *P. sierra* y *P. atromedia*. Cumplen la condición de estar presentes en proporción relativamente alta en CCA, relativamente baja en NOV e intermedia en los sitios geográficamente intermedios.

Locus	Alelo (Pares de bases)	Frecuencia alélica								
		NOV	ENS1	ENS2	ENS3	ENS4	TCT	SCA1	SCA2	CCA
Psier04	152	0.074	0.000	0.037	0.114	0.176	0.043	0.028	0.119	0.367
Psier21	98	0.074	0.214	0.259	0.243	0.176	0.043	0.361	0.262	0.867
Psier40	136	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.467

Además el análisis de asignación por probabilidades bayesianas permitió extraer más de la información contenida en las frecuencias alélicas de toda la base de datos y detectar la presencia de híbridos entre *P. sierra* y *P. atromedia*.

Según los resultados del análisis del programa STRUCTURE (Figura 11A) incluyendo los nueve sitios de muestreo, en todos ellos se encontraron individuos con cierto porcentaje de su genoma asignado al grupo definido por CCA. Tal porcentaje fue en general reducido y alcanzó una media de 2% (N=213), pero de este porcentaje, la mitad fue aportada por sólo seis individuos que tuvieron porcentajes de asignación o coeficientes de membresía al grupo definido por CCA, lo suficientemente altos como para considerar que tenían ancestría mezclada entre *P. sierra* y *P. atromedia*. Estos fueron SCA1-03, SCA2-33, SCA2-01, SCA1-17, ENS2-25 y NOV-24, con probabilidades de asignación de 57, 51, 33, 28, 24 y 12%, respectivamente. Aunque la frecuencia de estos individuos es muy baja para observar un patrón clinal, se puede observar que los dos sitios de muestreo más norteños de *P. sierra* mostraron valores a dos órdenes de magnitud de los otros dos sitios, tanto en frecuencia de individuos de ancestría mezclada como en los porcentajes de asignación al grupo definido por CCA.

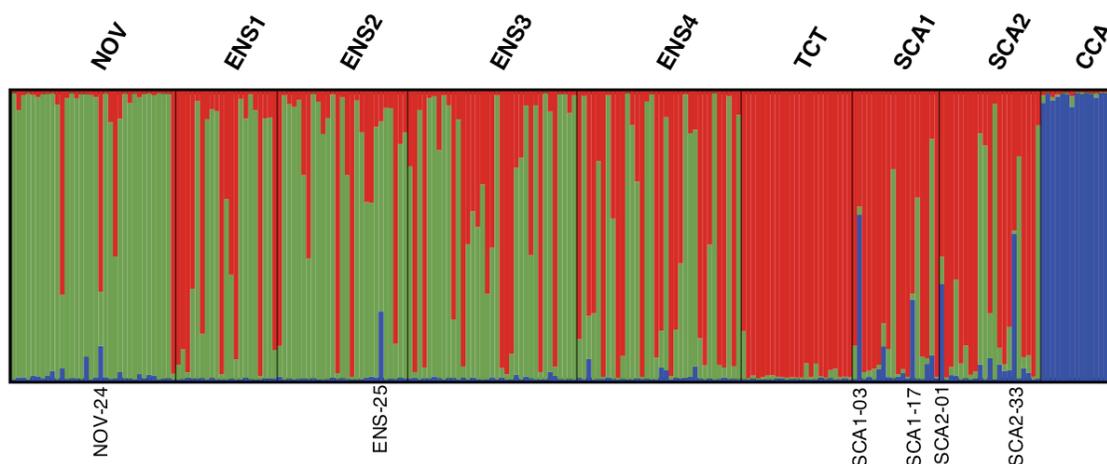


Figura 11. Diagrama de STRUCTURE resultante del análisis de asignación utilizando nueve sitios de muestreo de *P. sierra* y *P. atromedia*. En color azul se muestra la proporción del genoma de cada individuo que proviene del grupo definido por CCA, es decir *P. atromedia*. Dos individuos en SCA1, dos en SCA2, uno en NOV y uno en ENS2 aparecen señalados, tienen suficiente proporción de su genoma proveniente de *P. atromedia* para considerarlos como híbridos inter específicos.

6.12.2 Hibridación entre los linajes mitocondriales Californiano y Peninsular, dentro de *P. sierra*.

Contrario a lo que sucedió a nivel de especies, donde las diferencias entre cortejos eran bien evidentes, tratar de identificar cortejos intermedios entre los dos linajes mitocondriales de *P. sierra*, el de California y el de la península de Baja California fue complicado debido a que las diferencias entre ambos cortejos, aunque significativas (Tabla V), fueron muy sutiles, ya que todas los sitios con excepción de ENS5 (N=1) presentaron los mismos cuatro elementos (Tabla IV) y cualquier variante que pudiera interpretarse como debida a hibridación, podría caer dentro de la variación que se da normalmente entre individuos. Por estas razones no se consideró que los cortejos dentro de *P. sierra* proveyeran evidencias de hibridación entre los linajes mitocondriales.

En cambio, a partir de los experimentos de apareamiento dentro de *P. sierra*, sí se obtuvo información. De un total de 29 experimentos, sólo en dos (7%) se presentaron apareamientos, en los que participó el mismo macho (Tabla III). Uno se dio en un emparejamiento del tipo “Intralinaje” (N=8), entre un macho y una hembra originarios del mismo sitio de muestreo, SCA1. La cópula duró aproximadamente 120 minutos y estuvo precedida por poco más de 10 minutos de cortejo. El otro apareamiento se presentó en un emparejamiento del tipo “Interlinaje corto” (N=13) entre el mismo macho y una hembra de ENS1, por lo tanto estos consortes pertenecían a linajes mitocondriales distintos, el macho al linaje de California y la hembra al linaje de la península de Baja California. Esta cópula duró aproximadamente 100 minutos con poco más de tres minutos de cortejo previo. Esta hembra produjo un ovisaco, sin embargo de éste no eclosionaron arañuelas hasta el momento en que se fijaron en alcohol. La cantidad tan limitada de apareamientos que se obtuvo, no permitió hacer comparaciones estadísticas, pero se obtuvo igual cantidad de cópulas en emparejamientos “Intralinaje” que entre emparejamientos “Interlinaje corto” mientras que no se obtuvo ninguna cópula en emparejamientos “Intralinaje largo”. Esto indica que al menos entre sitios relativamente próximos, el linaje mitocondrial al que pertenecen los machos, no influye en la probabilidad de que sean aceptados por las hembras.

En la revisión de los resultados del segundo análisis del programa STRUCTURE, para el cual se utilizaron únicamente los ocho sitios de muestreo de *P. sierra*, en todos los sitios se encontraron individuos que podrían considerarse de ancestría mezclada entre el linaje de California y el linaje de la península de Baja California, dentro de *P. sierra*. Dejando de lado los seis individuos de ancestría mezclada entre *P. sierra* y *P. atromedia* (ver sección “Hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia*”), NOV sumó 4 (12%) individuos de ancestría mezclada entre los dos linajes de *P. sierra*; Ensenada 32 (28%); TCT, 2 (9%); y sur de California, 14 (40%). Los promedios de proporción de asignación del genoma al grupo definido por SCA en las poblaciones de NOV, Ensenada, TCT y sur de California fueron 0.07, 0.20, 0.05 y 0.80 respectivamente. Al graficar cada individuo por su posición geográfica relativa y la proporción de su genoma asignado al grupo definido por SCA, se observa una clina en este parámetro, tal como se esperaría en una zona híbrida entre estos

dos linajes (Figura 12). La mayor parte de la gráfica está ocupada por sitios que estarían dentro de la zona híbrida, la cual tendría como mínimo una amplitud de 300 km.

Además de individuos de ancestría mezclada, se detectaron individuos que podrían considerarse como migrantes de linaje distinto (las proporciones de asignación o coeficiente de membresía en su genoma a un grupo perteneciente a un linaje que no fuera el representativo de los individuos del mismo sitio superaba 0.88). En Ensenada 10 y en el sur de California 2.

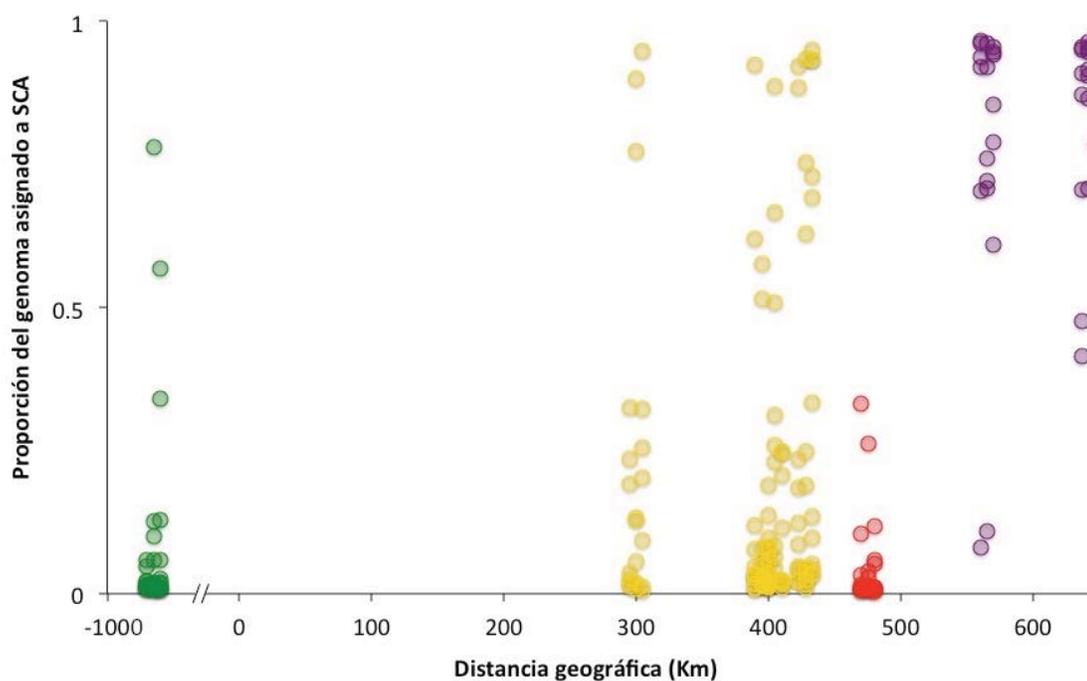


Figura 12. Clina en la composición genómica de individuos de *P. sierra* muestreados en ocho sitios de la península de Baja California y California, E.U.A. y genotipificados con siete loci microsatélites. Se grafica la distancia en kilómetros hacia un punto central entre los sitios más extremos, contra la proporción del genoma que proviene del grupo definido por SCA, es decir el linaje mitocondrial de California. NOV se representa en color verde, el conjunto de sitios de Ensenada (ENS), en amarillo; TCT, en rojo y los dos sitios del sur de California (SCA) en vino.

7 DISCUSIÓN

7.1 Comportamientos de cortejo

Los cortejos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, no se habían descrito previamente. Coinciden en sus rasgos más generales con lo que se ha descrito como el comportamiento típico de cortejo de la familia Lycosidae. La mayoría de las especies de esta familia, presentan cortejos “nivel II” que es la denominación dada por Platnick (1971) para clasificar a los cortejos de las familias que se caracterizan porque las feromonas de la hembra son las que constituyen el estímulo inicial que induce o desencadena el cortejo en los machos. Los datos recolectados en este estudio indican que los machos de *P. sierra* inician la conducta del cortejo presuntamente debido a las feromonas impregnadas en el sustrato por las hembras, aún en ausencia física de las hembras, primero con movimientos quimiotácticos de exploración del sustrato con las patas y los pedipalpos, y luego con los diferentes movimientos estereotipados que caracterizaron a cada especie.

Los machos utilizaron el abdomen, las patas y los pedipalpos para realizar estos movimientos mediante los que transmitieron estímulos tanto visuales como vibratorios a las hembras, intercalados entre pausas de inactividad. Esto, según la descripción hecha por Foelix (2011) sobre los principales tipos de cortejo en arañas, es lo típico en las especies de la familia Lycosidae y corresponde también con la descripción de los principales despliegues de cortejo ejecutados por arañas del género *Pardosa* según Chiarle *et al.* (2013), y fue confirmado con las observaciones hechas en este estudio.

Por otra parte, el aparato diseñado en este estudio para llevar a cabo los experimentos de cortejo y apareamiento, descrito en Romero-Vivas *et al.* (2012), permitió detectar la importancia de las señales acústicas, químicas y visuales, muchas veces simultáneamente, durante los cortejos. Según la literatura, estos tres tipos de señales son fundamentales para el reconocimiento de individuos de la misma especie, y el aislamiento entre especies distintas, particularmente dentro de Lycosidae (Tietjen y Rovner, 1982; Uetz

y Stratton, 1982). Su papel en el aislamiento entre especies no pudo comprobarse en el presente estudio debido a que no se llevaron a cabo experimentos de cruza interespecíficas.

Uetz y Stratton (1982) especificaron que los tipos de sonidos producidos por arañas del género Lycosidae pueden ser percusiones y estridulaciones. Además existen las vibraciones, pero no han sido reportadas para Lycosidae. Las observaciones hechas en el presente estudio parecen indicar que las tres fuentes de producción de sonido se pueden encontrar en *P. sierra*, pero comprobar esto requerirá describir los mecanismos productores de sonido y las estructuras involucradas en *P. sierra*. Hasta el momento, no se han encontrado estructuras de estrías esclerosadas en pedipalpos o costados de los quelíceros que pudieran servir como órganos estridulantes (Jiménez, com. personal), por lo que se requerirán más estudios.

La posición adoptada para la cópula entre machos y hembras, también correspondió a lo descrito en la literatura de otras especies de arañas lobo. Los machos se montaron sobre el prosoma de la hembra aproximándose desde el frente y luego se inclinaban hacia algún lado del opistosoma de la hembra, al mismo tiempo que ella lo giraba para que el macho pudiera alcanzar el epiginio e insertar uno de sus pedipalpos. Luego había un cambio de lado para utilizar el otro pedipalpo, lo cual se repetía varias veces durante la cópula. Esta posición corresponde al “Tipo 3” según Foelix (2011) y es característica de varias familias de arañas corredoras modernas, como Lycosidae, Salticidae, Clubionidae o Thomisidae.

Varios investigadores han estudiado el cortejo de especies de arañas lobo relativamente cercanas a *Pardosa sierra*. Por ejemplo en el género *Schizocosa* (Stratton y Uetz, 1986), en el género *Lycosa* (Costa *et al.*, 2000) y en el género *Pardosa* (Vlček, 1995; Töpfer-Hofmann *et al.*, 2000) han dividido los cortejos en varios “comportamientos” o “fases”, es decir elementos discretos, diferenciados y estereotipados de los que se componen y que pueden servir como unidades de comparación. No hay una regla general a seguir para la selección de estos elementos, por lo que son hasta cierto punto arbitrarios. En el presente trabajo, al seleccionar tales elementos se buscó que fueran lo menos antropocéntricos posible, pero que su detectabilidad y medición fuera sencilla, de modo que aportaran información práctica, confiable, representativa y sobretodo útil para hacer

comparaciones. Para ello se procuró que los elementos cumplieran los siguientes criterios: 1) ser los mínimamente indispensables para que un macho fuera aceptado por una hembra (esto no fue el caso de *P. sura*, porque no hubo apareamientos y por lo tanto no se pudo comprobar); 2) estar presentes en el repertorio de los machos procedentes de todos los sitios estudiadas (solo aplicable en *P. sierra*, ya que fue la única especie con varios sitios muestreados); 3) ser detectables para el observador humano, tanto visual como acústicamente; y 4) requerir para su percepción, al menos dos sentidos, el visual y el vibracional/acústico, por lo que presumiblemente transmitirían más información que otros elementos que sólo utilizan un sentido. En referencia a este último criterio existen abundantes estudios donde se recalca la importancia evolutiva del carácter multimodal del cortejo de las arañas, y se comprueba que las arañas efectivamente responden a estímulos acústicos y a movimientos (ver Uetz y Roberts 2002).

Sobre la base anterior, se escogieron como elementos importantes en el cortejo, un total siete movimientos que fueron comparados en su carácter de presencia/ausencia (Tabla IV), y en frecuencia e intensidad (descripción en resultados). La presencia o ausencia de estos movimientos permitió diferenciar tres cortejos, uno característico de cada especie, aunque no uniformemente diferenciados, pues los de *P. atromedia* y *P. sura* fueron parecidos, mientras que no tuvieron ninguna coincidencia con los de *P. sierra*, que no compartió ninguno de los cuatro movimientos típicos de su cortejo con *P. atromedia* o *P. sura*. En cambio, estas dos últimas especies, compartieron un movimiento y tuvieron uno exclusivo cada una. El VII movimiento fue el más conspicuo por su duración, amplitud del desplazamiento corporal y desplazamiento de las patas. Los que fueron exclusivos, fueron menos conspicuos y fueron relativamente semejantes, por lo que probablemente uno derivó de otro o tuvieron un origen común. Dado que, como se mencionó anteriormente, la selección de los elementos de análisis puede ser arbitraria, sólo se pueden hacer comparaciones relativas entre los diferentes estudios. En el de Costa *et al.* (2000), *Lycosa thorelli* mostró dos tipos de movimientos y *L. carbonelli* tres. Uno de ellos fue compartido entre ambas especies. Stratton y Uetz (1986) para *Schizocosa ocreata* observaron cuatro tipos de movimientos mientras que para *S. rovnneri* dos, uno de ellos, el de percepción de las feromonas de la hembra, estuvo compartido entre las dos especies. Töpfer-Hofmann *et al.*

(2000) estudiaron cinco especies de *Pardosa* con muchos tipos de movimientos, donde cada especie tuvo al menos un movimiento distintivo y las diferencias se acentuaban hacia las fases finales del cortejo.

En el presente estudio, la frecuencia e intensidad en que los machos de *P. sierra* provenientes de diferentes sitios desplegaron sus movimientos característicos, permitió además identificar dos patrones de cortejo dentro de la especie (Tabla V). El único otro estudio de arañas lobo encontrado en el que se analiza la diversidad intraespecífica de variaciones del cortejo fue el llevado a cabo por Miller *et al.* (1998) con 12 poblaciones de *Schizocosa crassipes* (Walckenaer, 1837). Ellos encontraron que los mismos cuatro elementos de cortejo estuvieron presentes en todas las poblaciones pero variaron significativamente en cuanto a su frecuencia y ordenación aunque no siguieron algún patrón geográfico específico. Lo mismo pudo observarse con respecto a machos de *P. sierra* de diferentes sitios de muestreo en el presente trabajo.

De acuerdo a lo antes expuesto, es posible considerar que las semejanzas y diferencias entre cortejos de las tres especies observadas en el presente estudio, están dentro del rango reportado para otras especies de arañas lobo, y que la variación intraespecífica se puede verificar con la variación de frecuencias relativas de los movimientos que componen los cortejos, mientras que los niveles de variación entre especies se observan en la presencia/ausencia y compartición de dichos elementos o movimientos.

Rendall y Di Fiore (2007) acumularon y analizaron información teórica y resultados de varios estudios para sostener que los rasgos de comportamiento no son, *per se*, más proclives que los rasgos morfológicos o moleculares a presentar homoplasia, y por lo tanto, bien elegidos, pueden ser usados como cualquiera de los otros dos, y con frecuencia aventajan a los caracteres morfológicos en la reconstrucción de filogenias. En particular mencionan que las exhibiciones de cortejo están entre los rasgos de comportamiento más útiles para este fin, especialmente a nivel de géneros, especies y subespecies. De igual forma Uetz y Stratton (1982) ya destacaban que el estudio de la comunicación acústica en arañas y su función biológica podría descubrir o confirmar las relaciones filogenéticas y patrones evolutivos dentro y entre grupos. En arañas de la familia Lycosidae, los abundantes estudios sobre comportamiento, se han utilizado en taxonomía, principalmente

para diferenciar especies crípticas (por ejemplo Stratton y Uetz, 1986; Costa *et al.*, 2000; Töpfer-Hofmann *et al.*, 2000) y en al menos un caso (Stratton, 2005) para construir una filogenia que concordó mayoritariamente con otra filogenia construida a partir de caracteres morfológicos. Considerando estos antecedentes y el nivel de variación y resolución encontrada en los movimientos que componen los cortejos de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, es posible suponer que estos elementos del cortejo tiene la suficiente validez para ser comparados con la filogenia basada en rasgos morfológicos y moleculares (Correa-Ramírez *et al.*, 2010b; Correa-Ramírez *et al.*, en preparación). Entre estas filogenias, la más reciente (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación) hipotetiza que *P. sierra* y *P. atromedia* están más estrechamente emparentadas entre sí que con *P. sura*. Esto no coincide con lo observado en el presente estudio, donde *P. atromedia* y *P. sura* tienen cortejos similares, mientras que son muy distintos al de *P. sierra*. Hasta el momento, dentro del grupo *lapidicina* (al cual pertenecen *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*) únicamente se ha publicado la descripción del cortejo *P. lapidicina*, hecha por Eason (1969). De acuerdo con ésta, el cortejo de *P. lapidicina* no presenta despliegues estereotipados conspicuos, y se caracteriza más bien por las persecuciones y toques entre macho y hembra así como esporádicos movimientos de los pedipalpos. Este tipo de comportamientos sólo se observó en algunos machos de *P. sierra*, por lo que podría decirse que de los tres cortejos observados en el presente estudio, el de *P. sierra* es el más parecido al de *P. lapidicina*. Esto tampoco coincide con la filogenia propuesta por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), pues en ella, *P. lapidicina* se encuentra más cercana a *P. atromedia* que a *P. sierra*. Obviamente es necesario tener información sobre los cortejos de las otras especies del grupo (y grupos cercanos) para poder hacer una comparación más completa y posiblemente construir una filogenia del grupo a partir de los cortejos. También se requiere aumentar las observaciones de individuos y sitios de muestreo de *P. atromedia* y *P. sura*, para tener idea de la consistencia de los cortejos hasta ahora observados y descritos para este par de especies. Sin embargo las discrepancias que se acaban de mencionar entre las semejanzas entre cortejos de diferentes especies y la filogenia propuesta por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) tienen algunas implicaciones importantes por lo que este tema se retoma más adelante, en la sección “Contraste entre las hipótesis de diversificación por vicarianza y selección”.

7.2 Calibración de los loci microsatélites

El presente estudio amplía los conocimientos generados en el estudio de Correa-Ramírez (2010). Por lo tanto, los presentes resultados se comparan con aquellos, en particular en lo que respecta a los datos de genética poblacional de *P. sierra* porque no se cuenta con ningún otro antecedente donde se hayan utilizado loci microsatélites en genética poblacional de estas arañas. Correa-Ramírez aisló y caracterizó 10 loci microsatélites (Correa-Ramírez, 2010; Correa-Ramírez *et al.*, 2010a) de los cuales utilizó cinco para su estudio de genética poblacional, mismos que se utilizaron en el presente, adicionando otros dos de los 10 desarrollados originalmente. Además, de los siete sitios de muestreo que Correa-Ramírez (2010) incluyó en su estudio, “El Novillo”, NOV, fue el único incluido en el presente (con 34 de 52 individuos), y la localidad de “Ensenada” fue muy cercana al sitio ENS4 analizado aquí.

En el presente estudio se encontró un gran porcentaje (56%) de loci a lo largo de los sitios de muestreo que se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto contrasta fuertemente con lo encontrado por Correa-Ramírez (2010) que sólo encontró desviaciones en tres de 35 (9%) sitios por locus (entre ellos Psier20 en NOV, que también resultó con desviación en el presente estudio). Este autor atribuyó tales disequilibrios a los sistemas reproductivos de pareja después de mezcla de poblaciones.

Las posibles causas para encontrar desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg con loci microsatélites son muchas. Algunas tienen que ver con limitaciones, inexactitudes metodológicas o particularidades de cada locus particular (van Oosterhout *et al.*, 2004; Selkoe y Toonen, 2006), como por ejemplo los alelos nulos; errores durante la genotipificación debidos a bandas numerarias o a competencia de alelos de menor talla siendo amplificadas más rápido y en mayor cantidad que los de mayor talla (“dropout alélico” en inglés). Otras tienen que ver con fenómenos o condiciones que se presentan a nivel de poblaciones (Hartl y Clark, 2007) como, entre otras; la endogamia; efectos de la deriva genética debido a tamaños efectivos poblacionales reducidos (producidas, a su vez, por cuellos de botella, efecto fundador); sistemas reproductivos que impiden la reproducción aleatoria; el traslape de generaciones; la presencia de reproducción asexual; presencia de dos o más poblaciones o subestructura en un mismo sitio de muestreo (efecto

Wahlund); o efecto de mutaciones, migración y selección directa o indirecta sobre el locus. La mayoría de estas causas, se manifiestan como un déficit de heterocigotos, que es lo que se encontró en todos los sitios por locus desviados en el presente estudio. Algunos como la endogamia, suelen manifestarse en todos los loci con los que se ha genotipificado cada sitio (Selkoe y Toonen, 2006).

De acuerdo a los análisis llevados a cabo para detectar si estas desviaciones fueron provocadas por problemas “metodológicos” (Beaumont y Nichols, 1996; van Oosterhout *et al.*, 2004; Chapuis y Estoup, 2007), sólo la existencia de alelos nulos y, en menor medida, de bandas numerarias resultaron como posibles causas; por el contrario, Correa-Ramírez (2010) no detectó alelos nulos o bandas numerarias. Sin embargo, 43% de las desviaciones que se encontraron en el presente estudio, se dieron en los dos loci (Psier29 y Psier40) que este autor no incluyó en su trabajo y además Psier29 resultó propenso a presentar alelos nulos (Correa-Ramírez, 2010). En el presente estudio, precisamente los loci Psier 29 y Psier40 se desviaron en el sitio NOV, pero también el locus Psier20, coincidiendo con Correa-Ramírez (2010); sin embargo para el locus Psier20 en la misma localidad de NOV, este autor encontró una frecuencia de alelos nulos de 9% mientras que en el presente estudio fue de 27%. Estas coincidencias parciales entre ambos estudios respecto al sitio NOV no sorprenden, pues las frecuencias alélicas para este sitio resultaron similares en ambos estudios (ver Anexo 3), mientras que las discrepancias pudieran explicarse porque el total de individuos que estuvieron disponibles y se lograron genotipificar para dicho sitio en el presente estudio, fueron sólo 35 en comparación con los 52 de aquél; y aún más probablemente, porque se utilizaron plataformas químicas distintas para llevar a cabo la genotipificación.

¿Cómo explicar entonces la presencia de la alta proporción de alelos nulos en el resto de los sitios en el presente estudio? El ejercicio de validación de la base de datos que se llevó a cabo dio como resultado un valor de tasa media de error por alelo de 15%. Correa-Ramírez (2010) no reportó una estimación de tasa de error de su genotipificación, pero Pompanon *et al.*, (2005) establecieron que el rango de estas tasas de error observado entre los pocos estudios publicados que lo han reportado, varía entre 0.2 y 15%. Evidentemente el valor obtenido en el presente estudio se encuentra en el extremo superior

de los que se han reportado, e indica que la calidad de los datos genéticos que se obtuvieron no es la óptima. Esto potencialmente explicaría también los errores de genotipificación por bandas numerarias, dispersos entre loci y sitios de muestreo, además de la baja calidad de los productos de amplificación obtenidos. Sin embargo, el efecto de este tipo de inconsistencias sobre las inferencias resultantes en estudios de genética poblacional, que están basados en frecuencias alélicas, no es tan dramático como lo es en estudios basados en la identificación de individuos (Pompanon *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006).

Todas estas inconsistencias en los resultados de las reacciones en cadena de la polimerasa probablemente son el resultado de un ADN templado de calidad subóptima (Selkoe y Toonen, 2006), observable en el nivel de degradación de la mayoría de los ADNs en geles de agarosa (Anexo 4). Otra causa podría ser la distancia genética entre los sitios utilizados en el presente estudio y la población focal que se utilizó para aislar los loci microsatélites (Correa-Ramírez, 2010; Correa-Ramírez *et al.*, 2010a), ya que la probabilidad de tener problemas de amplificación, en particular por alelos nulos, aumenta con el nivel de diferenciación entre la población focal y el resto de las poblaciones genotipificadas (Li *et al.*, 2003; Chapuis y Estoup, 2007).

En cuanto a explicaciones que contemplen fenómenos o condiciones que se dan a nivel de las poblaciones, Correa-Ramírez (2010) sugirió que los tamaños poblacionales relativamente altos y la alta capacidad de dispersión de estas arañas harían poco probable que la endogamia o los efectos de la deriva genética afectaran a las poblaciones de *P. sierra*. Estas observaciones se corroboran en el presente estudio por el hecho de que ninguno de los sitios muestreados resultó con desviaciones significativas en todos los loci que se usaron para genotipificar, lo cual sería el patrón esperado si estos fenómenos estuvieran teniendo lugar (Selkoe y Toonen, 2006), por lo que se pueden descartar. Existen otros fenómenos cuyo efecto puede manifestarse en algunos loci pero no en todos dentro de cada sitio de muestreo. Correa-Ramírez (2010) atribuyó las desviaciones que él encontró a selección sexual después de mezcla de poblaciones. Con los datos generados en el presente estudio, no se puede ni descartar ni probar la influencia que la selección, tanto natural como sexual, pudiera estar ejerciendo sobre algunos loci en algunos sitios de muestreo. Se requeriría de estudios con experimentos específicos donde se profundice en la biología de

la especie. Otra posibilidad que no puede ni descartarse ni probarse es la existencia de efecto Wahlund. Especialmente los resultados del análisis del programa STRUCTURE (ver más adelante), mostraron que la frecuencia de supuestos migrantes era relativamente alta y esta mezcla de individuos de poblaciones distintas, aunada a algo de selección, como planteó Correa-Ramírez (2010) podría estar provocando las desviaciones observadas en algunos de los sitios.

Resumiendo, sin descartar los casos específicos en algunos sitios donde pudiera haber influido la selección sexual o natural, la coincidencia casi perfecta entre las desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg y la frecuencia de alelos nulos, y el hecho de que ningún sitio muestreado que presentara desequilibrio de Hardy-Weinberg tuviera estimaciones bajas de alelos nulos (todas fueron mayores a 13%), sugiere que la presencia de alelos nulos es la causa más probable de las desviaciones observadas. Tener certeza absoluta de esto requeriría utilizar métodos de diagnóstico directo como el examen de patrones de herencia en pedigrís (Pompanon *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006). La frecuencia de alelos nulos parece ser consecuencia de calidad subóptima de las muestras de ADN utilizadas y a la distancia genética entre los sitios utilizados en el presente estudio y el que se utilizó para desarrollar los loci microsatélites. Sin embargo, es también conocido que los alelos nulos tienen efectos pequeños o nulos en estudios de genética de poblaciones. Por ejemplo Carlsson (2008) demostró que los métodos de asignación de individuos por probabilidades bayesianas utilizando loci microsatélites, son bastante resistentes a la presencia de alelos nulos, mientras que son mucho más sensibles al nivel de diferenciación genética real entre poblaciones y la cantidad de loci utilizados para la genotipificación.

En cuanto a las pruebas de desequilibrio de ligamiento gamético, solo tres pares de loci resultaron correlacionados, pero únicamente en uno de nueve sitios cada uno. Por su parte, Correa-Ramírez (2010) no encontró ligamiento entre estos mismos pares de loci. Estos hechos llevan a pensar que el ligamiento encontrado en el presente estudio pudiera ser un artefacto de las deficiencias que se han venido mencionando, lo que junto con el hecho de que ocurrieron sin ningún patrón aparente, no hizo justificable desecharlos y sugiere que en este estudio, tampoco afectó fuertemente los resultados obtenidos ni sus interpretaciones.

La herencia Mendeliana y los niveles de homoplasia de los microsatélites no se pusieron a prueba debido a que demandan un importante esfuerzo económico/técnico y en general se considera que exceden los estándares requeridos para la mayoría de las aplicaciones a las que se destinan los loci microsatélites en estudios de ecología o genética poblacional (Selkoe y Toonen, 2006).

7.3 Diversidad genética entre sitios de muestreo, número de poblaciones y estructura genética poblacional

El parámetro más versátil para hacer comparaciones de diversidad genética es el de riqueza alélica, pues está diseñado para contrarrestar el efecto de los diferentes tamaños de muestra permitiendo así comparaciones más objetivas entre ellas (Leberg, 2002). Aunque no se logra eliminar por completo la subestimación de la riqueza conforme los tamaños de muestra se vuelven más pequeños, sigue siendo no obstante, la mejor opción. Esto se comprueba al comparar los resultados de diversidad genética obtenidos en Correa-Ramírez (2010) y el presente estudio para el único sitio muestreado en común, NOV, en donde los valores de individuos muestreados, número total de alelos, número de alelos efectivos y riqueza alélica (promediando sólo los cinco loci utilizados en los dos estudios) fueron, respectivamente, 51.8 individuos y 12.8, 8.28 y 7.97 alelos para el primer estudio y 34 individuos y 11.7, 6.22 y 7.33 alelos para el presente. Las diferencias en las magnitudes entre ambos estudios probablemente se deben a que algunos alelos no se encontraron en el presente estudio debido a un menor número de individuos genotipificados o la presencia de alelos nulos.

Comparando otros sitios muestreados, destaca que la riqueza es más homogénea a través de sitios y ligeramente mayor en general en el de Correa-Ramírez (entre 7 y 8.3 con promedio de 7.73 alelos) que en el presente (entre 4.5 y 8.9 con promedio de 7.36 alelos).

Además de entre todos los 15 sitios, los cuatro más norteños, CCA, SCA1, SCA2 y TCT (todos analizados en el presente estudio), fueron los que tuvieron los valores más pequeños de riqueza.

7.4 Número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional

Correa-Ramírez (2010) encontró valores de F_{ST} con un promedio de 0.0263 y un rango de 0.0028 a 0.0519, que son mucho menores a los del presente estudio, aún excluyendo a *P. atromedia* por ser otra especie, que tienen promedio de 0.0663 y rango de 0.0022 a 0.1425. Esta diferencia entre valores de los dos estudios indica que los sitios analizados en el presente, son genéticamente más diferentes entre sí que los sitios que estudió Correa-Ramírez (2010). Pero el valor de diferenciación que Correa-Ramírez encontró entre “El Novillo” y “Ensenada” fue aproximadamente de la mitad que el observado en el presente estudio entre NOV y ENS1, ENS2, ENS3 y ENS4. Esto indica que también otras causas contribuyeron a la disparidad general de los valores de F_{ST} observada entre los dos estudios. Estas causas no se pueden atribuir al uso de dos loci microsatélites adicionales, pues los valores de F_{ST} , en vez de disminuir, se incrementaron cuando fueron estimados excluyendo a Psier29 y Psier40. Se sabe que la presencia de alelos nulos provoca una sobreestimación de valores de F_{ST} y distancias genéticas (Chapuis y Estoup, 2007) y esto bien podría ser el caso debido a la gran incidencia de éstos en el presente estudio.

Los diversos análisis estadísticos llevados a cabo para determinar el número de poblaciones genéticamente homogéneas dieron resultados coincidentes con los valores de F_{ST} . En todos los análisis, CCA se diferenció claramente del resto de sitios de muestreo, y en todos los casos constituyó la discontinuidad genética de mayor magnitud como era esperable debido a que esto refleja la diferenciación entre las especie *P. sierra* y *P. atromedia*, previamente demostrada por Correa-Ramírez *et al.* (2010) con base en evidencia morfológica y de ADN mitocondrial. El análisis de varianza molecular, aunque encontró mayor varianza explicada entre grupos y menor dentro de sitios cuando se probó

el modelo que contrastaba una especie con otra, no fue estadísticamente significativo. En cambio el modelo en el que se separó CCA en un grupo, TCT en otro y el resto de los sitios de *P. sierra* en otro, resultó significativo aunque los valores de varianza entre grupos y dentro de sitios no fueron el más alto y el más bajo respectivamente. El resultado de asignación de individuos por probabilidades bayesianas realizado en el programa STRUCTURE fue también similar, encontrando que el número más probable de grupos fue tres ($K=3$), situando TCT en un grupo aparte del resto de los sitios de *P. sierra*. Estos dos resultados sugieren que TCT es un sitio genéticamente bastante distinto a todos los demás. En los dos análisis discriminantes en los que se representan gráficamente los individuos como puntos en una nube, TCT también resultó ser el sitio más diferenciado dentro de la nube de puntos de *P. sierra*. El análisis de dendrograma también coloca a TCT como un sitio aislado aunque con mayor semejanza con un sitio de Ensenada (ENS1). Esta conformación refleja con precisión las relaciones genéticas guardadas entre TCT y el resto de los sitios, observables en los valores de F_{ST} , pues lo ubica en la posición más alejada con respecto a CCA y la más cercana con respecto a ENS1, los cuales concuerdan, con el mayor y menor valor de F_{ST} de entre los mostrados por TCT que fueron 0.27 y 0.08 respectivamente (ver Tabla IX). Otro dato relevante es la ausencia de alelos privados en TCT pero presentes en CCA. Esto indica que estas dos poblaciones se originaron de manera distinta. CCA presentó cinco alelos privados, que constituye el 14% del total de alelos presentes en este sitio, y las frecuencias alélicas de cada uno de ellos dentro de cada locus fueron sin duda las más altas. Además de los 36 alelos presentes en el sitio, en promedio 52% fueron compartidos con otros sitios. Por el contrario, TCT es un sitio donde no se encontraron alelos privados, que tuvo la menor riqueza alélica entre los sitios de *P. sierra* y que en promedio comparte 73% de sus 40 alelos con otros sitios, es decir que parece ser una submuestra de los alelos que se encuentran en otros sitios, especialmente los de Ensenada.

Todo esto, más los resultados que obtuvieron Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), hace suponer una divergencia antigua de CCA, como se esperaría por ser una especie distinta. En cambio el origen de TCT parece reciente, quizá debido a individuos que se dispersaron y ha permanecido aislados de las poblaciones que les dieron origen,

probablemente la de Ensenada, dando una señal particular a sus frecuencias alélicas, que es lo que permitió a los análisis genéticos determinarla como una población genéticamente homogénea.

Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) con base en la diferencias encontradas en los genes COI y 16S del ADN mitocondrial propusieron que dentro de *P. sierra*, existen dos linajes, uno que comprende a poblaciones del sur de California, E.U.A. y otro que comprende a las poblaciones de la península de Baja California. La divergencia entre ambos linajes presuntamente se remonta a 2 millones de años atrás, la mitad del tiempo que ellos mismos estimaron para la divergencia entre *P. sierra* y *P. atromedia*. En el presente estudio, los sitios SCA1 y SCA2, que son los únicos dos sitios analizados genéticamente que pertenecen al linaje mitocondrial de California, se definieron como un sitio genéticamente homogéneo en todos los análisis llevados a cabo; sin embargo, en los análisis por F_{ST} , de asignación por probabilidades bayesianas en el programa STRUCTURE y en el AMOVA, su nivel de diferenciación genética con respecto a los sitios de la península a primera vista no corresponde con lo esperado, pues la existencia de dos linajes distintos dentro de *P. sierra* debería manifestarse como una separación muy clara entre los dos sitios de SCA y el resto de sitios de esta especie (NOV, ENS1-4, TCT), lo cual no fue el caso. Sin embargo, las diferentes tasas de mutación de los loci microsatélites con respecto al ADN mitocondrial (Zink, 2010) podrían ser los responsables de esto si, como se sugirió para el caso del sitio TCT, su población es de origen reciente y quizá de un efecto fundador y especialmente si se han mantenido aislados provocando variaciones importantes en sus patrones de frecuencias alélicas. Esto es, la estructura actual, observada con los loci microsatélites podría estar opacando o enmascarando la huella o patrón observado por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) en el ADN mitocondrial y el nivel de diferenciación aparentemente “bajo” observado con los loci microsatélites entre los dos linajes de *P. sierra*, sería únicamente consecuencia de la alta tasa mutacional de estos marcadores, lo cual los hace menos aptos para detectar eventos de divergencia pasados profundos y relaciones de ancestría-descendencia en comparación con las secuencias de ADN mitocondrial (Zink, 2010). Otra causa posible de discordancia entre la información obtenida de marcadores nucleares y mitocondriales es la dispersión diferencial entre

machos y hembras. Crews y Hedin (2006) detectaron esto en arañas *Homalonychus theologus* de la península de Baja California, pero no existe información de historia natural de *P. sierra* que permita refutar o confirmar esta explicación. Más adelante, en la sección “Concordancias y discordancias entre patrones de cortejo y genéticos y eventos vicariantes” se vuelve a abordar este punto con mayor profundidad.

NOV fue el segundo sitio con mayor riqueza alélica y número observado de alelos después de Ensenada, pero fue más parecido a CCA, tanto en composición alélica (26 alelos en común, 72%, de los 36 alelos presentes en CCA) como en frecuencias alélicas (considerando únicamente los 36 alelos presentes en CCA), aunque no en valores de F_{ST} . También y, dentro de *P. sierra*, el que presentó el valor más alto de F_{ST} con respecto a TCT. Estas evidencias dan idea de por qué en el dendrograma NOV se ubica más cerca de CCA, SCA1 y SCA2 que cualquiera de los sitios de Ensenada, a pesar de encontrarse a una distancia geográfica mucho mayor. Un fenómeno que podría estar provocando esta aparente semejanza entre CCA y NOV y que aún no puede descartarse con los datos disponibles, es que algunos alelos presentes en CCA sean iguales a los de NOV por estado de carácter y no por descendencia, es decir que presenten homoplasia (ver un ejemplo en Queney *et al.*, 2001). Sin embargo hay otras evidencias que coinciden parcialmente con el patrón de relaciones observado en el dendrograma del presente estudio y que no podrían explicarse por homoplasia entre NOV y CCA. Correa-Ramírez (2010) encontró en su dendrograma que los sitios más septentrionales que él muestreó (en el estado de Baja California), Ensenada y El Rosarito, estuvieron más relacionados con los sitios más meridionales (ubicados en la región del Cabo), Sierra de la Laguna y El Novillo (que es el mismo que NOV en el presente estudio), que con otros sitios geográficamente intermedios y por lo tanto más próximos (en el centro de Baja California Sur), Cadejé, San Isidro y San Pedro de la Presa. Aunque los sitios en sí no coinciden (a excepción de NOV), sí lo hace el patrón general, en el que sitios más septentrionales de cada estudio, están en apariencia más relacionados con los más meridionales, que con los intermedios.

Además Correa-Ramírez (2010) estimó un alto número de migrantes entre el sitio de Ensenada y Sierra de la Laguna, que se encuentran en los extremos geográficos de las poblaciones que él analizó. Esta serie de evidencias indirectas lo llevó a hipotetizar que los

patrones genéticos encontrados podrían ser resultado de dispersión pasiva de las arañas, mediado por transporte humano, particularmente por la importante afluencia de turistas a esta zona. Aunque ciertamente muchos de los turistas que llegan a la región del cabo, vienen desde Estados Unidos mediante locomoción terrestre, lo cual facilitaría el transporte de las arañas y explicaría también el patrón encontrado en el presente estudio, esta explicación tiene varios inconvenientes. Primeramente, que las arañas en general, y *P. sierra* no es la excepción, no presentan el fenómeno de foresia (transporte pasivo de una especie por otra) porque, como reconoció Correa-Ramírez (2010) no tienen estructuras especializadas para este tipo de transporte. Además, obviando esto, si las arañas fueran transportadas por humanos, se esperaría encontrar efecto de esto también en sitios intermedios y esto debería observarse como aislamiento por distancia a nivel genético, pero ni en el estudio de Correa-Ramírez (2010) ni en el presente se encontró aislamiento por distancia. Por lo tanto, aunque no se puede descartar esta hipótesis hasta no haber demostrado su falsedad, se considera poco probable.

Otra explicación sería que la dispersión se da de forma natural. Thomas *et al.* (2003) estimaron que en arañas de la familia Linyphiidae, que se encuentran entre las de mayor capacidad de dispersión pasiva por arrastre aéreo (aeroestación o “ballooning” en inglés) mientras cuelgan de un fragmento de hilo de seda las distancias máximas de dispersión al día y con las condiciones meteorológica óptimas serían de alrededor de 90 km, mediante varios vuelos de aproximadamente 1 km cada uno. Semejante capacidad de dispersión permite a las arañas transportarse entre sitios tan distantes, sin embargo lo tienen que hacer durante varios días y en varios vuelos, es decir, haciendo numerosos aterrizajes intermedios, lo que hace que esta explicación no sea del todo satisfactoria, porque si la dispersión fuera de este tipo, sería obvio encontrar más semejanza entre sitios más cercanos y no entre los extremos, es decir un claro patrón de aislamiento por distancia, que no fue encontrado en el presente estudio. En todo caso, se requeriría que las arañas que se quedaran en sitios intermedios no sobrevivieran o no se reprodujeran, pero no hay una razón para semejante capacidad diferencial de supervivencia y reproducción.

Una tercera explicación, basada principalmente en las semejanzas entre NOV y CCA, es que NOV y Sierra de la Laguna podrían ser sitios que presentan el genoma más

conservado, el más parecido al del ancestro común y que han permanecido como poblaciones relativamente estables desde hace millones de años, mientras que poblaciones intermedias se han visto sujetas a fluctuaciones poblacionales drásticas e incluso extinciones seguidas de repoblamiento como consecuencia de cambios climáticos del pleistoceno y los recientes procesos de desertificación. Al igual que en el presente, en otros estudios en los desiertos del noroeste de México y suroeste de E.U.A. como los de Nason *et al.* (2002) y Lozano-Garza (2013) en plantas, el de Douglas *et al.* (2006) en reptiles y el de Graham *et al.* (2013) en alacranes, se han encontrado patrones de estructuración genética complejos, no acordes con patrones geográficos más generales, que han sido explicados como una combinación del efecto de eventos vicariantes del Mioceno y el Plioceno y de la existencia de refugios múltiples a partir de los cuales hubo recolonización posterior a los eventos climáticos del Pleistoceno.

Por último, los cuatro sitios de Ensenada analizados en el presente estudio resultaron muy similares entre sí en todos los análisis llevados a cabo, por lo que se considera que constituyen una población genéticamente homogénea. Esto coincide con lo que encontró Correa-Ramírez (2010), pues en su estudio, los sitios de Ensenada y El Rosarito se agruparon como una población genéticamente homogénea. Estos dos sitios se encuentran sobre la costa occidental de Baja California, lo mismo que los sitios ENS1-4 del presente estudio, pero en extremos opuestos de un área geográfica más extendida.

Probablemente debido a esta complejidad histórica en la evolución de *P. sierra* y sus especies cercanas es que a pesar de haber importante diferenciación genética, no se encontró un patrón de aislamiento por distancia en el presente estudio, incluso aún después de remover del juego de datos a algunas poblaciones altamente diferenciadas (Tabla X). Correa-Ramírez (2010) tampoco encontró aislamiento por distancia entre los sitios que estudió de *P. sierra*, atribuyéndolo a la alta capacidad de dispersión de la especie. En el presente estudio, tal explicación no es satisfactoria puesto que efectivamente se encontraron poblaciones bien diferenciadas, aún cuando estaban relativamente próximas geográficamente. El hecho de no haber encontrado correlación, debe responder más bien a que la estructuración actual no sólo está determinada por la capacidad de dispersión y la distancia geográfica, sino que está influenciada por eventos que limitaron y moldearon la

distribución y diversificación de los linajes, e incluso por factores ecológicos cuya importancia está pendiente de estudiarse, que a nivel general le dan mayor complejidad como se pudo observar también en el dendrograma.

En resumen, todos los análisis coincidieron en la diferenciación entre las dos especies, *P. sierra* y *P. atromedia*, y en la diferenciación entre los dos linajes mitocondriales de *P. sierra* propuestos por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), el de California y el de la península, así como en la existencia de una población genéticamente homogénea en NOV y otra en TCT la cual además está altamente diferenciada de todas las demás. Los sitios de Ensenada (ENS1-4) formaron otra población genéticamente homogénea. Sin embargo, conocer con mayor precisión si existen relaciones de ancestría-descendencia entre las poblaciones, requiere también hacer análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN preferentemente combinando genes nucleares y mitocondriales. La estructuración genética encontrada es compleja y no puede ser explicada con escenarios generales de aislamiento por distancia, panmixia o metapoblaciones, pero es claro que hay una marcada diferenciación entre varias poblaciones genéticamente homogéneas.

7.5 Concordancias y discordancias entre patrones de cortejo y genéticos y eventos vicariantes.

Concordancia entre genealogías de linajes mitocondriales y divergencias genéticas establecidas con microsatélites

En términos generales, se puede decir que la información hasta ahora generada con estos loci (microsatélites) nucleares, confirman lo encontrado previamente con genes mitocondriales, es decir, con distintos marcadores genéticos se cumplen los requerimientos para concordancias genéticas en el aspecto II, entre las genealogías de múltiples genes o loci dentro de una misma especie, o en este caso linajes intraespecíficos (Avisé 2004). Sin embargo, es importante señalar que no se contó con información de loci microsatélites para *P. sura*, lo cual requiere de más investigación para confirmar o refutar las concordancias genéticas en la diversificación de linajes y/o especies de arañas en el Noreste de México y sureste de Estados Unidos.

Entre la información genética que sí se pudo comparar, se observó solamente una discordancia entre la información genética del presente estudio, obtenida a partir de frecuencias alélicas de loci microsatélites, y la revisada en Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) proveniente de análisis filogenéticos de secuencias de ADN mitocondrial. Esta discordancia fue la población de TCT, que se definió claramente como una población genéticamente homogénea: con una considerable distancia genética con respecto a todas las demás poblaciones, distancia únicamente superada por la encontrada entre *P. atromedia* (CCA) y *P. sierra* (resto de los sitios). Esta discordancia es atribuible a diferentes causas.

La más probable es que, como se discutió anteriormente, la población TCT sea de origen reciente, de modo que el tiempo transcurrido desde la divergencia de esta población no ha sido suficiente para la aparición de mutaciones en el ADN mitocondrial o para que la deriva genética resulte en estados de monofilia recíproca entre las poblaciones, eliminando el efecto del polimorfismo ancestral, y permitiendo así distinguir entre linajes (Avisé, 2004). Por otra parte, los microsatélites, gracias a sus altas tasas mutacionales y a proveer

información multilocus, permiten estimar la magnitud del flujo genético entre poblaciones o su grado de aislamiento a partir de las frecuencias alélicas de cada población, en tiempos mucho más recientes (Selkoe y Toonen, 2006). Los enfoques basados en la asignación de individuos como el programa STRUCTURE, son especialmente útiles en esta tarea porque no requieren la selección de poblaciones *a priori*, lo cual minimiza el riesgo de conjuntar o dividir poblaciones artificial y arbitrariamente (Zink, 2010).

Una explicación alternativa sería que existe migración o dispersión diferencial entre machos y hembras. Debido a que el ADN mitocondrial se hereda matrilinealmente (Moritz *et al.* 1987), sólo a través de las hembras, si estas son relativamente sedentarias en comparación con los machos, se podrían encontrar tales discordancias. Esto sucede porque los marcadores nucleares, que están sujetos a recombinación y pueden ser transmitidos por machos y hembras, podrían mezclarse entre las diferentes localidades gracias al simple intercambio de machos entre ellas, pero el ADN mitocondrial, que sólo puede ser transmitido por las hembras, se mantendría segregado si no hay movimiento de hembras que pueda mezclar los haplotipos entre las diferentes poblaciones. Descartar esta hipótesis requiere de más conocimiento sobre los hábitos de dispersión de las especies de *Pardosa* abordadas en el presente trabajo, y quizá hasta estudios específicos que permitan evaluar la posibilidad de dispersión diferencial entre sexos. Hasta ahora el conocimiento que se tiene sobre estas especies no sugiere que exista dispersión diferencial, pues estas arañas se dispersan principalmente durante su fase juvenil.

Esto, más las evidencias genéticas discutidas anteriormente en la sección de “Número de poblaciones genéticamente homogéneas y estructura genética poblacional” hacen que la explicación de un aislamiento reciente de TCT y el efecto de las diferentes ventanas de resolución temporal de cada tipo de marcador, sean por ahora la explicación más plausible.

Precisamente debido a esta diferencia en la resolución temporal entre marcadores es interesante que las divergencias entre los linajes mitocondriales de *P. atromedia* y *P. sierra* y de California y península de Baja California al interior de *P. sierra* encontradas por Correa-Ramírez *et al.*, (en preparación), se mantengan a pesar de que estas especies tienen capacidad de dispersión suficiente para homogeneizar los acervos genéticos si no existen

barreras geográficas que lo impidan (Correa-Ramírez, 2010). La permanencia de esta separación entre linajes se corroboró al encontrar que la variación genética actual entre linajes y poblaciones, estimada a partir de las frecuencias alélicas de loci microsatélites, coincide con la inferida a partir de secuencias de ADN mitocondrial. Otros estudios, tanto de vertebrados (Tonione *et al.*, 2011) como de invertebrados (Papura *et al.*, 2012) han encontrado concordancia entre los dos tipos de marcadores. En arañas no existen estudios con microsatélites pero De Busschere *et al.* (2010) también encontraron concordancias entre árboles concatenados de genes mitocondriales y nucleares y la estructura poblacional inferida a partir de alozimas. En el caso de *P. sierra*, estas coincidencias indican que entre estas especies y linajes, existen barreras que impiden la reproducción entre ellas. Estas barreras podrían ser extrínsecas, si hay diferencias en preferencias por el tipo o forma de uso del hábitat que previenen el encuentro físico entre individuos de especies o linajes distintos, o podrían ser intrínsecas como diferencias de cortejo, incompatibilidades anatómicas o celulares, o inviabilidad, esterilidad y eficacia biológica (“fitness” en inglés) disminuida en los híbridos (Rogers y Bernatchez, 2006). Algunas de estas posibles barreras han empezado a someterse a escrutinio en el presente estudio y se discuten en otras secciones.

Concordancia entre genealogías de linajes mitocondriales y datos de cortejo a nivel de especies

Las coincidencias y diferencias en los elementos del cortejo o movimientos presentados por las tres especies de arañas indican que al menos en su cortejo, *P. atromedia* y *P. sura* están más estrechamente emparentadas entre sí, que cualquiera de ellas con *P. sierra*. Sin embargo, la hipótesis filogenética establecida por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) indica que la especie ancestral fue *P. sura*, y *P. sierra* y *P. atromedia* divergieron posteriormente una de otra. Si esta hipótesis es correcta entonces, los elementos del cortejo de *P. sierra*, es decir los “movimientos I, II, III y IV”, son una apomorfia y más particularmente una autapomorfia, al estar representados sólo en un grupo derivado, mientras que el elemento de cortejo o movimiento compartido entre *P. atromedia* y *P. sura*,

el “movimiento VII” (Tabla IV) es una simplesiomorfía heredada del ancestro común de las tres especies.

Una explicación alternativa es que la genealogía obtenida a partir de los genes mitocondriales por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) es idiosincrática (Avice, 2000) y no representa la historia evolutiva de estas tres especies. La historia de especiación que puede interpretarse a partir de los cortejos, concuerda con un posible escenario de diversificación provocada por eventos vicariantes. De hecho, originalmente, Correa-Ramírez (2010) planteó un escenario más similar al observado en base a los cortejos que al expuesto en Correa-Ramírez *et al.* (en preparación). En su primera propuesta, Correa-Ramírez (2010) explicaba que la formación del Golfo de California ocurrida hace 5 millones de años concordaba con la separación de las especies *P. sierra* y *P. vadosa*, la posible existencia de una transgresión norteña durante hace 4 a 4.5 millones de años podría explicar la especiación entre *P. atromedia* y *P. sierra*, y el incremento del Río Colorado hace 3.5 a 4.0 millones de años, explicaría el proceso de especiación entre *P. atromedia* y *P. sura*. Al igual que lo observado en el cortejo, *P. sierra* tendría el tiempo de divergencia más antiguo y la divergencia más reciente sería entre *P. atromedia* y *P. sura*.

Otra explicación potencial en la contradicción entre los datos conductuales y la hipótesis filogenética es que, lo que Correa-Ramírez *et al.* (2010) consideran como *P. sura*, no sea necesariamente un grupo monofilético, sino que pudiera ser un complejo de especies, probablemente cada una con un cortejo distinto. Obviamente, si hubiera especies nuevas dentro del grupo, su inclusión en los análisis filogenéticos podría cambiar la forma de los árboles filogenéticos, al mismo tiempo que esclarecer los patrones de semejanzas y diferencias entre los cortejos, de modo que ambas fuentes de información podrían resultar ahora sí concordantes.

Como se puede ver, la discordancia encontrada entre el orden cronológico del patrón de especiación inferido a partir de genealogías mitocondriales y los datos conductuales, da lugar a muchas posibles explicaciones, algunas ya fueron mencionadas. Sin embargo, ninguna puede tomarse como definitiva hasta el momento, y sólo completando y aumentando con información que incluya mínimamente genealogías mitocondriales, genealogías nucleares y mayor información de comportamiento de más

especies (aunque información morfológica y ecológica también sería importante y útil), para más sitios de muestreo, en especial de *P. atromedia* y *P. sura*, se podrá discernir, cual es la mejor explicación de la historia evolutiva de las especies de *Pardosa* del noroeste de México

Concordancia entre genealogías de linajes mitocondriales, datos de cortejo y eventos vicariantes a nivel de especies.

Las relaciones genealógicas de genes mitocondriales de *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* encontradas por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) y los datos de cortejos encontradas en el presente estudio, concuerdan parcialmente con eventos vicariantes que se han propuesto para explicar los patrones de diversificación para otras especies de animales y plantas con distribuciones circundantes al Golfo de Baja California. No existe una concordancia exacta debido a varias ambigüedades difíciles de salvar debido a que son intrínsecas a las limitaciones de los métodos y que se evidencian al revisar la literatura relativa a esta temática. Para empezar, los abanicos de tiempo son muy amplios, tanto en la datación de los eventos geológicos, como en la calibración de los marcadores moleculares con los que se estiman los tiempos de divergencia. Además es difícil distinguir entre la ocurrencia de eventos únicos o múltiples. Todo esto disminuye considerablemente la precisión con que se asigna a cada hipotético evento una ubicación geográfica y cronológica. Además la existencia de otros fenómenos biológicos y geológicos como la dispersión o cambios en la distribución de las especies y los cambios climáticos que ocurrieron en tiempos más recientes a los grandes eventos vicariantes, contribuyen aún más a confundir las señales dejadas por los eventos vicariantes sobre los patrones biológicos actuales, y obviamente a relajar la exactitud requerida a la hora de explicar un patrón observado como resultado de un evento vicariante, es decir que aumentan el riesgo de caer en error tipo I, del cual el presente estudio no está exento.

Tomando en cuenta estas limitaciones y licencias como lo han hecho otros investigadores, se pueden invocar una serie de eventos vicariantes para explicar la historia de especiación entre *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, tal como lo sugirieron Correa-Ramírez *et al.* (en preparación). Según ellos hubo tres eventos vicariantes importantes para

la especiación de estas tres especies. El primero, la formación del Golfo de California hace 5.5 millones de años, explicaría la divergencia entre el linaje que dio origen a *P. sura* y el que dio origen a *P. sierra* y *P. atromedia*. El segundo, la Transgresión Marina Norteña hace entre 4.1 y 4.5 millones de años, explicaría la divergencia entre el linaje que dio origen a *P. atromedia* y el que dio origen a *P. sierra*. Y el tercero, el incremento del Río Colorado hace entre 2.1 y 3.5 millones de años, explicaría la divergencia entre los dos linajes que observaron dentro de *P. sierra*, el de California y el de Baja California.

Existe otro escenario que, considerando los mismo eventos vicariantes, permite dar una explicación que además es más acorde con los datos de conducta. El linaje ancestral tendría una distribución norteña por lo que pertenecería al Complejo Vicariante Norteño (Grismer, 1994), rodeando la parte más norteña del Golfo de California en formación. Las poblaciones más sureñas habrían sido las primeras en divergir, de modo que el linaje que originó a *P. sierra* se habría separado del que originó a *P. atromedia* y *P. sura*, pero mantendrían conexión entre ellos por el extremo norte de la península. La Transgresión Norteña conocida como la “Formación Imperial” (equivale a la “Transgresión Marina Norteña” de Correa-Ramírez *et al.*, en preparación) en la que el Golfo de California se extendió hacia el Norte hasta el Paso de San Gorgonio, al mismo tiempo que se dio una inundación de la cuenca de Los Ángeles, que según Murphy y Aguirre León (2002) efectivamente llegó a conectar al Golfo de California con el Océano Pacífico. Este evento habría terminado de separar a las poblaciones norteñas de *P. sierra* de las del linaje que daría origen a *P. atromedia* y *P. sura*. Posteriormente, la Transgresión Norteña conocida como “Formación Bouse” (equivale al “incremento del Río Colorado” de Correa-Ramírez *et al.*, en preparación), la que consistió en inundaciones extensivas a través del Río Colorado llegando hasta lo que hoy es el estado de Nevada, separaría al linaje que dio origen a *P. atromedia* del que dio origen a *P. sura*, a ambos lados del Colorado. Al mismo tiempo podría haber separado también a las poblaciones de *P. sierra*, en el linaje de California y el de la península, pero dado que la diferenciación entre estos dos linajes aparentemente es norte-sur y no este-oeste, como el que es característico de este evento vicariante, la explicación no es del todo satisfactoria si no se complementa con dispersión posterior al evento vicariante. Un patrón filogeográfico parecido a éste fue encontrado por

Wood *et al.* (2008) para tres linajes mitocondriales de la boa rosada *Lichanura trivirgata* Cope, 1861. Aparentemente este es el único estudio publicado en el que se tratan por separado los efectos de las dos formaciones que constituyen la Transgresión Norteña, pues en todos los demás estudios filogeográficos publicados, se consideraba como un solo evento. Así explica que los patrones de divergencia de algunos estudios pueden corresponder con las primeras fases de la formación del Golfo de California y la subsecuente inundación del lago Salton, conocida como “Formación Imperial”, mientras que los patrones de divergencia este/oeste a través del río Colorado más bien reflejan la inundación más progresiva y extensiva del Golfo de California, conocida como “Formación Bouse” que finalmente dio lugar a la formación del Río Colorado.

Según Wood *et al.* (2008), la formación del Golfo de California, la “Formación Imperial” y la “Formación Bouse” habrían tenido lugar hace 5-12, 6-10 y 5.3-6 millones de años respectivamente. Estas fechas se encuentran sistemáticamente sesgadas con respecto a las propuestas por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) pero coinciden en el orden cronológico. Este escenario explicaría mejor la separación entre *P. atromedia* y *P. sura*, no sólo porque concuerda con las observaciones hechas sobre el cortejo de las dos especies en el presente estudio, sino también porque dada la distribución relativamente norteña de *P. atromedia*, su divergencia se explica mejor como consecuencia de la formación del Golfo y luego la Transgresión Norteña (pues considerando conjuntamente ambos eventos su alcance sería hasta Nevada), que únicamente con la formación del Golfo que no llegó tan al Norte. Otra observación que lleva a considerar que algunos clados no estén correctamente ubicados en la genealogía mitocondrial propuesta por Correa-Ramírez *et al.* (en preparación) es que *P. lapidicina* aparece como el clado más reciente que se originó del linaje monofilético que contiene a *P. sierra* y *P. atromedia*. Si la separación de este linaje respecto al que dio origen a *P. sura*, se dio a raíz de la formación del Golfo de California, entonces ¿cómo se puede explicar que *P. lapidicina* se agrupara con *P. sierra* y *P. atromedia*, cuando es la especie con la distribución más oriental de todas las del grupo y sus registros más occidentales llegan hasta Colorado, Wyoming y Montana (Barnes, 1959; Vogel, 2004).

Además de las ambigüedades temporales y geográficas, existen otros argumentos de peso por los que la explicación de los procesos de especiación en *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura* como resultado únicamente de eventos vicariantes no es completamente satisfactoria. Quizá el más importante es la ausencia de diferenciación genética profunda, tanto en el presente estudio como en el de Correa-Ramírez (2010) y Correa-Ramírez *et al.* (en preparación), provocada por el Canal Interpeninsular del Vizcaíno, el cual es el evento vicariante más frecuentemente observado en la mayoría de los taxa (Riddle *et al.*, 2000c), y cuyo efecto ya ha sido detectado por ejemplo en la araña *Homalonychus theologus* (Crews y Hedin, 2006). Argüir que las diferencias en este patrón entre *H. theologus* y *P. sierra* se debe a las menores capacidades de dispersión de la primera, no resuelve el problema, porque en ese caso se esperaría que se hubiera encontrado señal de la “Formación Imperial” en *H. theologus*, pero no fue así.

Las concordancias discutidas hasta este momento entre genealogías mitocondriales, datos conductuales y eventos vicariantes, no permiten aseverar que la especiación ha sido dirigida por vicarianza ni por selección sexual sobre los cortejos, pero tampoco permiten descartarlas. Para desentrañar un poco más el proceso de especiación es necesario revisar los patrones de diversificación en una diferente resolución, en un tiempo más cercano considerando las poblaciones y linajes que se encuentran dentro de *P. sierra*.

Concordancia entre genealogía de linajes mitocondriales, divergencias genéticas de microsatélites, datos de cortejo y eventos vicariantes dentro de *P. sierra*.

A este nivel intraespecífico, dado que los tiempos de divergencia son mucho más recientes, los eventos vicariantes no aportan mucha información más allá de lo ya mencionado en la sección anterior en cuanto al posible papel de la “Formación Bouse” en la separación de los linajes de *P. sierra*. Como también ya se mencionó en la sección de “Estructura Genética Poblacional” no se puede descartar el papel de la existencia de refugios y los efectos de los cambios climáticos ocurridos durante y después del Pleistoceno en la historia reciente de las poblaciones de *P. sierra*, pero tampoco se cuenta de momento con elementos concretos con los cuales indagar más respecto a estas explicaciones por lo que no se profundiza en esto.

En cambio, sí se estudió de cerca la posibilidad de que la selección sexual sobre el cortejo sea la que ha dirigido el proceso de diversificación dentro de *P. sierra*, lo cual sería posteriormente extrapolable a la aparición de especies como consecuencia de que los cortejos hayan mantenido separados los acervos genéticos de las poblaciones en divergencia. Sin embargo se encontró que al comparar los datos conductuales y moleculares de diferentes marcadores y probablemente de diferentes escalas temporales (mitocondriales, profundos y microsátélites recientes), las discordancias fueron prácticamente absolutas. Lo más esperable era que de haber variación intra específica en el cortejo de *P. sierra*, las diferencias se encontraran entre los sitios pertenecientes a los dos linajes mitocondriales. Otra opción, no tan probable pero también posible, era que una población bien diferenciada y aparentemente aislada como TCT presentara un cortejo distintivo. Una tercera opción era que se encontraran diferencias en los cortejos pero no diferencias genéticas, lo cual sería prueba parcial de una divergencia muy incipiente. Ninguna de las tres situaciones se observó en el presente estudio.

Si se hubieran observado, no hubieran sido suficientes para probar que la selección sexual dirige la especiación, pues como mencionan Panhuis *et al.* (2001) es difícil que una sola prueba permita discernir entre la especiación por selección sexual y otros modos de especiación, y en todo caso se requiere reunir la mayor cantidad de evidencias posible al mismo tiempo para descartar otras probables explicaciones. Los mismos autores recomiendan entre otros requisitos, comprobar que los rasgos sexuales están bajo selección de las hembras habiendo preferencias correlacionadas, que existe aislamiento precigótico entre las especies y que no hay desplazamiento de caracteres ni reducción de viabilidad o fertilidad en híbridos si es que hay hibridación. Ninguno de estos requisitos se pudieron poner a prueba en el presente estudio, aunque hubieran sido necesarios para demostrar que la selección sexual ha dirigido la especiación entre *P. sierra*, *P. atromedia* o *P. sura*. Sin embargo, para probar lo opuesto, es decir, que la selección sexual sobre el cortejo no ha dirigido por sí sola la especiación, basta con demostrar que las discontinuidades genéticas no coincidan con los distintos cortejos. Bajo la hipótesis de que los cortejos son diferentes, los machos son seleccionados y ocurre el cruzamiento no aleatorio entre los miembros de la población; pero si se encuentran diferencias genéticas que no coinciden con diferencias en

cortejo, el cruzamiento no aleatorio que dio origen a la divergencia tuvo que haber sido provocado por otro factor que no fuera el cortejo y la selección sobre éste. Por lo tanto, la no concordancia observada entre los patrones de cortejo y los patrones de diversificación genética dentro de *P. sierra* se puede tomar como evidencia suficiente de que la selección sexual sobre el cortejo no ha dirigido la diversificación de linajes, al menos dentro de *P. sierra*, y probablemente tampoco entre las tres especies, *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*.

La discordancia que se observó entre los datos genéticos y de conducta dentro de *P. sierra* fue, de hecho, bastante pronunciada. La diferencia entre patrones de cortejo, en lugar de coincidir con la separación de linajes mitocondriales (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación) se observó entre poblaciones que corresponden a un mismo linaje, el de península de Baja California, e inclusive se observó entre sitios de muestreo que corresponden a una misma población genéticamente homogénea, la de Ensenada. Además la población de TCT, tan diferenciada genéticamente, no mostró un cortejo distintivo como tampoco lo hicieron ninguno de los dos linajes mitocondriales. Las anteriores evidencias asumen que los resultados obtenidos de los análisis genéticos y conductuales son correctos; que *P. sierra*, *P. atromedia* y *P. sura*, son tres especies distintas; que existen dos linajes dentro de *P. sierra* así como una marcada estructura poblacional; y no hay alguna variación en los cortejos que haya pasado desapercibida y está sujeta a selección sexual.

Sin embargo, es importante mencionar que si bien no cabe duda de la diferenciación en el cortejo de los individuos recolectados en La Paz (LPZ), que fue el sitio con más cantidad de réplicas observadas; los datos de cortejo de los individuos recolectados en ENS1 y ENS5 se deben tomar con cautela porque se contó con pocas observaciones de cortejo. Si al aumentar el número de réplicas de estos dos sitios, resultara que su patrón de cortejo es más similar al del resto de los sitios del norte de la península, se tendría un panorama muy distinto de la variación intraespecífica, en el que la distancia geográfica estaría teniendo un papel importante en la diferenciación del cortejo, y habría al menos cierto grado de concordancia con el patrón genético inferido a partir de los loci microsátélites, lo cual podría alterar las conclusiones ahora obtenidas.

Implicaciones del patrón general de concordancias y discordancias

Según Panhuis *et al.* (2001) muchas especies son similares morfológica y genéticamente mientras que difieren notoriamente en señales y preferencias relacionadas con la búsqueda de parejas, pero para inferir que esto significa que la selección sexual dirige la especiación se requiere que otros modos o tipos de divergencia sean descartados. A pesar de la gran cantidad de estudios en arañas lobo en los que se han encontrado diferencias en los cortejos pero no en la morfología (p. ej. Stratton y Uetz, 1986; Vlček, 1995; Costa *et al.*, 2000; Töpfer-Hofmann *et al.*, 2000), en ninguno de ellos se ha intentado poner a prueba la selección sexual como modo de especiación y a lo máximo que se ha llegado, es a sugerirlo como una posibilidad (Stratton y Uetz, 1986).

En el presente estudio se abordó de forma más directa la tarea de probar si la selección sobre el cortejo podría ser lo que ha dirigido la especiación en un lícósido. Las discordancias observadas con la información disponible hasta el momento, llevan a apoyar la hipótesis de que la selección sobre el comportamiento de cortejo no dirige la especiación o divergencia de linajes, porque si así fuera, se esperaría que los patrones de cortejo observados dentro de *P. sierra* hubieran coincidido con las delimitaciones de linajes intraespecíficos o con las poblaciones genéticamente homogéneas más diferenciadas, es decir poblaciones o linajes que se encontrarían en fases iniciales o intermedias de especiación, o por lo menos que no hubiera nada de estructura poblacional. En lugar de cualquiera de estos escenarios, se observó que existe estructura poblacional y también diferenciación en los cortejos, pero ambas con patrones discordantes.

Algo similar a lo encontrado en el presente estudio, se observó en una serie de estudios con peces del grupo Goodeinae (Ritchie *et al.* 2005; Ritchie *et al.* 2007; Macías-García *et al.* 2012). Primero encontraron altos niveles de dimorfismo en caracteres morfológicos y de cortejo, que además estaban sujetos a selección, y una correlación entre el nivel de divergencia con la diversidad genética entre las poblaciones, por lo que pensaron que probablemente esto indicaría altos niveles de diversificación guiados por selección sexual. Sin embargo, al estudiar exclusivamente las poblaciones de la especie con el dimorfismo más marcado, *Girardinichthys multiradiatus* Meek (1904), encontraron que aunque había selección diferencial, la estructuración genética de las poblaciones, estudiada

con loci microsatélites, estaba determinada por la distancia geográfica entre ellas, independientemente de cuáles fueran las morfologías y cortejos preferencialmente seleccionados por las hembras. Al igual que en el presente estudio, esto los llevó a deducir que los procesos de diversificación en estas especies no estaban siendo dirigidos por selección sexual.

Estas evidencias de que la selección sobre los cortejos no dirige la divergencia de linajes o la especiación en realidad no sorprenden mucho. Aunque se han sugerido algunos modelos teóricos atractivos de especiación por selección sexual (revisados brevemente en Ritchie, 2007), las pruebas empíricas irrefutables son prácticamente nulas. Existe un estudio en arañas, pero no en la familia Lycosidae, sino Salticidae, con *Habronattus pugillus*. En él, Masta y Maddison (2002) encontraron evidencias de selección sexual sobre diferentes morfotipos y cortejos dentro de la misma especie que ha resultado en aislamiento reproductivo entre algunas poblaciones, pero no lograron demostrar que esto esté provocando divergencia de linajes o poblaciones a nivel genético. Además, los autores sugieren que la diferenciación en estos rasgos bajo selección comenzó a aparecer en alopatría, implicando que pudo haber sido el aislamiento físico de las poblaciones, y no la selección sexual, lo que desencadenara la divergencia de caracteres. Es decir, no se puede decir que la selección sexual, por sí misma haya provocado la diferenciación inicial.

Quizá una serie de estudios de la rana neotropical *Physalaemus petersi* Jiménez de la Espada, 1872 (Boul *et al.*, 2007; Guerra y Ron, 2008; Funk *et al.*, 2009), proveen la evidencia más rigurosa de un caso de especiación por selección sexual, en particular, sobre el canto de los machos. Encontraron preferencias de las hembras por los cantos de machos de sus mismas poblaciones y concordancia entre los cantos y los patrones genéticos pero no correlación entre las distancias genéticas con factores ambientales ni con distancias geográficas. Sin embargo, sobre todo en el aspecto ecológico, hacen falta más pruebas que permitan descartar adaptación a microambientes. La misma dificultad para diferenciar entre selección natural y sexual y su efecto en la especiación se ha tenido en otros modelos, principalmente de peces como cíclidos, poecílidos y goodeidos (como se mencionó unos párrafos antes), sin que se haya llegado a una resolución convincente aún (Ritchie, 2007).

Después de todo, las evidencias son muy escasas y por el otro lado hay numerosos autores que como resultado de modelos teóricos o estudios empíricos, proponen que la especiación es un proceso muy complejo que difícilmente puede resultar de un solo factor, como la selección sexual, y que más bien es el resultado de la interacción de muchos factores actuando acopladamente (Arnegard y Kondrashov, 2004; Ritchie, 2007; Grether, 2010).

De acuerdo a la información obtenida hasta el momento, ni los eventos vicariantes, ni la selección sexual sobre el cortejo, por sí solos, ofrecen una explicación satisfactoria de la especiación y divergencia de linajes en *P. atromedia*, *P. sura*, *P. sierra* o en los linajes dentro de ésta última. Por lo tanto se propone que más bien ha sido una combinación de factores, la responsable de moldear los patrones filogeográficos actuales. En este escenario, la selección sexual sobre los cortejos, ha tenido importancia relativamente menor en comparación con la interrupción o disminución de flujo genético por dispersión a larga distancia, o por barreras geográficas que han provocado alopatría y divergencia por adaptación a nuevos ambientes o por deriva génica; o en comparación con divergencia por adaptación a distintos ambientes en simpatría o parapatría (Via, 2001; Michel *et al.* 2010). Estas interrupciones o disminuciones iniciales en el flujo genético, podrían haber ocasionado la acumulación de mutaciones que provocaran distintos grados de incompatibilidad entre las poblaciones separadas, dependiendo del grado de aislamiento (Muller, 1942; Johnson, 2008; Matute *et al.*, 2010). De este modo, en los casos en que hubo alopatría se pudieron formar zonas híbridas de contacto secundario y en los casos en que la divergencia se dio como consecuencia de adaptación a distintos ambientes se pudieron formar zonas híbridas primarias (Kawakami y Butlin, 2001) y dependiendo de los grados de divergencia entre los acervos genéticos y la fuerza de la selección natural, pudo haber reforzamiento, dilución o compartimentalización del aislamiento (Abbott *et al.*, 2013; Feder *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, las diferenciaciones genéticas pudieron haber provocado diferenciación en los cortejos, principalmente como subproducto de la adaptación a distintos tipos de hábitat (Miller *et al.* 1998; Uetz y Roberts, 2002). Luego estas diferencias, pudieron haberse acentuado por selección sexual si ayudaron a sus poseedores (y las hembras que los seleccionaron) a aumentar su éxito reproductivo

(Delaney *et al.*, 2007) o si reforzaban barreras de aislamiento reproductivo parcialmente desarrolladas (Panhuis *et al.*, 2001). Como propone Via (2001) explicar la especiación en términos puramente geográficos se está volviendo obsoleto. Aprovechar las herramientas metodológicas disponibles en la actualidad permite y obliga a desentrañar con mucho mayor detalle un proceso complejo en el que siempre interactúan factores genéticos, etológicos y ecológicos además de los geográficos.

7.6 Evidencias de hibridación

En el presente estudio era de interés estudiar las posibilidades de hibridación por dos razones. Una para inferir si las diferencias de cortejo constituyen barreras de aislamiento entre los acervos genéticos de *P. sierra* y *P. atromedia* y entre los linajes Californiano y Peninsular dentro de *P. sierra*, es decir, si mantienen la homogeneidad de especies y linajes. En segundo lugar, porque encontrar una zona híbrida y estudiarla podría aportar mucha información sobre la especiación en estas arañas.

7.6.1 Hibridación interespecífica

7.6.1.1 Evidencias conductuales

No se logró reunir información suficiente como para aseverar que exista una zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia*, aunque como se discutirá más adelante, los resultados de los análisis sugieren que es probable su existencia. Encontrarla fue uno de los objetivos principales de la investigación y en consecuencia el criterio seguido para diseñar el muestreo, para lo que se tomó en cuenta la información publicada por Correa-Ramírez *et al.* (2010b) que mencionaba que la distribución de *P. sierra* está limitada a la península de Baja California y la de *P. atromedia* al Centro y Sur de California, E.U.A. Sin embargo, en la amplia inspección de terreno, que abarcó un área aproximada de 16000 km² en el sur de

California, no se encontró *P. atromedia* sino *P. sierra*, incluso en aquellos sitios donde a mediados del siglo XX se habían registrado y recolectado morfotipos que correspondían a *P. atromedia* (Correa Ramírez *et al.*, 2010b).

Una explicación a esto es que efectivamente exista superposición en las áreas de distribución de ambas especies, pero debido a variaciones estacionales en la densidad de individuos (Van Dyke y Lowrie, 1975; Punzo y Farmer, 2006) no se encontró a *P. atromedia* durante las recolectas hechas en el presente estudio. Otra explicación es que *P. sierra* haya expandido su área de distribución hacia el norte durante los últimos 50 años, promovida por el cambio climático global como se ha sugerido en mariposas y otros grupos de fauna y flora (Parmesan *et al.*, 1999; Gian-Reto *et al.*, 2002). Por último, también pudiera ser que haya habido errores en la identificación de los individuos o la ubicación de sitios de muestreo del material de colección revisado por Correa-Ramírez *et al.* (2010b), por lo cual sería conveniente realizar una revisión más exhaustiva de materiales de colecciones y nuevos muestreos, sobre todo en los límites de la distribución de ambas especies.

Esta dificultad para encontrar poblaciones de *P. atromedia* durante los primeros muestreos también provocó que no se contara con individuos de esta especie para utilizarlos en experimentos de cortejo y apareamiento en laboratorio para estudiar la interacción entre especies y caracterizar el tipo de barreras de aislamiento que podrían existir entre ellas como lo han hecho por ejemplo Stratton y Uetz (1986), Costa *et al.* (2000) y Fernández-Montraveta *et al.* (2001).

Mediante la observación de los cortejos se pudo diferenciar claramente entre *P. sierra* y *P. atromedia*, pero no se encontró ningún individuo que presentara un cortejo intermedio entre las dos especies parentales o compuesto por elementos de cortejo o movimientos de ambas, y que por lo tanto pudiera considerarse como híbrido, tal como lo hicieron a nivel de laboratorio Stratton y Uetz (1986) y Costa *et al.* (2000).

7.6.1.2 Evidencias genéticas

A partir de los análisis genéticos de frecuencias alélicas, se obtuvieron evidencias indirectas de hibridación, el entrecruzamiento entre individuos de distintos tipos genéticos o especies, en este caso, entre *P. sierra* y *P. atromedia*. No obstante, esta información no es suficiente para considerar la existencia de una zona híbrida (al menos no en su totalidad), pues la cantidad de individuos de ancestría mezclada en el presente estudio es muy pequeña como para revelar el patrón de clina en varios rasgos genéticos característico de las zonas híbridas (Harrison, 1993). Aún si no se encontró una zona híbrida, se confía que es correcta la forma en que se identificó la existencia de híbridos. Los análisis de asignación a partir de genotipos multilocus utilizando probabilidades bayesianas han probado ser robustos en su capacidad de identificar la presencia de hibridación (Pritchard *et al.*, 2000; Mallet, 2005; Sanz *et al.*, 2009) tanto en zonas híbridas como en híbridos ocasionales en diversos grupos biológicos, por ejemplo mamíferos (Lancaster *et al.*, 2006; Randi, 2007; Senn y Pemberton, 2009; Cabria *et al.* 2011), aves (Barilani *et al.*, 2007; Muñoz-Fuentes *et al.*, 2007), reptiles (Miraldo *et al.*, 2013), anfibios (Colliard *et al.*, 2010), peces (Pritchard *et al.*, 2007; Nolte *et al.* 2009), lepidópteros (Gompert *et al.*, 2010), dípteros (Kothera *et al.* 2009), encinos (Valbuena-Carabaña, 2007; Lepais *et al.* 2009), álamos (Thompson *et al.*, 2010), etc.

Además, según Vähä y Primmer (2006), quienes hicieron simulaciones para evaluar la eficiencia y precisión de los métodos bayesianos para la detección de híbridos, existen dos condiciones que al presentarse tienden a provocar una subestimación en la identificación de los mismos. Estas son la existencia de un continuo de clases distintas de híbridos (F1, F2, retrocruzas) y la escasez general de éstos dentro de la población muestreada. Ambas condiciones probablemente se cumplen en el presente estudio por lo que se puede considerar que la determinación de híbridos hecha aquí es conservadora y se corre bajo riesgo de estar clasificando como híbridos a individuos que no tienen ancestría mezclada. Vähä y Primmer (2006) también indican que valores de q (fracción del genoma de un individuo heredado de cada grupo genético parental) superiores a 0.1 son deseables cuando, como en el presente estudio, es importante privilegiar la precisión (es decir, la no sobreestimación por una incorrecta clasificación de individuos como híbridos cuando realmente no lo son) por sobre la eficiencia (es decir, la identificación de todos los híbridos

realmente presentes en la muestra). En el presente estudio se utilizó un valor umbral de q de 0.12 del genoma de *P. atromedia* en el de *P. sierra*, que es de por sí conservador. Si aún se elevara este valor hasta 0.23, sólo uno de los siete individuos clasificados como híbridos perdería este estatus. Por lo tanto, se considera que los resultados genéticos obtenidos son robustos y comprueban la existencia de hibridación entre *P. atromedia* y *P. sierra*.

Los antecedentes de estudios de hibridación de licósidos indican que se dan ambas situaciones, la ocurrencia y la ausencia de hibridación. Al menos en dos estudios (Stratton y Uetz, 1986; Costa *et al.*, 2000), se ha documentado que a pesar de que los híbridos producidos en el laboratorio son viables y fértiles, las diferencias en los cortejos de las especies parentales impiden los apareamientos interespecíficos y por lo tanto, la ocurrencia de híbridos en condiciones naturales es sumamente escasa (Stratton y Uetz, 1986). Sin embargo, otros estudios encontraron resultados opuestos, por ejemplo que a pesar de las diferencias de cortejo, las hembras de una especie accedían a copular con machos de la otra especie en experimentos de laboratorio (Fernández-Montraveta *et al.*, 2001). En condiciones naturales, se ha detectado hibridación introgresiva en especies de otras familias de arañas, por ejemplo del género *Dolomedes* Latreille, 1804 (Lattimore *et al.*, 2011), del género *Habronattus* (Hedin y Lowder, 2009) y del género *Tegenaria* Latreille, 1804, donde además se estudió una zona híbrida (Croucher *et al.* 2004; Croucher *et al.*, 2007). En todos estos casos, las evidencias de hibridación consistieron en encontrar haplotipos mitocondriales de una especie en algunos individuos que por morfología, distribución, afinidades ecológicas o ADN nuclear correspondían indudablemente a otra especie. El único caso documentado de una zona híbrida en arañas lobo es la estudiada por Reiskind y Cushing (1996) que encontraron una clina en la morfología de los émbolos de los pedipalpos de los machos de las arañas lobo *Lycosa ammophila* y *L. ericeticola*, pero no corroboraron sus hallazgos con información genética.

Las evidencias de hibridación encontradas a nivel genético y el hecho de que no se logró muestrear las áreas de distribución extremas y posiblemente confluentes entre *P. sierra* y *P. atromedia*, así como la existencia de casos probados de hibridación y zonas híbridas en otras especies de arañas encontrados en la literatura, justifican que se siga buscando una zona híbrida entre las dos especies en el centro-sur del estado de California,

E.U.A. Encontrarla podría aportar gran cantidad de información sobre el proceso de su especiación. Cada zona híbrida, como las especies y los procesos de especiación, es única. Por eso es que se les ha considerado como “laboratorios vivientes” donde estudiar procesos como la especiación y la adaptación (Hewitt, 1988). Al estudiar una zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia*, se podría conocer la importancia relativa de la selección sexual, el reforzamiento, la adaptación a condiciones ecológicas, la viabilidad y fertilidad de los híbridos, la dirección de la hibridación y los eventos vicariantes en la aparición, mantenimiento y devenir del aislamiento entre las especies; también se podría diagnosticar qué elementos morfológicos y etológicos contribuyen al aislamiento reproductivo y a la adaptación ecológica; si el inicio de la divergencia se desencadenó como resultado de barreras vicariantes, dispersión, distribución parapátrica o cambios en las preferencias de microhábitat; e incluso predecir el destino que podría tener la zona híbrida como su mantenimiento por un largo período de tiempo como una zona de tensión donde los híbridos tienen una eficacia biológica sumamente limitada, su mantenimiento con flujo de ciertas regiones genómicas entre las especies parentales, las cuales les confieren mayor eficacia y esto provoca una mayor separación entre las especies; o bien entender la gradual desintegración de la zona por flujo genético entre las especies parentales, con la consecuente fusión de ambas o asimilación de una por la otra, o la divergencia del linaje híbrido como entidad aislada hasta formar una nueva especie; la segregación de las especies por reforzamiento cuando existe menor eficacia de los híbridos e indicios de selección sexual que puedan ser reforzados, por mencionar algunos (Kawakami y Butlin, 2001; Mallet, 2005; Schwenk *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2013; Feder *et al.*, 2013).

7.6.2 Hibridación intraespecífica

7.6.2.1 Evidencias conductuales

En el nivel intraespecífico, se encontró evidencia de hibridación más extendida entre los linajes mitocondriales Californiano y Peninsular dentro de *P. sierra*. Los experimentos de apareamiento demostraron que hubo la misma cantidad de apareamientos entre cruza intralínea que entre cruza interlínea entre sitios de muestreo relativamente cercanos

geográficamente (un apareamiento de cada una), mientras que no hubo apareamientos en cruza interlinajes entre sitios geográficamente extremos. De los dos apareamientos, solo el interlinaje resultó en la construcción de ovisaco por parte de la hembra, pero esta no se pudo mantener viva el tiempo suficiente para comprobar que efectivamente tuviera arañuelas. En principio, esto al menos indicaría que no existe aislamiento reproductivo precopulatorio entre los machos del linaje mitocondrial de California y las hembras del linaje de la península, pero aún esta conclusión debe tomarse con precaución, como un resultado preliminar que debería comprobarse con más experimentos que permitan caracterizar con mayor certidumbre el grado de aislamiento entre los dos linajes, por dos razones que se discuten a continuación.

La primera es que los dos experimentos en que hubo apareamientos entre linajes no fueron completamente independientes porque en ambos se utilizó al mismo macho. Por lo tanto no se puede discernir entre el efecto del linaje y el efecto del macho. Varios estudios con arañas lobo han demostrado que la intensidad del cortejo, la talla y la condición de los machos, son variables que se encuentran bajo selección diferencial por parte de las hembras, por lo tanto podría haber sesgo al interpretar los resultados a partir de lo observado para un solo macho (Ver discusión y citas más adelante).

La segunda, y más importante, es la baja cantidad de réplicas realizadas, pero sobre todo, la baja cantidad de apareamientos obtenidos. De 29 experimentos, se obtuvieron tan sólo dos cópulas, lo que es igual a 7% (13% si se consideran solo los apareamientos intralinaje). Este fue un resultado inesperado, pues en otros estudios similares con arañas lobo se han obtenido porcentajes de apareamiento mínimos de 25% y hasta por encima de 70%, con rangos de entre 20 y 106 réplicas (Eason, 1969; Costa y Capocasale, 1984; Stratton y Uetz, 1986; Miller *et al.*, 1998; Brautigam y Persons, 2003; Punzo y Farmer, 2006; Shamble *et al.*, 2009) e incluso en el presente estudio, en los cinco experimentos con *P. atromedia* solas, se obtuvo un 40% de montas del macho sobre la hembra (aunque se utilizó una sola hembra, es decir que también fueron pseudoréplicas).

Esta baja cantidad de apareamientos obtenidos en el presente estudio probablemente se explica por el período de inanición al que se vieron expuestos los ejemplares de *P. sierra* durante las recolectas, así como una calidad de dieta no óptima durante su mantenimiento

en cautiverio, lo cual las pudo haber estresado afectando la calidad de los cortejos de los machos y la receptividad de las hembras.

La variable que más afecta la probabilidad de apareamientos en arañas lobo es la intensidad del cortejo por parte del macho (Rypstra *et al.*, 2003; Delaney *et al.*, 2007; Hoefler *et al.* 2009; Shamble *et al.*, 2009, pero ver Lomborg y Toft, 2009 y una excepción en Wilder y Rypstra, 2008a). Considerando que el cortejo es metabólicamente costoso para los machos (Kotiaho *et al.*, 1998), una dieta deficiente debe impactar negativamente el cortejo, y esto a su vez disminuir la probabilidad de aceptación por parte de las hembras. De hecho numerosos estudios con diferentes especies de arañas lobo han demostrado influencia de la calidad de la dieta sobre la supervivencia de adultos y juveniles (Uetz *et al.*, 1992; Moya-Laraño *et al.*, 2003; Hoefler *et al.*, 2008; Lomborg y Toft, 2009), tiempo de maduración sexual (Uetz *et al.*, 1992; Lomborg y Toft, 2009), parámetros corporales como peso (Uetz *et al.*, 1992; Shamble *et al.*, 2009) o ancho del prosoma (Lomborg y Toft, 2009), intensidad del cortejo (Hoefler *et al.*, 2008, Lomborg y Toft, 2009) o la probabilidad de apareamientos (Wilgers y Hebets, 2012; Lomborg y Toft, 2009); aunque también existe un estudio en el que no se detectó influencia de la dieta en ninguna de las variables anteriores (Wilder y Rypstra, 2008a) y dos estudios en los que se encontró capacidad de compensación posterior a períodos de estrés alimenticio medida como recuperación de masa, tanto en campo como en laboratorio (Moya-Laraño *et al.*, 2003; Jespersen y Toft, 2003) pero no se midió si tuvo algún efecto sobre la capacidad reproductiva.

Además existe conocimiento de que otros factores como la longevidad de las hembras y las experiencias previas de exposición a individuos del sexo opuesto o apareamientos (Norton y Uetz, 2005; Wilder y Rypstra, 2008b; Wilgers y Hebets, 2012), afectan la probabilidad de aparearse o la intensidad del cortejo (Rypstra *et al.*, 2003), a veces presentando efectos sinérgicos con otros factores.

Dada la complejidad de factores que interactúan afectando el cortejo y el apareamiento, tener mayor conocimiento sobre la importancia relativa de estos sobre la frecuencia de apareamientos, requerirá estudios diseñados específicamente para tal fin, que permitan optimizar las condiciones de mantenimiento y realización de experimentos de cruza.

7.6.2.2 Evidencias genéticas

Además de las evidencias obtenidas en los experimentos de apareamiento, se encontraron también evidencias genéticas de hibridación entre los dos linajes mitocondriales de *P. sierra* (Correa-Ramírez *et al.*, en preparación) el de California, E.U.A. y el de la península de Baja California. En este caso la cantidad de individuos con ancestría mezclada fue mucho mayor que entre *P. sierra* y *P. atromedia*, presentándose en todos los sitios muestreados y en un amplio rango de proporciones de mezcla de las fracciones de genoma de cada linaje parental. Además, si se hace caso omiso de TCT, que como ya se dijo es una población muy homogénea y aislada, es evidente que existe un patrón geográfico clinal en la probabilidad de asignación de los individuos al grupo definido por SCA (que corresponde al linaje mitocondrial de California) según los resultados del programa STRUCTURE. Si como lo resume Harrison (1993) una zona híbrida ocurre cuando grupos genéticamente distintos se encuentran y aparean resultando en al menos alguna proporción de la descendencia con ancestría mezclada, entonces se puede considerar que el patrón genético poblacional encontrado en las frecuencias alélicas de los linajes Californiano y Peninsular en el presente estudio, es una zona híbrida.

Al estudiar una zona híbrida entre *Lycaeides idas* (Linnaeus, 1761) y *L. melissa* Edwards, 1873, Gompert *et al.* (2010) encontraron un patrón de mezcla de genomas muy similar al encontrado en el presente estudio, con una clina de gran extensión. De hecho las gráficas de barras que representan sendos resultados de los análisis de asignación del programa STRUCTURE, tienen una apariencia similar en ambos y además la forma de la clina de composición genética a través de una extensión geográfica también es parecida entre ambos estudios en el sentido de que dentro de cada sitio del núcleo de la zona híbrida hay alta heterogeneidad de composiciones genómicas de los individuos, desde los muy parecidos a una especie o linaje hasta los muy parecidos a la otra especie o linaje. Mientras que, las diferencias aparentemente tienen más relación con la cantidad de sitios muestreados por Gompert *et al.* (2010), 38 sitios en global, de los cuales 11 y 4 representan a las especies parentales, en comparación a la realizada en este estudio, donde existe un amplia ausencia de datos entre el sitio NOV y el resto de los sitios de recolecta.

Gompert *et al.* (2010) explicaron que el patrón que encontraron era consecuencia de una distribución fragmentada o de parches característica de estas especies y su relativamente alta capacidad de dispersión, a una dinámica poblacional de constantes extinciones y recolonizaciones de los parches, a la existencia de aislamiento muy incompleto entre las especies parentales y a la insignificante selección contra los híbridos. Muchos de estos atributos probablemente también se presentan en *P. sierra*. Como ya se mencionó anteriormente las capacidades de dispersión altas y su asociación a cuerpos de agua en un entorno en general seco o mediterráneo también resulta en una distribución en parches, muchos de ellos sujetos a extinciones y recolonizaciones. Por otro lado, los experimentos de cortejo y apareamiento sugieren que no hay aislamiento entre los linajes o es muy ligero. Aunque no se cuenta con información sobre la viabilidad de los híbridos, y a grandes rasgos se sabe que la preferencia de hábitat y condiciones ecológicas es similar entre los linajes y poblaciones (Van Dyke y Lowrie, 1975; Punzo y Farmer, 2006; Correa-Ramírez, 2010). Desde el punto de vista de la dinámica de la hibridación, esos datos y la presencia de individuos con diferentes proporciones de mezcla, hace suponer que los híbridos no estarían sujetos a una fuerte selección en contra y se reproducirían con la misma frecuencia que las especies parentales.

Gompert *et al.* (2010) también encontraron que la clina geográfica de las variaciones de tamaño de la genitalia de los machos era más angosta que la clina de composición genómica, lo cual indicaría que estos caracteres contribuyen al aislamiento reproductivo, aunque incompleto, encontrado entre ambas especies, entre otras posibles explicaciones. En el presente estudio, las variaciones de cortejo encontradas dentro de *P. sierra* no coincidían con las delimitaciones de los linajes, por lo que no se puede considerar que la selección sobre el cortejo sea la que provoca el aislamiento reproductivo que, aunque no es completo, permite la permanencia de los dos linajes como acervos genéticos independientes como lo demostraron los diferentes análisis genéticos en el presente estudio.

Con todo esto se infiere que las coincidencias en las conformaciones de estas dos zonas híbridas pudieran resultar de especies con historias de vida con ciertos aspectos también coincidentes como alta capacidad de dispersión, distribución fragmentada con eventos de extinción y recolonización constantes y barreras de aislamiento reproductivo

permeables. Se requerirá ampliar la cantidad de sitios de muestreo logrando una representación más continua del área de distribución de la especie, y contar con más información sobre el aislamiento reproductivo entre los linajes a nivel de laboratorio, así como mayor resolución de las preferencias ecológicas de las especies parentales, para confirmar estas similitudes entre los dos estudios y poder analizar y caracterizar la zona híbrida de manera más detallada, e incluso compararla con una potencial zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia*, lo cual aportaría información sumamente esclarecedora para entender el proceso de especiación en *P. sierra* y especies cercanas.

En resumen, los análisis llevados a cabo en el presente estudio para determinar la existencia de hibridación entre *P. sierra* y *P. atromedia* y entre los linajes mitocondriales dentro de *P. sierra*, indicaron que ni el cortejo en específico, ni otros tipos de posibles barreras, imponen un aislamiento absoluto al flujo genético entre especies y linajes, lo que permite mezcla entre los genomas. Esto a su vez ha dado lugar a la formación de una zona híbrida entre los linajes mitocondriales de *P. sierra*, fenómeno que probablemente también exista entre *P. sierra* y *P. atromedia* allí donde sus áreas de distribución confluyen. El presente estudio demuestra la utilidad de los marcadores genéticos para detectar híbridos cuando otras fuentes de información como la morfología no son tan informativas. Probablemente los casos de hibridación entre arañas de especies cercanas sean más comunes de lo que se cree, pues, como sucede en muchos taxa, es probable que en muchos casos los híbridos pasan morfológicamente desapercibidos y no sean detectados (Mallet, 2005).

8 CONCLUSIONES

Las tres especies de araña lobo abordadas en el presente estudio tienen cortejos distintos, que se diferencian por el tipo de elementos o movimientos que los componen. Con base en la comparación de estos movimientos, los cortejos de *P. atromedia* y *P. sura* son más parecidos entre sí, que con respecto al de *P. sierra*. Dentro de *P. sierra* se observaron dos patrones de cortejo distintos, que no varían por el tipo de elementos que los componen, sino por la frecuencia e intensidad relativas con que son desplegados estos movimientos.

Mediante los análisis de genética poblacional utilizando microsatélites, se comprobó que la población de *P. atromedia* (CCA) es genéticamente distinta al resto de los sitios de muestreo analizados, que corresponden a *P. sierra*. Dentro de *P. sierra*, se encontraron cuatro poblaciones genéticamente distintas, la de Tecate (TCT) que es la más distinta; la población del sur de California (SCA1+SCA2), la cual pertenece a un linaje mitocondrial distinto; la población que habita los alrededores de Ensenada (ENS1+ENS2+ENS3+ENS4) y la población del Novillo (NOV) la más sureña de las aquí analizada.

La estructura genética de las poblaciones de *P. sierra* es compleja y no puede explicarse completamente en términos de aislamiento por distancia. Factores como la alta capacidad de dispersión y la existencia de refugios y la hibridación entre linajes, probablemente han tenido un papel importante en provocar esto, pero aún no se cuenta con un modelo explicativo.

A nivel de especies, hay alto grado de concordancia entre las genealogías mitocondriales, los patrones de diferenciación genética a partir de frecuencias alélicas de loci microsatélites y los datos de los cortejos. La única discordancia observada es que el ADN mitocondrial sugiere que *P. sierra* y *P. atromedia*, antes de separarse una de otra, constituyeron un linaje divergente de *P. sura*; mientras que los datos del cortejo sugieren que primero se separó *P. sierra* de *P. atromedia* y *P. sura* y posteriormente estas dos entre sí. Ambas alternativas de cladogénesis pueden ser explicados como resultado de aislamiento impuesto por eventos vicariantes.

Dentro de *P. sierra*, la única diferenciación genética que puede explicarse por vicarianza, aunque no del todo satisfactoriamente, es la existencia del linaje de California y

el linaje de la península. La especiación por selección sexual sobre el cortejo resulta aún menos adecuada para explicar la diversidad dentro de la especie, pues los patrones de cortejo no coinciden ni con los linajes mitocondriales ni con la estructuración genética obtenida mediante loci microsatélites, los cuales dan cuenta de eventos poblacionales relativamente recientes.

Vistos como un todo, los patrones de concordancia y discordancia entre genealogías mitocondriales, nucleares y datos conductuales tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, son una fuerte evidencia para sostener que la selección sexual probablemente no dirige el proceso de especiación en estas arañas. Los eventos vicariantes parecen tener mayor importancia relativa, pero tampoco ofrecen una explicación completamente satisfactoria, de modo que es probable que actúen en conjunto con otras fuerzas como selección natural por adaptación a ambientes distintos, deriva genética y después la selección sexual, pero actuando sobre rasgos que divergieron previamente.

En este caso la diferencia observada entre los cortejos, puede ser atribuida, al menos en su fase inicial, a la acumulación de diferencias que durante el aislamiento surgieron como subproducto de la adaptación del genoma a diferentes presiones selectivas del ambiente y/o por deriva genética.

Hasta el momento no se ha estudiado nada en concreto sobre los efectos de la selección natural o la adaptación a diferentes ambientes en la especiación de estas arañas. Es de capital importancia recabar información ecológica que ayude a evaluar y ponderar también este aspecto.

El hallazgo, mediante análisis genéticos, de individuos de ancestría mezclada entre *P. sierra* y *P. atromedia* y entre el linaje de California y el de la península dentro de *P. sierra*, sugieren que el cortejo no constituye una barrera absoluta al flujo genético a nivel inter específico, y tampoco a nivel inter linaje. Los resultados de experimentos de apareamiento inter linaje confirman esta información dentro de *P. sierra*. Esto renueva y justifica el interés por buscar una zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia*, cuyo estudio aportará información muy valiosa para mejorar el entendimiento de cómo han evolucionado *P. sierra* y sus especies cercanas.

9 RECOMENDACIONES

Con base en los resultados y conclusiones obtenidos en la presente investigación de tesis, se recomienda realizar estudios que permitan:

- 1) Aumentar el número de observaciones de cortejo a varias poblaciones de *P. atromedia* y *P. sura* que fueron caracterizados a partir de una población cada una y en el caso de *P. sierra* extender la observación de cortejos a poblaciones del centro de la península. Asimismo aumentar en general el número de observaciones de cortejo para descartar que la variación observada pueda deberse a variaciones individuales y no poblacionales. Describir los cortejos de otras especies dentro del grupo lapidicina también sería importante si se pretende establecer una genealogía del grupo basada en rasgos conductuales.
- 2) Aumentar la cantidad de experimentos entre los linajes mitocondriales de *P. sierra* para poder cuantificar el grado de aislamiento entre linajes, de ser posible desde la fase pre-copulatoria, comparando frecuencia de apareamientos, hasta la fase post-copulatoria comparando la cantidad de descendencia producida, su viabilidad y su fertilidad. Igualmente importante será llevar a cabo estos mismos experimentos con los tres posibles tipos de cruas inter-específicas.
- 3) Generar filogenias a partir de genes nucleares que ayuden corroborar las filogenias ya disponibles a partir de genes mitocondriales. En estudios de genética poblacional se deberá extender el muestreo a más poblaciones de *P. atromedia* así como incluir poblaciones de *P. sura*. Estos estudios deberán contemplar el uso del mayor número posible de loci.
- 4) Evaluar y cuantificar la influencia de factores ecológicos en la distribución y evolución de *P. sierra* y sus especies cercanas, *P. atromedia* y *P. sura*, por ejemplo mediante la aplicación de técnicas de predicción de nicho ecológico a estas especies para obtener un panorama general de las afinidades ecológicas de cada una y las diferencias entre ellas, de forma relativamente rápida y sencilla.
- 5) Continuar la búsqueda de una probable zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia* (o entre cualquier combinación de especies), en la cual observar los diferentes

factores morfológicos, genéticos, etológicos y ecológicos interactuando en tiempo real y en un escenario natural. Este enfoque holístico permitiría desentrañar el proceso evolutivo de una manera mucho más profunda que cualquiera de los anteriores enfoques por separado. La región suroeste de Estados Unidos comprendida entre los paralelos 34 y 38 latitud norte no ha sido muestreada aún. De existir una zona híbrida entre *P. sierra* y *P. atromedia*, su parte central debería encontrarse dentro de esta región.

6) Profundizar en el entendimiento de los mecanismos de dispersión de *P. sierra*, lo cual es un aspecto fundamental a considerar para poder explicar cómo es que se produce el flujo genético entre poblaciones distantes que se ha encontrado en los estudios de genética. Se requieren estudios que pongan a prueba las diferentes hipótesis que hay sobre posibles estrategias de dispersión y su efecto sobre la estructuración genética de las poblaciones de esta especie.

10 LITERATURA CITADA

- Abbott, R., D. Albach, S. Ansell, J. W. Arntzen, S. J. E. Baird, N. Bierne, J. Boughman, A. Brelsford, C. A. Buerkle, R. Buggs, R. K. Butlin, U. Dieckmann, F. Eroukhmanoff, A. Grill, S. H. Cahan, J. S. Hermansen, G. Hewitt, A. G. Hudson, C. Jiggins, J. Jones, B. Keller, T. Marczewski, J. Mallet, P. Martinez-Rodriguez, M. Möst, S. Mullen, R. Nichols, A. W. Nolte, C. Parisod, K. Pfennig, A. M. Rice, M. G. Ritchie, B. Seifert, C. M. Smadja, R. Stelkens, J. M. Szymura, R. Väinölä, J. B. W. Wolf y D. Zinner. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. 26(2): 229–246.
- Aljanabi, S.M. y I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.
- Alvarez-Castañeda S, T. y J. L. Patton. 2004. Geographic genetic architecture of pocket gopher (*Thomomys bottae*) populations in Baja California, Mexico. *Molecular Ecology*. 13(8): 2287-2301.
- Antao, T., A. Lopes, R. J. Lopes, A. Beja-Pereira y G. Luikart. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a F_{st} -outlier method. *BMC Bioinformatics*. 9: 323
- Arnegard, M. E. y A. S. Kondrashov. 2004. Sympatric speciation by sexual selection alone is unlikely. *Evolution*. 58(2): 222–237.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447 p.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer Associates. Segunda Edición. Sunderland, Massachusetts. 684 p.
- Avise, J. C., y R. M. Ball. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford surveys in evolutionary biology*. 7: 45-67.
- Barilani, M., A. Sfougaris, A. Giannakopoulos, N. Mucci, C. Tabarroni y E. Randi. 2007. Detecting introgressive hybridisation in rock partridge populations (*Alectoris graeca*) in Greece through Bayesian admixture analyses of multilocus genotypes. *Conservation Genetics*. 8(2): 343-354.

- Barnes, R. D. 1959. The Lapidicina Group of the Wolf Spider genus *Pardosa* (Araneae, Lycosidae). American Museum Novitates. 1960: 1-20
- Beaumont, M. A. y R. A. Nichols. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 263(1377): 1619-1626
- Belkhir K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste y F. Bonhomme. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Boul, K. E., W. C. Funk, C. R. Darst, D. C. Cannatella, y M. J. Ryan. 2007. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 274(1608): 399-406.
- Brautigam, S. E. y M. H. Persons. 2003. The Effect of Limb Loss on the Courtship and Mating Behavior of the Wolf Spider *Pardosa milvina* (Araneae: Lycosidae). Journal of Insect Behavior. 16(4): 571-587.
- Brownstein, M. J., J. D. Carpten, y J. R. Smith. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. Biotechniques. 20(6): 1004-1010.
- Brusca, R. C., G. J. Brusca. 1990. Invertebrates. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 893 p.
- Cabria, M. T., J. R. Michaux, B. J. Gómez-Moliner, D. Skumatov, T. Maran, P. Fournier, J. López de Luzuriaga, y R. Zardoya. 2011. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered european mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). Molecular Ecology 20(6): 1176-1190.
- Carlsson, J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. Journal of Heredity. 99(6): 616-623.
- Cavalli-Sforza, L. L. y A. W. F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution 32: 550-570.
- Chapuis, M. P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution. 24(3): 621-631.

- Chiarle, A., T. Kronstedt y M. Isaia. 2013. Courtship behavior in European species of the genus *Pardosa* (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*. 41(2): 108–125.
- Colliard, C., A. Sicilia, G. F. Turrisi, M. Arculeo, N. Perrin y M. Stöck. 2010. Strong reproductive barriers in a narrow hybrid zone of West-Mediterranean green toads (*Bufo viridis* subgroup) with Plio-Pleistocene divergence. *BMC Evolutionary Biology*. 10:232
- Correa-Ramírez, M. M. 2010. Análisis de la Diversidad Genética de *Pardosa sierra* Banks, 1898 (Araneae: Lycosidae) en la península de Baja California, México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 230 p.
- Correa-Ramírez, M. M., F. J. García-De León y M. L. Jiménez. 2010a. Isolation and characterization of 10 microsatellite loci from a wolf spider *Pardosa sierra* (Araneae, Lycosidae) from the Baja California Peninsula. *Molecular Ecology Resources*. 10. 232-236.
- Correa-Ramírez, M. M., M. L. Jiménez y F. J. García-De León. 2010b. Testing species boundaries in *Pardosa sierra* (Araneae: Lycosidae) using female morphology and COI mtDNA. *The Journal of Arachnology*. 38: 538-554.
- Correa-Ramírez, M. M., M. L. Jiménez, R. G. Gillespie y F. J. García de León. (en preparación) Phylogenetic patterns of *Pardosa sierra* (Araneae: Lycosidae) species complex: implications for biogeographic patterns in Northwestern part of Mexico. *Journal of Biogeography*.
- Costa, F. C. y R. M. Capocasale. 1984. *Lycosa carbonelli*, sp. nov.; una etoespecie simpátrida, sibilina de *Lycosa thorelli* (Keyserling) (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*. 11:423-431.
- Costa, F. G., G. Francescoli. 1991. Analyse expérimentale de l'isolement reproductif entre deux espèces jumelles et sympátriques d'aragnées: le *Lycosa thorelli* (Keyserling) et le *Lycosa carbonelli* Costa et Capocasale. *Canadian Journal of Zoology*. 69:1768-1776.
- Costa, F. G., C. Viera y G. Francescoli. 2000. A comparative study of sexual behavior in two symmorphic species of the genus *Lycosa* (Araneae, Lycosidae) and their hybrid progeny. *The Journal of Arachnology*. 28: 237-240.

- Crews, S. C. y M. Hedin. 2006. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: *Homalonychus*) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38(2): 470-487.
- Croucher, P. J. P., R. M. Jones, J. B. Searle, G. S. Oxford. 2007. Contrasting patterns of hybridization in large house spiders (*Tegenaria atrica* group, Agelenidae). *Evolution*. 61(7): 1622-1640.
- Croucher, P. J. P., G. S. Oxford y J. B. Searle. 2004. Mitochondrial differentiation, introgression and phylogeny of species in the *Tegenaria atrica* group (Araneae: Agelenidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 81(1): 79-89.
- De Busschere, C., L. Baert, S. M. Van Belleghem, W. Dekoninck y F. Hendrickx. 2012. Parallel phenotypic evolution in a wolf spider radiation on Galápagos. *Biological Journal of the Linnean Society*. 106(1): 123–136.
- De Busschere, C., F. Hendrickx, S. M. Van Belleghem, T. Backeljau, L. Lens y L. Baert. 2010. Parallel habitat specialization within the wolf spider genus *Hogna* from the Galápagos. *Molecular Ecology*. 19(18): 4029–4045.
- Delaney, K. J., J. A. Roberts y G. W. Uetz. 2007. Male signaling behavior and sexual selection in a wolf spider (Araneae: Lycosidae): a test for dual functions. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 62: 67-75.
- Dempster, A. P., N. M. Laird y D. B. Rubin. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*. 39: 1-38.
- Douglas, M. E., M. R. Douglas, G. W. Schuett y L. W. Porras. 2006. Evolution of rattlesnakes (Viperidae; *Crotalus*) in the warm deserts of western North America shaped by Neogene vicariance and Quaternary climate change. *Molecular Ecology*. 15(11): 3353-3374.
- Earl, D. A. y B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4(2): 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7. Core version: vA.1 March 2012 Plot version: vA.1 November 2012 Web version: v0.6.93 November 2012
- Eason, R. R. 1969. Life history and behavior of *Pardosa lapidicina* Emerton (Araneae: Lycosidae) *Journal of the Kansas Entomological Society*. 42(3): 339-360.

- Eberhard, W. G. 2004. Why study spider sex: special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. *The Journal of Arachnology* 32:545-556.
- Ersts, P. J. [Internet] Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Accessed on 2013-1-30.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Falush, D., M. Stephens, y J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164(4): 1567-1587.
- Falush, D., M. Stephens, y J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*. 7(4): 574-578.
- Feder, J. L., S. M. Flaxman, S. P. Egan y P. Nosil. 2013. Hybridization and the build-up of genomic divergence during speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. 26(2): 261–266.
- Felsenstein, J. 1986-2008. Gendist – Compute genetic distances from gene frequencies. Documentación del programa Gendist. University of Washington. Consultada en formato html del sitio: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/doc/gendist.html>
- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

- Fernández-Montraveta, C., J. Ruano-Bellido, J. González-García. 2001. La existencia de diferencias en el cortejo no garantiza su intervención en el aislamiento reproductor en dos arañas lobo (*Lycosa*, Araneae, Lycosidae). *Etología*. 9: 1-8.
- Foelix, R. F. 2011. *Biology of Spiders*. Oxford University Press. Tercera Edición. Nueva York, EUA. 419 p.
- Funk, W. C., D. C. Cannatella y M. J. Ryan. 2009. Genetic divergence is more tightly related to call variation than landscape features in the Amazonian frogs *Physalaemus petersi* and *P. freibergi*. *Journal of Evolutionary Biology*. 22(9): 1839-1853.
- Gian-Reto, W., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. C. Beebee, J. M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg y F. Bairlein. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature*. 416(6879): 389-395.
- Gibson, J. S. y G. W. Uetz. 2008. Seismic communication and mate choice in wolf spiders: components of male seismic signals and mating success. *Animal Behaviour*. 75(4): 1253–1262.
- Gillespie, R. 2004. Community Assembly Through Adaptive Radiation in Hawaiian Spiders. *Science*. 303(5656): 356–359.
- Glaubitz, J. C. 2004. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 4: 309-310.
- Gompert, Z., L. K. Lucas, J. A. Fordyce, M. L. Forister y C. C. Nice. 2010. Secondary contact between *Lycaeides idas* and *L. melissa* in the Rocky Mountains: extensive admixture and a patchy hybrid zone. *Molecular ecology* 19:(15): 3171-3192.
- González-Abraham, C. E., P. Peña-Garcillán, y E. Ezcurra. 2010. Ecorregiones de la península de Baja California: Una síntesis. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 87: 69-82.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Goudet, J. 2002. Fstat vs. 2.9.3.2. Institute of Ecology Biology Building. UNIL CH-1015. Lausanne, Switzerland.

- Graham, M. R., J. R. Jaeger, L. Prendini y B. R. Riddle. 2013. Phylogeography of the Arizona hairy scorpion (*Hadrurus arizonensis*) supports a model of biotic assembly in the Mojave Desert and adds a new Pleistocene refugium. *Journal of Biogeography*. 40(7): 1298–1312.
- Grether, G. F. 2010. Sexual selection and speciation. En: Breed, M. D. y J. Moore (eds.) *Encyclopedia of Animal Behavior*, volume 3. Elsevier. Oxford Academic Press. 177-183 p.
- Grismer, L. L. 1994. The origin and evolution of the peninsular herpetofauna of Baja California, México. *Herpetological Natural History*. 2: 51-106.
- Grismer, L. L. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California peninsula: A synthesis of molecules and historical geology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:14438-14443.
- Guerra, M. A. y S. R. Ron. 2008. Mate choice and courtship signal differentiation promotes speciation in an Amazonian frog. *Behavioral Ecology*. 19(6): 1128-1135.
- Harrison, R. G. (ed.). 1993. *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press. New York, New York. 364 p.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 2007. *Principles of population genetics*. Sinauer, Sunderland, MA. 652 p.
- Hedin, M. y M. C. Lowder. 2009. Phylogeography of the *Habronattus amicus* species complex (Araneae: Salticidae) of western North America, with evidence for localized asymmetrical mitochondrial introgression. *Zootaxa*. 2307: 39-60.
- Hewitt, G. M. 1988. Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*. 3(7): 158–167.
- Hoefler, C. D., A. L. Carlascio, M. H. Persons y A. L. Rypstra. 2009. Male courtship repeatability and potential indirect genetic benefits in a wolf spider. *Animal Behaviour*. 78: 183-188.
- Hoefler, C. D., M. H. Persons y A. L. Rypstra. 2008. Evolutionarily costly courtship displays in a wolf spider: a test of viability indicator theory. *Behavioral Ecology*. 19: 974-979.

- Hollander, J. D. y H. Dijkstra. 1974. *Pardosa vlijmi* sp. nov., a new ethospecies sibling *Pardosa proxima* (C. L. Koch, 1948), from France, with description of courtship display (Araneae, Lycosidae). *Beaufortia*. 22 :57-65.
- Hurtado, L. A., T. Erez, S. Castrezana y T. A. Markow. 2004. Contrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric Sonoran Desert cactophilic *Drosophila*. *Molecular Ecology*. 13(2): 1365–1375.
- Huson D. H. y C. Scornavacca. 2012. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology*, <http://sysbio.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/sys062?ijkey=ZCxPRbYt74aQJhR&keytype=ref>,
- Jakobsson, M., y N. A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23(14): 1801-1806.
- Jensen, J.L., A. J. Bohonak, y S. T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jespersen, L. B. y S. Toft. 2003. Compensatory growth following early nutritional stress in the Wolf Spider *Pardosa prativaga*. *Functional Ecology*. 17(6): 737-746.
- Jiménez, M. L. 1984. Comportamiento sexual de *Pardosa* n. sp., del grupo “Distincta” (Araneae, Lycosidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 61: 105-112.
- Johnson, N. 2008. Hybrid incompatibility and speciation. *Nature Education*. 1(1).
- Jombart, T. 2008. adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24(11): 1403-1405.
- Jombart, T., S. Devillard y F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 11(1):94.
- Kawakami, T. y R. K. Butlin. 2001. Hybrid Zones. En: *eLS* John Wiley & Sons, Ltd. Consultados en formato PDF del sitio <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0001752.pub2/abstract>

- Kothera, L., E. M. Zimmerman, C. M. Richards, y H. M. Savage. 2009. Microsatellite Characterization of Subspecies and Their Hybrids in *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) Mosquitoes Along a North-South Transect in the Central United States. *Journal of Medical Entomology*. 46(2): 236-248.
- Kotiaho, J. S., R. V. Alatalo, J. Mappes, M. G. Nielsen, S. Parri y A. Rivero. 1998. Energetic costs of size and sexual signalling in a wolf spider. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 265(1411): 2203-2209.
- Lancaster, M. L., N. J. Gemmell, S. Negro, S. Goldsworthy y P. Sunnucks. 2006. Ménage à trois on Macquaire Island: hybridization among three species of fur seal (*Arctocephalus* spp.) following historical population extinction. *Molecular Ecology*. 15(12): 3681-3692.
- Lattimore, V. L., C. J. Vink, A M. Paterson y R. H. Cruickshank. 2011. Unidirectional introgression within the genus *Dolomedes* (Araneae: Pisauridae) in southern New Zealand. *Invertebrate Systematics* 25(1) 70-79.
- Leberg, P. L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*. 11(11): 2445-2449.
- Lepais, O., R. J. Petit, E. Guichoux, J. E. Lavabre, F. Alberto, A. Kremer y S. Gerber. 2009. Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology*. 18(10): 2228-2242.
- Li, G., S. Hubert, K. Bucklin, V. Ribes y D. Hedgecock. 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*. 3(2) 228-232.
- Lindell, J., A. Ngo, y R. W. Murphy. 2006. Deep genealogies and the mid-peninsular seaway of Baja California. *Journal of Biogeography*. 33(8): 1327–1331.
- Lomborg, J. P. y S. Toft. 2009. Nutritional enrichment increases courtship intensity and improves mating success in male spiders. *Behavioral Ecology*. 20:700-708.
- Lozano-Garza, O. A. 2013. Análisis de la estructura genética poblacional de la pitaya agria (*Stenocereus gummosus*) en el Desierto Sonorense. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 71 p.

- Macías-García, C., G. Smith, C. González-Zuarth, J. A. Graves y M. G. Ritchie. 2012. Variation in sexual dimorphism and assortative mating do not predict genetic divergence in the sexually dimorphic Goodeid fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Current Zoology*. 58(3): 440-452.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 20(5): 229-237.
- Masta, S. E. y W. P. Maddison. 2002. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(7): 4442–4447.
- Matute, D. R., I. A. Butler, D. A. Turissini, J. A. Coyne. 2010. A Test of the Snowball Theory for the Rate of Evolution of Hybrid Incompatibilities. *Science*. 329: 1518–1521.
- Michel, A. P., S. Sim, T. H. Q. Powell, M. S. Taylor, P. Nosil y J. L. Feder. 2010. Widespread genomic divergence during sympatric speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(21): 9724–9729.
- Miller, G. L., G. E. Stratton, P. R. Miller y E. Hebets. 1998. Geographical variation in male courtship behaviour and sexual isolation in wolf spiders of the genus *Schizocosa*. *Animal Behaviour*. 56(4): 937-951.
- Miraldo, A., C. Faria, G. M. Hewitt, O. S. Paulo y B. C. Emerson. 2013. Genetic analysis of a contact zone between two lineages of the ocellated lizard (*Lacerta lepida* Daudin 1802) in south-eastern Iberia reveal a steep and narrow hybrid zone. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 51(1): 45-54.
- Morin, P. A., C. Manaster, S. L. Mesnick y R. Holland. 2009. Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with allelogram. *Molecular Ecology Resources* 9(6): 1451-1455.
- Moritz, C., T. E. Dowling y W. M. Brown. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 269-292.
- Moya-Laraño, J., J. M. Orta-Ocaña, J. A. Barrientos, C. Bach y D. H. Wise. 2003. Intriguing compensation by adult female spiders for food limitation experienced as juveniles. *Oikos*. 101(3): 539-548.

- Mulcahy, D. G. y J. R. Macey. 2009. Vicariance and dispersal form a ring distribution in nightsnakes around the Gulf of California. *Molecular phylogenetics and evolution*. 53(2): 537–546.
- Muller, H. J. 1942. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biology Symposium*. 6: 71–125.
- Munguía-Vega, A. Sin publicar. Pervasive deep phylogeographic breaks in the Baja California Peninsula's biota. Conservation Genetics Laboratory. University of Arizona Tucson. Consultado en formato PDF del sitio <http://loco.biosci.arizona.edu/PDG/pdfs/BajaPhylogeography.pdf>.
- Muñoz-Fuentes, V., C. Vilà, A. J. Green, J. J. Negro y M. D. Sorenson. 2007. Hybridization between white-headed ducks and introduced ruddy ducks in Spain. *Molecular Ecology*. 16(3): 629-638.
- Murphy, R. W. 1983. Paleobiogeography and Genetic Differentiation of the Baja California Herpetofauna. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*. 137: 1-48.
- Murphy, R. W. y G. Aguirre-León. 2002. The Nonavian Reptiles. Origins and Evolution. En: Case, T. J., M. L. Cody y E. Ezcurra (Editores). *A New Island Biogeography of the Sea of Cortés*. Oxford University Press. Nueva York. 181-220 p.
- Murphy, N. P., V. W. Framenau, S. C. Donnellan, M. S. Harvey, Y. C. Park, y A. D. Austin. 2006. Phylogenetic reconstruction of the wolf spiders (Araneae: Lycosidae) using sequences from the *12S rRNA*, *28S rRNA*, and *NADHI* genes: Implications for classification, biogeography, and the evolution of web building behavior. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38: 583-602.
- Nason, J. D. 2011. Population trees: genetic distances and clustering methods. Apuntes de clase EEOB 567: Empirical Population Genetics, Iowa State University. Consultados en formato PDF del sitio <http://jnason.eeob.iastate.edu:8080/nasonlab/courses/population-genetics/lecture-notes/>
- Nason, J. D., J. L. Hamrick y T. H. Fleming. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution*. 56(11): 2214-2226.

- Nolte, A. W., Z. Gompert, C. A. Buerkle. 2009. Variable patterns of introgression in two sculpin hybrid zones suggest that genomic isolation differs among populations. *Molecular Ecology*. 18(12): 2615-2627.
- Norton, S. y G. W. Uetz. 2005. Mating frequency in *Schizocosa ocreata* (Hentz) wolf spiders: evidence for a mating system with female monandry and male polygyny. *The Journal of Arachnology*. 33:16-24.
- Ornduff, R., P. M. Faber y T. Keeler-Wolf. 2003. Introduction to California plant life California Natural History Guides No. 69. University of California Press. London. 341 p.
- Panhuis, T. M., R. Butlin, M. Zuk y T. Treganza. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*. 16(7): 364-371.
- Papura, D., C. Burban, M. van Helden, X. Giresse, B. Nusillard, T. Guillemaud, y C. Kerdelhué. 2012. Microsatellite and Mitochondrial Data Provide Evidence for a Single Major Introduction for the Nearctic Leafhopper *Scaphoideus titanus* in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 7(5): e36882.
- Parmesan C., N. Ryrholm, C. Stefanescu, J. K. Hill, C. D. Thomas, H. Descimon, B. Huntley, L. Kaila, J. Kullberg, T. Tammaru, W. J. Tennent, J. A. Thomas y M. Warren. 1999. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature*. 399(6736): 579-583.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Pfeiler, E., T. Erez, L. A. Hurtado y T. A. Markow. 2007. Genetic differentiation and demographic history in *Drosophila patchea* from the Sonoran Desert. *Hereditas*. 144(2): 63-74.
- Piry S., A. Alapetite, J. M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin y A. Estoup. 2004. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 95: 536-539.

- Platnick, N. I. 1971. The evolution of courtship behavior in spiders. *Bulletin of the British Arachnological Society*. 2: 40-47.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain y P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 6(11): 847-859.
- Pritchard, V. L., K. Jones y D. E. Cowley. 2007. Estimation of introgression in cutthroat trout populations using microsatellites. *Conservation Genetics*. 8:1311-1329.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155(2): 945-959.
- Punzo, F. y C. Farmer. 2006. Life history and ecology of the wolf spider *Pardosa sierra* Banks (Araneae: Lycosidae) in Southwestern Arizona. *The Southwestern Naturalist*. 51(3): 310-319.
- Queiroz, A. D. y R. Lawson. 2008. A peninsula as an island: multiple forms of evidence for overwater colonization of Baja California by the gartersnake *Thamnophis validus*. *Biological Journal of the Linnean Society*. 95(2): 409-424.
- Queney, G., N. Ferrand, S. Weiss, F. Mougél y M. Monnerot. 2001. Stationary distributions of microsatellite loci between divergent population groups of the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Molecular Biology and Evolution*. 18(12): 2169-2178.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundations for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Randi, E. 2007. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology*. 17(1): 285-293.
- Reiskind, J. y P. E. Cushing. 1996. Study of a narrow hybrid zone between two wolf spiders, *Lycosa ammophila* and *Lycosa ericeticola* in North Florida (Araneae, Lycosidae). *Revue Suisse de Zoologia* 1: 543-554.
- Rendall, D. y A. Di Fiore. 2007. Homoplasy, homology, and the perceived special status of behavior in evolution. *Journal of Human Evolution* 52: 504-521.
- Rice, W. R., 1989. Analysis tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Riddle, B. R. y D. J. Hafner. 2006. A step-wise approach to integrating phylogeographic and phylogenetic biogeographic perspectives on the history of a core North American warm deserts biota. *Journal of Arid Environments*. 66(3): 435-461.

- Riddle B. R., D. Hafner, y L. F. Alexander. 2000a. Comparative Phylogeography of Baileys' Pocket Mouse (*Chaetodipus baileyi*) and the *Peromyscus eremicus* species group: historical vicariance of the Baja California Peninsular Desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 17(2): 161-172.
- Riddle B. R., D. Hafner y L. F. Alexander. 2000b. Phylogeography and systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of North American warm regional deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 17(2): 145-160.
- Riddle, B. R., D. Hafner, L. F. Alexander y J. R. Jaeger. 2000c. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(26):14438-14443.
- Ritchie, M. G. 2007. Sexual Selection and Speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 38: 79-102.
- Ritchie, M. G., R. M. Hamil, J. A. Graves, A. E. Magurran, S. A. Webb y C. Macías-García. 2007. Sex and differentiation: Population genetic divergence and sexual dimorphism in Mexican goodeid fish. *Journal of Evolutionary Biology*. 20: 2048-2055.
- Ritchie, M. G., S. A. Webb, J. A. Graves, A. E. Magurran, C. Macías-García. 2005. Patterns of speciation in endemic Mexican Goodeid fish: Sexual conflict or early radiation? *Journal of Evolutionary Biology*. 18: 922-929.
- Robinson, M. H. 1982. Courship and mating behavior in spiders. *Annual Review of Entomology*. 27:1-20
- Rogers, S. M. y L. Bernatchez. 2006. The genetic basis of intrinsic and extrinsic post-zygotic reproductive isolation jointly promoting speciation in the lake whitefish species complex (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Evolutionary Biology*. 19(6): 1979–1994.
- Romero-Vivas, E, E. Mendez-Salinas, M. L. Jiménez y F. J. García de León. 2012. Design of a home-made, low-cost system for studies of vibratory courtship signals on *Pardosa Sierra* (Areneae: Lycosidae) spiders *Journal of the Acoustical Society of America*. 131: 3456.
- Rosenberg, N. A. 2003. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*. 4(1): 137-138.

- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8(1): 103-106.
- Rypstra, A. L., C. Wieg, S. E. Walker y M. H. Persons. 2003. Mutual mate assessment in wolf spiders: differences in the cues used by males and females. *Ethology*. 109: 315-325.
- Rzedowski, J., 2006. *Vegetación de México*. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 504 p.
- Sanz, N., R. M. Araguas, R. Fernández, M. Vera y J.-L. García-Marín. 2009. Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conservation Genetics*. 10(1): 225–236.
- Scheffer, S. J., G. W. Uetz y G. E. Stratton. 1996. Sexual selection, male morphology, and the efficacy of courtship signalling in two wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 38(1): 17–23.
- Schwenk, K. N. Brede y B. Streit. 2008. Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363(1505): 2805-2811.
- Selkoe, K. A. y R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9:615-629.
- Senn, H. V. y J. M. Pemberton. 2009. Variable extent of hybridization between invasive sika (*Cervus nippon*) and native red deer (*C. elaphus*) in a small geographical area. *Molecular Ecology*. 18(5): 862-876.
- Shamble, P. S., D. J. Wilgers, K. A. Swoboda, y E. A. Hebets. 2009. Courtship effort is a better predictor of mating success than ornamentation for male wolf spiders. *Behavioral Ecology*. 20(6): 1242-1251.
- Stratton, G. E. 2005. Evolution of ornamentation and courtship behavior in *Schizocosa*: Insights from a phylogeny based on morphology (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology*. 33(2): 347-376.
- Stratton, G. E., y G. W. Uetz. 1986. The inheritance of courtship behavior and its role as a reproductive isolating mechanism in two species of *Schizocosa* wolf spiders (Araneae; Lycosidae). *Evolution* 40(1): 129-141.

- Thomas, C. F. G., P. Brain y P. C. Jepson. 2003. Aerial activity of linyphiid spiders: modelling dispersal distances from meteorology and behaviour. *Journal of Applied Ecology*. 40: 912-927.
- Thompson, S. L., M. Lamothe, P. G. Meirmans, P. Périnet y N. Isabel. 2010. Repeated unidirectional introgression towards *Populus balsamifera* in contact zones of exotic and native poplars. *Molecular Ecology*. 19(1): 132-145.
- Tietjen, W. J. y J. S. Rovner. 1982. Chemical communication in lycosids and other spiders. En: Witt, P. N. y J. S. Rovner (Editores). *Spider Communication: Mechanisms and Ecological Significance*. Princeton University Press, Princeton. 248-279 p.
- Tonione, M., J. R. Johnson y E. J. Routman. 2011. Microsatellite analysis supports mitochondrial phylogeography of the hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*). *Genetica*. 139(2): 209–219.
- Töpfer-Hofmann, G., D. Cordes y O. v. Helversen. 2000. Cryptic species and behavioural isolation in the *Pardosa lugubris* group (Araneae, Lycosidae), with description of two new species. *Bulletin of the British arachnological society*. 11(7): 257-274.
- Turnbull, A. L. 1973. Ecology of the true spiders (Araneomorphae). *Annual Review of Entomology*. 18: 305-348.
- Uetz, G. W., J. Bischoff y J. Raver. 1992. Survivorship of wolf spiders (Lycosidae) reared on different diets. *The Journal of Arachnology*. 20: 207-211.
- Uetz, G. W., y Roberts, J. A. 2002. Multisensory cues and multimodal communication in spiders: insights from video/audio playback studies. *Brain, Behavior and Evolution*. 59(4): 222-230.
- Uetz, G. W. y G. E. Stratton. 1982. Acoustic communication and reproductive isolation in spiders. En: Witt, P. N. y J. S. Rovner (Editores). *Spider Communication: Mechanisms and Ecological Significance*. Princeton University Press, Princeton. 123-159 p.
- Upton, D. E. y R. W. Murphy. 1997. Phylogeny of the side-blotched lizards (Phrynosomatidae:Uta) based on mtDNA sequences: support for midpeninsular seaway in Baja California. *Molecular phylogenetics and evolution*. 8(1): 104–113.

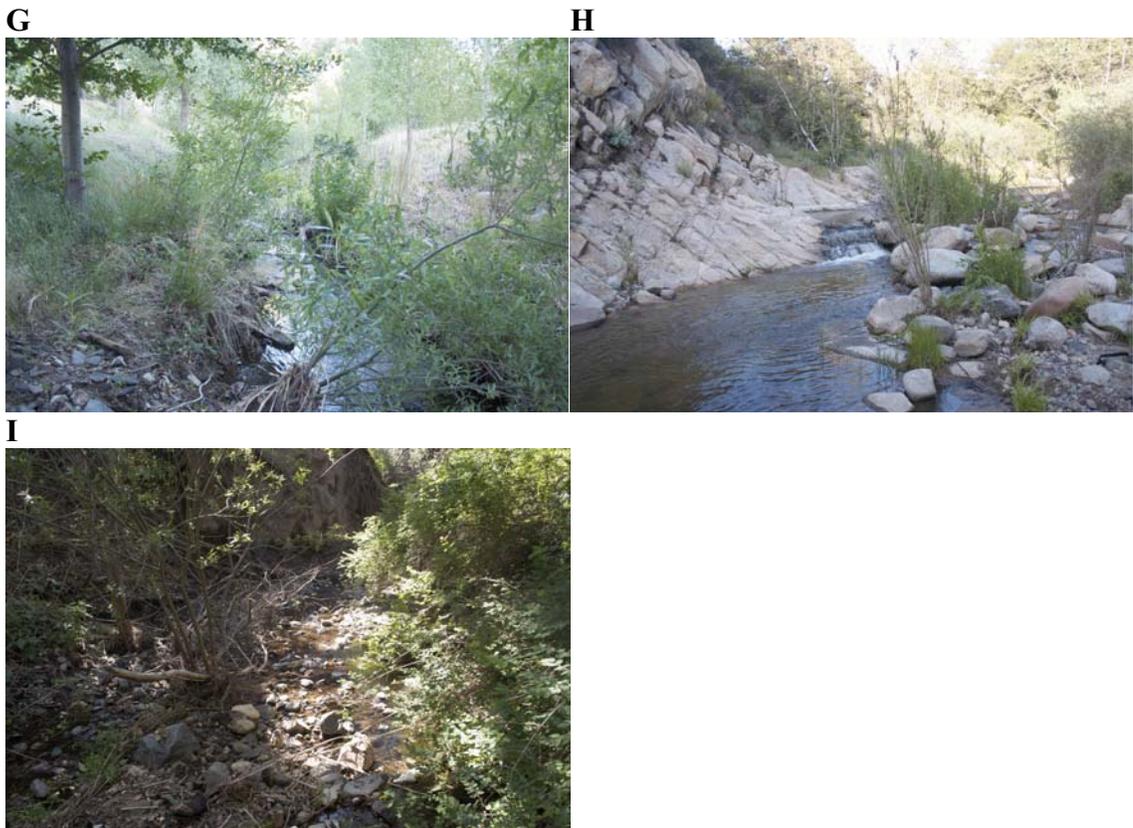
- Vähä, J. P., y C. R. Primmer. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*. 15(1): 63-72.
- Valbuena-Carabaña, M., S. C. González-Martínez², O. J. Hardy y L. Gil. 2007. Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization. *Molecular Ecology*. 16(6): 1207-1219.
- Van Dyke, D. y D. C. Lowrie. 1975. Comparative life histories of the wolf spiders *Pardosa ramulosa* and *P. sierra* (Araneae: Lycosidae). *The Southwestern Naturalist*. 20(1): 29-44.
- van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4(3): 535-538.
- Verzijden, M. N., R. F. Lachlan y M. R. Servedio. 2005. Female mate-choice behavior and sympatric speciation. *Evolution*. 59(10): 2097-2108.
- Via, S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology and Evolution*. 16(7): 381-390.
- Vlček, K. 1995. The wolf spider *Pardosa alacris* (Araneae, Lycosidae): the courtship display of this and related species and pheromone communication. *Proceedings of the 15th European Colloquium of Arachnology*. 174-183.
- Vogel, B. R. 2004. A review of the spider genera *Pardosa* and *Acantholycosa* (Araneae, Lycosidae) of the 48 contiguous United States. *The Journal of Arachnology* 32: 55-108.
- Weir, B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wilder, S. M. y A. L. Rypstra. 2008a. Diet quality affects mating behaviour and egg production in a wolf spider. *Animal Behaviour*. 76(2): 439-445.
- Wilder, S. M. y A. L. Rypstra. 2008b. Prior encounters with the opposite sex affect male and female mating behavior in a wolf spider (Araneae, Lycosidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 62(11): 1813-1820.
- Wilgers, D. J. y E. A. Hebets. 2011. Age-related female mating decisions are condition dependent in wolf spiders. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 66(1): 29-38.

- Wood, D. A., R. N. Fisher y T. W. Reeder. 2008. Novel patterns of historical isolation, dispersal, and secondary contact across Baja California in the Rosy Boa (*Lichanura trivirgata*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46(2): 484-502.
- Zink, R. 2010. Drawbacks with the use of microsatellites in phylogeography: the song sparrow *Melospiza melodia* as a case study. *Journal of Avian Biology*. 41(1): 1-7.
- Zink R. M., y R. C. Blackwell. 1998. Molecular systematics and biogeography of arid land gnatcatchers (Genus *Polioptila*) and evidence supporting species status of the California gnatcatcher (*Polioptila californica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9(1): 26-32.
- Zink R. M., R. C. Blackwell y O. Rojas-Soto. 1997. Species limits in the Le Conte's thrasher. *The Condor*. 99(1): 132-138.
- Zink R. M., G. F. Barrowclough, J. L. Atwood, y R. C. Blackwell-Rago. 2000. Genetics, taxonomy, and conservation of the threatened California gnatcatcher. *Conservation Biology*. 14(5): 1394-1405.
- Zink R. M., A. E. Kessen, T. V. Line y R. C. Blackwell-Rago. 2001. Comparative phylogeography of some arid land bird species. *The Condor*: 103(1): 1-10.

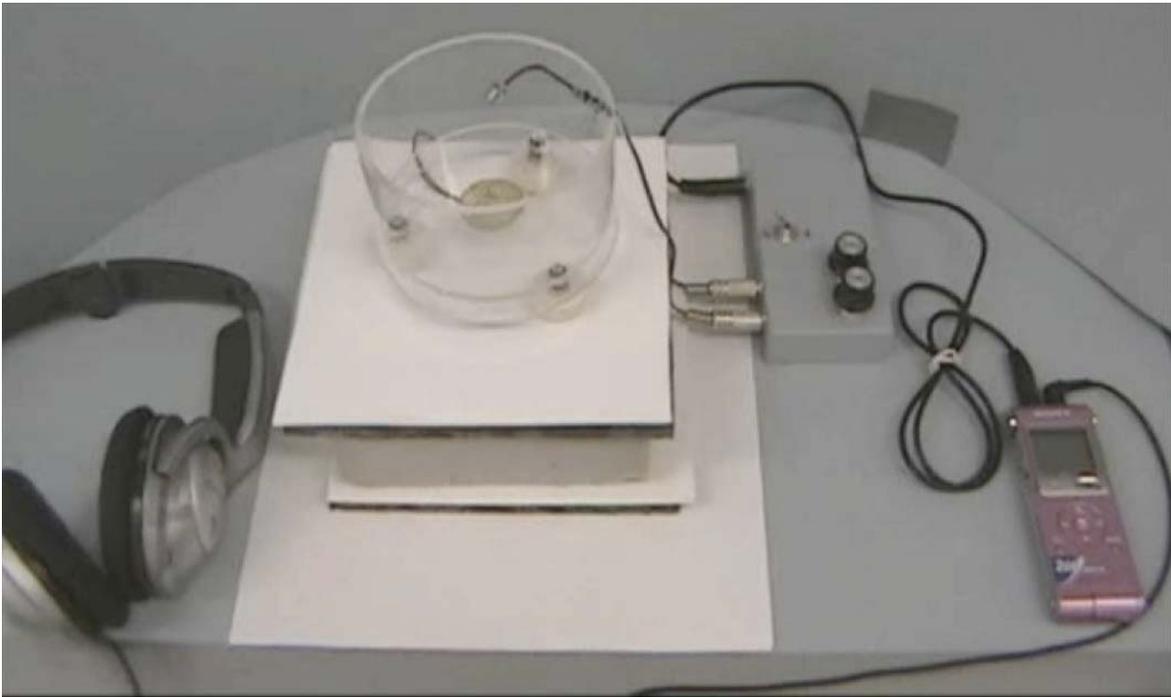
11 ANEXOS



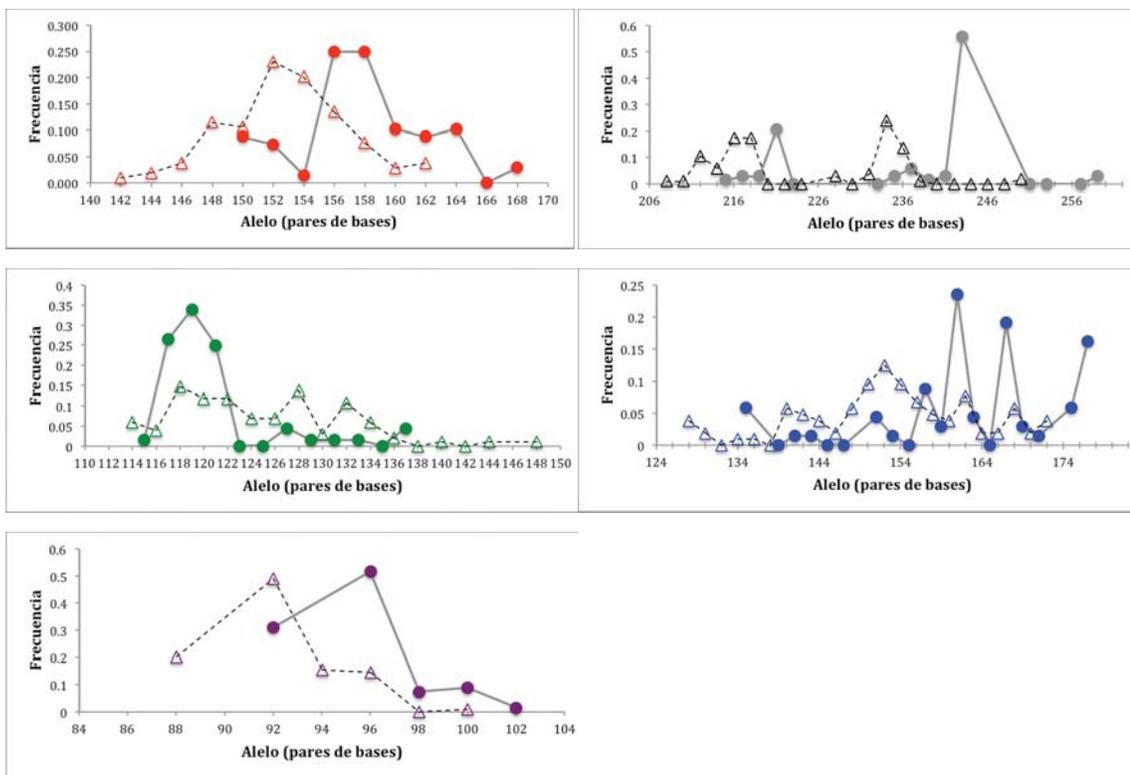
Anexo 1. Continua en la página siguiente.



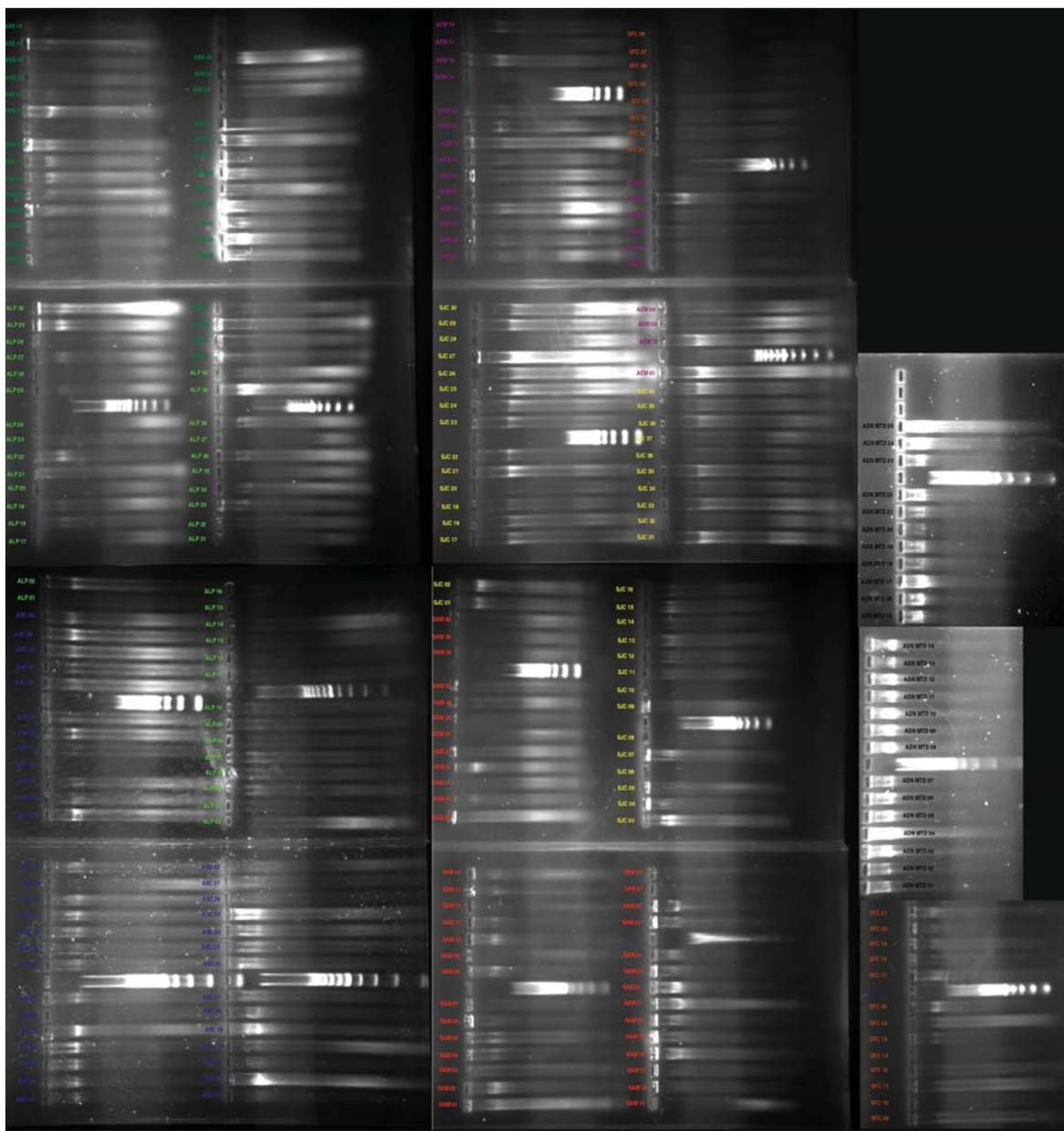
Anexo 1. Fotografías de algunos sitios de muestreo de *P. sierra* en la península de Baja California y California, E.U.A. **A.** Presa de la Buena Mujer (LPZ) **B.** Arroyo El Mejín (ENS1) **C.** Arroyo San Carlos (ENS3) **D.** Arroyo San Antonio de las Minas (ENS4) **E.** Rancho las liebres (ENS5) **F.** Arroyo las Palomas (TCT) **G.** San Felipe Creek (SCA1) **H.** San Juan Creek (SCA2) **I.** Descanso Town (SCA3). No se obtuvieron fotografías de los sitios ENS2, MTY y CCA. Para ver más información de cada sitio de muestreo referirse a la Tabla I. Las fotografías también se encuentran en el disco compacto con material complementario.



Anexo 2. Aparato utilizado para llevar a cabo los experimentos de cortejo. Se muestra el cilindro de acrílico rodeando el disco de acrílico con el sensor piezoeléctrico, donde se colocaba un disco de papel filtro (no mostrado) para que interactuaran las arañas. Todo esto va montado sobre las placas metálicas y la esponja para aislar de vibraciones ambientales. Además está conectado a un amplificador y una grabadora. Las cámaras de video no aparecen en la foto. Referirse a la descripción detallada del aparato en el texto. Esta fotografía también se encuentra en el disco compacto con material complementario.



Anexo 3. Comparación entre las frecuencias alélicas obtenidas por Correa-Ramírez (2010) (línea punteada con triángulos) y el presente estudio (línea continua con círculos) utilizando los loci Psier04 (rojo), Psier17 (gris), Psier19 (verde), Psier20 (azul) y Psier21 (vino) en el sitio de muestreo El Novillo.



Anexo 4. Fotografías de los geles de agarosa de las extracciones de ADN de *Pardosa sierra* y *P. atromedia* de la península de Baja California y California, E.U.A. utilizadas para la genotipificación con loci microsatélites del presente estudio. Los individuos etiquetados como “AEM” en vino corresponden al sitio ENS1; “ASS” en verde oscuro, a ENS2; “ASC” en azul, a ENS3; “SAM” en rojo, a ENS4; “ALP” en verde claro, a TCT; “SFC” en marrón, a SCA1; “SJC” en amarillo, a SCA2 y “MTD” en negro, a CCA. Nótese el alto peso molecular de las extracciones de CCA en comparación con el degradado en la mayoría de los ADNs de otros sitios. Esta imagen también se encuentran en el disco compacto con material complementario para poder visualizarla en un mayor tamaño.