



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## Grado en Biología

### Memoria del Trabajo de Fin de Grado

***Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae): evolución de su invasión biológica fuera de su área de origen y revisión de su posición en el árbol filogenético de la familia Theridiidae**

***Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae): evolución da súa invasión biolóxica fora da súa área de orixe e revisión da súa posición na árbore filoxenética da familia Theridiidae**

***Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae): evolution of its biological invasion outside its original distribution range and revision of its position in the phylogenetic tree of the Family Theridiidae**



Ignacio Delgado Ferreiro

**Curso:** 2018/2019 - **Convocatoria:** julio

**Directores Académicos:** Horacio Naveira Fachal, Pedro Galán Regalado

Imagen de portada: (Stu's Images, 2015)

D. **Horacio Naveira Fachal**, y D. **Pedro Galán Regalado**, pertenecientes al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

certifican:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “*Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae): evolución de su invasión biológica fuera de su área de origen y revisión de su posición en el árbol filogenético de la familia Theridiidae”, fue realizado bajo su dirección por D. Ignacio Delgado Ferreiro en los laboratorios del *Centro de Investigacións Científicas Avanzadas* (CICA) de la Universidade da Coruña y en la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña, y una vez finalizado, autorizan su presentación como *Trabajo de Fin de Grado* para optar al Título de Graduado en Biología por la Universidade da Coruña.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en A Coruña a 17 de julio de 2019.

Dr. Horacio Naveira Fachal

Dr. Pedro Galán Regalado

Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña

Rúa da Fraga nº 10, 15071, A Coruña



## **Agradecimientos**

A mis tutores, por acoger mi propuesta para el presente trabajo con interés desde el primer momento, y por ayudarme a darle forma y desarrollarla. A Pedro, por su empeño en que el empleo de las nuevas herramientas genéticas e informáticas conviva con la taxonomía clásica y la mantenga viva, algo que me inspiró durante la preparación de este trabajo. A Horacio, por introducirme en el mundo de la evolución molecular, del análisis de datos genéticos y de la bioinformática, y proporcionarme los medios para empezar a entender lo que es la Evolución, en un ejercicio mentalmente estimulante.

A Cosme Damián Romay, por acompañarme en el laboratorio con la misma gana con la que me acompañaría en una salida de campo o en un muestreo.

A mis amigos de la Facultad por, entre muchas otras cosas, las horas de compañía durante el trabajo de experimental y la redacción de esta memoria.

A mi familia y todos los que me han acompañado durante la larga aventura del estudio simultáneo de Biología y Química.



## Resumen

*Steatoda nobilis* es una especie de origen macaronésico que ha colonizado gran parte de Europa y se extiende por Norteamérica y Sudamérica. En este trabajo se recopilan evidencias sobre el origen geográfico de esta especie, y las citas más relevantes de esta fuera de su territorio de origen, para reconstruir el proceso de colonización. Asimismo, se presentan evidencias de que su interacción con el medio y las especies autóctonas en los territorios en los que es alóctona hacen necesario someterla a valoración para que sea incluida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras.

Se presenta un estudio filogenético de la subfamilia Latrodectinae (Araneae, Theridiidae) basado en el gen COI, que indica que es un grupo altamente complejo, y que es posible que en él existan géneros polifiléticos. Se presentan evidencias de que *Steatoda nobilis* es próxima a *Steatoda paykulliana* y a *Steatoda capensis*, y que juntas constituyen uno de los grupos basales de la subfamilia.

**Palabras clave:** *Steatoda nobilis*, *Steatoda grossa*, Latrodectus, Latrodectinae, especie invasora, Theridiidae, filogenia, COI

## Resumo

*Steatoda nobilis* é una especie de orixe macaronésica, que colonizou gran parte de Europa e se estende por Norteamérica e Suramérica. Neste traballo recóllense evidencias sobre a orixe xeográfica desta especie, e as citas máis relevantes desta fóra do seu territorio de orixe, para reconstruír o proceso de colonización. Tamén preséntanse evidencias de que a súa interacción co medio e as especies autóctonas fan necesario sometela a valoración para que sexa incluída no Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras.

Preséntase un estudo filoxenético da subfamilia Latrodectinae (Araneae, Theridiidae) baseado no xene COI, que indica que é un grupo altamente complexo, e que é posible que nel existan xéneros polifiléticos. Preséntanse evidencias de que *Steatoda nobilis* é próxima a *Steatoda paykulliana* e a *Steatoda capensis*, e que xuntas constitúen un dos grupos basais de la subfamilia.

**Palabras clave:** *Steatoda nobilis*, *Steatoda grossa*, Latrodectus, Latrodectinae, especie invasora, Theridiidae, filoxenia, COI

## Abstract

*Steatoda nobilis* is a Macaronesian species which has colonized a big part of Europe and has extended through North and South America. In this work, evidences of the geographic origin of the species are recollected, and the most relevant occurrences of this species outside of its territory of origin, to reconstruct the colonization process. Likewise, evidences of its interaction with the environment and the indigenous species in the territories where it is foreign, make an evaluation for its inclusion in the “Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras” necessary.

A phylogenetic study of the subfamily Latrodectinae (Araneae, Theridiidae) based on the gene COI is presented, that indicates that this is a highly complex group and that is possible that it contains polyphyletic genera. Evidence is presented that *Steatoda nobilis* is close to *Steatoda paykulliana* and *Steatoda capensis*, and that they constitute one of the basal groups of the subfamily.

**Key words:** *Steatoda nobilis*, *Steatoda grossa*, Latrodectus, Latrodectinae, alien species, Theridiidae, phylogeny, COI



## Contenidos

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Steatoda nobilis</i> : una araña introducida con potencial invasor.....	1
1.2. El árbol filogenético de la familia Theridiidae y la posición de <i>Steatoda nobilis</i> .....	2
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>3</b>
3.1. Especie objeto de estudio.....	3
3.2. Búsqueda de citas bibliográficas para la reconstrucción de su expansión fuera de su territorio natural y la evaluación de su impacto. ....	5
3.3. Obtención de datos para llevar a cabo análisis filogenéticos .....	5
3.4. Análisis de datos filogenéticos.....	7
<b>4. Resultados .....</b>	<b>8</b>
4.1. Reconstrucción de su expansión fuera de su territorio natural.....	8
Área de origen.....	8
Expansión por Europa y Oriente Medio.....	9
Expansión por América.....	10
4.2. Evaluación de su impacto sobre especies y ecosistemas en las áreas en las que es alóctona .....	10
4.3. Obtención de datos para llevar a cabo el análisis filogenético .....	11
4.4. Análisis de datos filogenéticos.....	12
<b>5. Discusión .....</b>	<b>13</b>
5.1. Reconstrucción de su expansión fuera de su territorio natural .....	13
5.2. Evaluación de su impacto sobre especies y ecosistemas en las áreas en las que es alóctona.....	13
5.3. Obtención de datos para llevar a cabo el análisis filogenético .....	13
5.4. Análisis de datos filogenéticos.....	14
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>15</b>
Conclusiones.....	15
Conclusións.....	16
Conclusions.....	16
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>19</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>25</b>
Anexo 1. Secuencias empleadas en la reconstrucción filogenética .....	25
Anexo 2. Concentración y parámetros de calidad y pureza del ADN genómico extraído .....	26
Anexo 3. Árboles filogenéticos .....	27



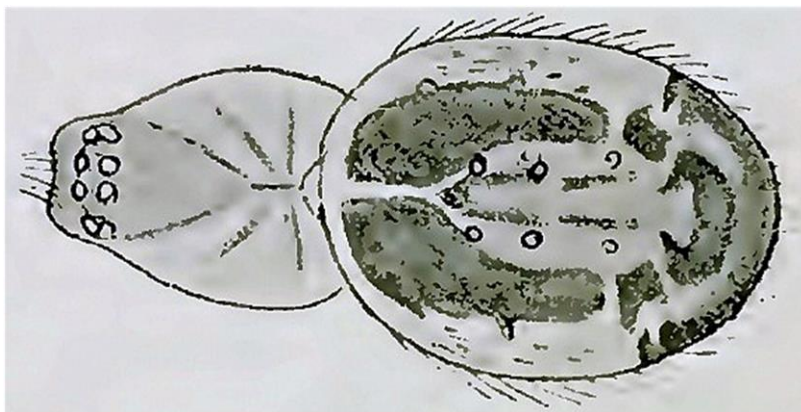
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Steatoda nobilis*: una araña introducida con potencial invasor

*Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae) (Figura 1) es una especie originaria de Macaronesia (Roberts, 1996), que se ha extendido por Europa, y actualmente también por Norteamérica y Sudamérica (Gbif.org, 2017).

En la Unión Europea existen unas 12.000 especies exóticas introducidas, de las que se calcula que aproximadamente entre el 10 y el 15 % son invasoras. Las especies alóctonas no siempre suponen un perjuicio para la biodiversidad y ecosistemas autóctonos, pero las especies invasoras representan una seria amenaza, especialmente en los ecosistemas más frágiles (Reglamento (UE) N° 1143/2014, 2014).

La Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, define una especie exótica invasora (EEI) como “aquella que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética”. En esta misma ley se recoge la creación del Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras, regulado por el Real Decreto 630/2013. Actualmente en dicho catálogo se recogen 14 especies y/o géneros de artrópodos terrestres, de los que solo uno es un arácnido.



**Figura 1.** Ilustración del prosoma y opistosoma una hembra de *S. nobilis* realizada en 1907 por A. R. Jackson (Jackson, 1907)

*Steatoda nobilis* no está incluida en este catálogo ni en la Lista de Especies Exóticas Preocupantes para la Unión Europea (Reglamento (UE) N° 1143/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de octubre de 2014 sobre la prevención y la gestión de la introducción y propagación de especies exóticas invasoras, 2014), aunque sí figura en el *European Alien Species Information Network Catalogue of Alien Species* como especie alóctona, indicando un impacto “bajo o desconocido” (Comisión Europea - Joint Research Centre, 2012).

La espectacular expansión fuera de su área de origen (Gbif.org, 2017) y la naturaleza depredadora de esta especie, la convierten en una potencial candidata a ser incluida en el Catálogo Español. En el artículo 5 del Real Decreto 630/2013 se establece

que para que se inicie el trámite para que una especie sea incluida en el Catálogo, se debe respaldar cualquier solicitud con informes científicos y técnicos justificativos, lo que hace interesante el estudio de la biología y distribución de esta especie en la Península Ibérica.

## **1.2. El árbol filogenético de la familia Theridiidae y la posición de *Steatoda nobilis***

Se han publicado diferentes estudios taxonómicos y filogenéticos para la diversa familia Theridiidae, tanto morfológicos (Coddington, 1989; Agnarsson, 2004) como genéticos (Arnedo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016; Breitling, 2019), que sugieren que esta familia es un grupo monofilético. Sin embargo, se revela como un grupo complejo, en el que existen géneros probablemente parafiléticos.

En el detallado estudio de la familia Theridiidae publicado por Liu *et al.* (2016), empleando 5 marcadores nucleares y mitocondriales y análisis morfológicos, se presentan evidencias de que el género *Steatoda* no es monofilético, aunque está incluido en un mismo clado, la subfamilia Latrodectinae (*sensu* Agnarsson, 2004) con, al menos, especies de los géneros *Crustulina*, *Latrodectus* y *Asagena*. Esta idea es también apoyada por los análisis filogenéticos, realizados en base a secuencias del gen de la citocromo oxidasa mitocondrial I (COI), del trabajo de Breitling (2019), en el que se recogen un mayor número de especies del género *Steatoda*. Para avanzar en el conocimiento de este género y de la familia a la que pertenece, es de interés la secuenciación de diferentes marcadores para varias especies, con el objetivo de realizar un análisis genético más completo y elucidar las relaciones entre los distintos géneros y especies que la forman. La posición de *Steatoda nobilis* fue discutida por Breitling (2019), pero es necesario el empleo de secuencias de diferentes genes para confirmar esos resultados.

## **2. OBJETIVOS**

- Recopilar las citas bibliográficas de *Steatoda nobilis* que permitan reconstruir su expansión fuera de su zona de distribución originaria.
- Recopilar evidencias en la literatura de su posible impacto sobre especies u ecosistemas en las áreas en las que es alóctona. Recopilar las mismas evidencias para la Península Ibérica, a fin de valorar su adecuación para ser incluida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras.
- Secuenciar marcadores genéticos seleccionados, obtenidos de ejemplares de esta especie recogidos en muestreos de campo o cedidos por particulares e instituciones, para elucidar su posición en el árbol filogenético de la familia Theridiidae.
- Revisión de su posición en el árbol filogenético de la subfamilia Latrodectinae (familia Theridiidae) empleando como referencia secuencias publicadas en la literatura.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Especie objeto de estudio

*Steatoda nobilis* (Araneae, Theridiidae) es una especie descrita por T. Thorell en 1875 como *Lithyphantes nobilis* (Thorell, 1875).

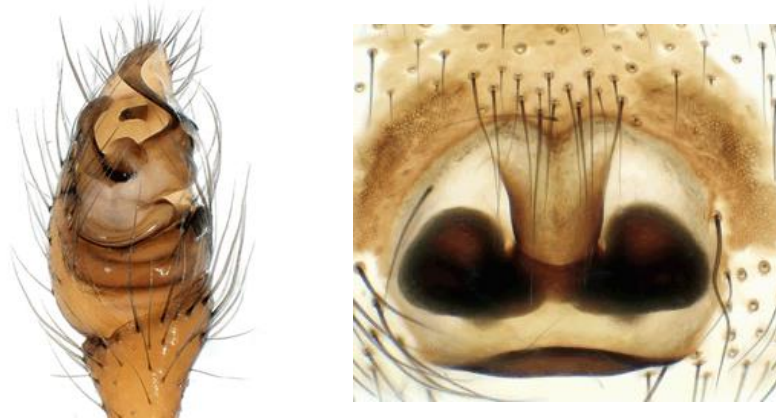
Es un animal robusto y relativamente grande. Los machos tienen una longitud corporal de 7 a 10 mm y las hembras, de 8,5 a 14 mm. Su aspecto es llamativo, y supone un buen ejemplo de la figura característica de los terídidos, con un opistosoma redondeado, voluminoso y brillante. En *S. nobilis*, éste es pardo o negro y presenta generalmente un diseño atractivo, con una media luna en su parte anterior, que habitualmente se extiende por todo el contorno del opistosoma. En la parte superior del mismo presenta una marca blanca amplia, circundada por manchas marrones con forma de paréntesis que la separan del contorno blanco. La marca blanca se puede conectar por diferentes prolongaciones al nombrado contorno claro, creando un diseño más o menos intrincado. Este diseño es más evidente en hembras jóvenes. En algunos animales o en ejemplares viejos las marcas del opistosoma pueden estar ausentes, presentando entonces el ejemplar color negro o pardo brillante. El prosoma es de color pardo rojizo a negro, y las patas son del mismo color, con tibias y tarsos habitualmente oscurecidos en su parte distal (Figura 2) (Roberts, 1996; Bee, Oxford y Smith, 2017; Nentwig *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Macho inmaduro de *Steatoda nobilis* (imagen propia).

Debido a la similitud con otras especies de su género y gran viabilidad es normalmente necesario identificar esta especie mediante un examen microscópico de la genitalia (Roberts, 1993).

El epigino de *S. nobilis* presenta un reborde en su parte inferior a modo de labio. En la parte media del surco, existe un septo o escape que divide el epigino en dos partes, relativamente ancho y de anchura homogénea en su parte inferior y media, aumentando hacia la parte superior. Las espermatecas, de color oscuro, se ven a través de la cutícula (Figura 3).

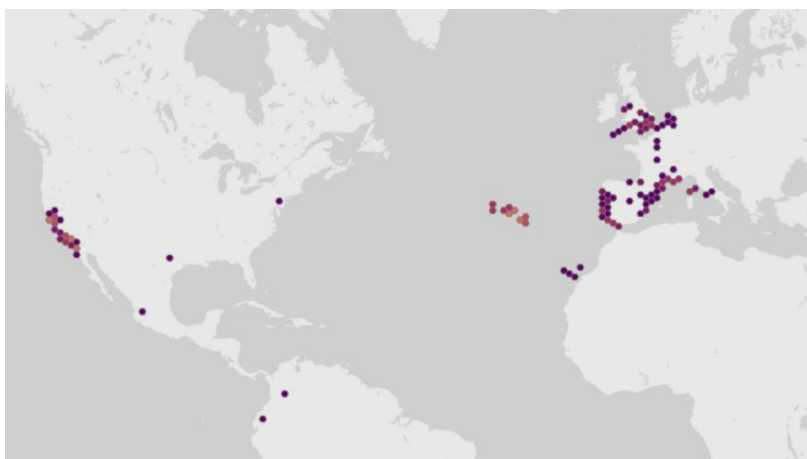


**Figura 3.** Pedipalpo del macho y epigino de la hembra de *S. nobilis* (Nentwig *et al.*, 2019)

El pedipalpo del macho presenta un émbolo espiral que se enrolla alrededor de un conductor pequeño y membranoso, sobre el que se encuentra su punta. La apófisis media del palpo del macho masculino tiene forma de gancho (Figura 3) (Roberts, 1993; Nentwig *et al.*, 2019).

La especie encuentra en general, en hábitats asociados al ser humano, como el interior de edificios, fachadas, muros de piedra etc., así como en troncos, setos y matorrales o en jardines. En zonas con clima benigno, tiende a ocupar localizaciones más naturales (Roberts, 1996; Bellman, 2011; Bee, Oxford y Smith, 2017).

*Steatoda nobilis* es originaria de Macaronesia, probablemente del archipiélago de Madeira, donde fue descrita (Thorell, 1875). Se distribuye en la actualidad por toda la Macaronesia. Actualmente ha colonizado gran parte del subcontinente europeo y está presente en las Islas Británicas. También se ha hallado en varios puntos de América, destacando la costa oeste de Norteamérica y varias áreas del norte del continente sudamericano (Gbif.org, 2017) (Figura 4). Actualmente es considerada una especie exótica introducida en las áreas en las que es alóctona, aunque diferentes autores, organizaciones, y catálogos la consideran especie exótica invasora (Gbif.org, 2017).



**Figura 4.** Distribución actual basada en las observaciones y registros disponibles en la base de datos GBIF

Es interesante indicar que se han registrado mordeduras a seres humanos de esta especie en diferentes territorios, como Reino Unido (Warrell *et al.*, 1991; Lee, 2019), Chile (Faúndez y Téllez, 2016b) o California (Vetter y Rust, 2012), si bien en todas las fuentes se indica que los efectos del veneno de *S. nobilis* no son graves en personas sanas.

### **3.2. Búsqueda de citas bibliográficas para la reconstrucción de su expansión fuera de su territorio natural y la evaluación de su impacto.**

Se evaluará su presencia y expansión en su área de origen, la Macaronesia, en base a citas bibliográficas en los archipiélagos de Madeira, Azores y Canarias.

Asimismo, se recopilarán las primeras citas, o citas relevantes, en literatura básica y específica para diferentes territorios en los que se halla actualmente esta especie, con el objetivo de determinar las fechas aproximadas de llegada y conocer el proceso de su expansión. Asimismo, se consultará, en los casos en los que sea posible, catálogos de fauna terrestre, del orden Araneae o bien de la familia Theridiidae de diferentes territorios para estimar el grado de expansión en los mismos.

Para la evaluación del impacto de esta especie en las áreas en las que es alóctona, se consultarán referencias sobre su capacidad reproductiva, adaptación al clima y dieta. Adicionalmente se emplearán los registros fotográficos disponibles en portales para naturalistas.

### **3.3. Obtención de datos para llevar a cabo análisis filogenéticos**

Para obtener muestras se recurrió a ejemplares conservados en etanol al 70 %, obtenidos entre 2015 y 2016 en muestreos de campo. Asimismo, se solicitaron muestras a particulares e instituciones con el objetivo de disponer de una amplia muestra de las poblaciones ibéricas de esta especie. A través de esta vía, se obtuvieron solo dos ejemplares conservados en etanol al 96 %, de origen ibicenco.

Ante la disponibilidad de un bajo número de muestras de *Steatoda nobilis*, se emplearon también ejemplares de *Steatoda grossa* recogidos entre 2015 y 2018. Esta especie, de distribución cosmopolita y muy común de este género, se ha empleado como referencia en diferentes estudios taxonómicos de la familia Theridiidae. Por tanto, en las bases de datos está disponible una gran cantidad de secuencias de diferentes genes de *Steatoda grossa*. Por ello se decidió su uso como especie modelo para comprobar la efectividad de los protocolos de obtención y secuenciación de los genes de interés. Las muestras empleadas, figuran en la Tabla 1.

Para la extracción de material genético se empleó el kit *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Como material de partida, se emplearon 4 patas de cada ejemplar, según lo sugerido por (Agnarsson, Maddison y Avilés, 2007) para ejemplares conservados durante largo tiempo o en etanol al 70 %. La concentración y calidad del ADN extraído se midió con un Bio-espectrofotómetro para microgota y cubeta - VWR - MySPEC Twin.

**Tabla 1.** Muestras empleadas para obtener datos filogenéticos. M: macho, H: hembra

Especie	Sexo	Localidad	Fecha	Hábitat	Col.	Código
<i>Steatoda nobilis</i>	i	A Zapateira, A Coruña	18/06/2015	Fachada de edificio	I. Delgado	SN1
<i>Steatoda nobilis</i>	M	A Zapateira, A Coruña	23/06/2015	Fachada de edificio	I. Delgado	SN2
<i>Steatoda nobilis</i>	M	A Coruña	01/11/2015	Interior de edificación	I. Delgado	SN3
<i>Steatoda nobilis</i>	H	A Coruña	12/06/2016	Parque urbano	I. Delgado	SN4
<i>Steatoda nobilis</i>	M	Menorca	12/03/2019	Interior de edificación	Bosco Febrer	N5
<i>Steatoda nobilis</i>	H	Menorca	12/03/2019	Interior de edificación	Bosco Febrer	N6
<i>Steatoda grossa</i>	H	A Coruña	22/01/2015	Vivienda	I. Delgado	SG1
<i>Steatoda grossa</i>	H	A Coruña	21/02/2015	Vivienda	I. Delgado	SG2
<i>Steatoda grossa</i>	M	A Coruña	19/06/2015	Interior de edificación	I. Delgado	SG3
<i>Steatoda grossa</i>	M	A Coruña	27/06/2015	Interior de edificación	I. Delgado	SG4
<i>Steatoda grossa</i>	M	A Zapateira, A Coruña	01/10/2015	Jardín semiurbano	I. Delgado	SG5
<i>Steatoda grossa</i>	i	A Coruña	01/11/2015	Interior de edificación	I. Delgado	SG6
<i>Steatoda grossa</i>	i	A Coruña	20/08/2018	Interior de edificación	I. Delgado	SG7
<i>Steatoda grossa</i>	i	A Coruña	06/10/2018	Interior de edificación	I. Delgado	SG8
<i>Steatoda grossa</i>	i	A Coruña	06/10/2018	Interior de edificación	I. Delgado	SG9

Para realizar el análisis filogenético se decidió el uso de los genes nucleares 18S rRNA (18S), 28S rRNA (28S), e Histona H3 (H3), y los genes mitocondriales citocromo c oxidasa subunidad I (COI), 16SrRNA (16S). Para ellos, se emplearon los pares de cebadores sugeridos en (Agnarsson, Maddison y Avilés, 2007), disponibles en la Tabla 2. Los cebadores fueron fabricados por *Isogen Life Science*. Se recibieron liofilizados y se diluyeron hasta una concentración de 100  $\mu$ M en agua ultrapura.

**Tabla 2.** Cebadores empleados para la amplificación de los genes de interés

Universal	Secuencia	Referencia	Reverso	Secuencia	Referencia	Tm (°C)
18S-4F	5'-CCAGCAGCCG CGCTAATTC-3'	(Giribet <i>et al.</i> , 1996)	9R	5'-GATCCTTCCGC AGGTTACCTAC-3'	(Giribet <i>et al.</i> , 1996)	Gradiente
28SC	5'-GGTTCGATTA GTCTTTCGCC-3'	(Whiting <i>et al.</i> , 1997)	28SO	5'-GAAACTGCTCAA AGGTTAAACGG-3'	(Whiting <i>et al.</i> , 1997)	50
H3aF	5'-ATGGCTCGTAC CAAGCAGACVGC-3'	(Colgan <i>et al.</i> , 1998)	H3aR	5'-ATATCCTTRGGC ATRATRGTGAC-3'	(Colgan <i>et al.</i> , 1998)	56
LCOI1490	5'-GGTCAACAAATC ATAAAGATATTGG-3'	(Folmer <i>et al.</i> , 1994)	C1-N- 2776	5'-GGATAATCAGAA TATCGTCGAGG-3'	(Hedin y Maddison, 2001)	44
16SF	5'-CTAAGGTAGCAT AATCA-3'	(Agnarsson, Maddison y Avilés, 2007)	16SR	5'-ATGATCATC CAATTGAT-3'	(Agnarsson, Maddison y Avilés, 2007)	47

Para amplificar dichos genes se emplearon los protocolos de temperaturas sugeridos por (Agnarsson, Maddison y Avilés, 2007). Se realizaron 34 iteraciones del siguiente ciclo: 30 s a 95°C, 45 s a la temperatura de anillamiento de los cebadores (Tabla 2), y 45 s a 72°C, comenzando con un único ciclo de 2 min a 95 °C y finalizando con otro de 10 min a 72 °C. En el caso del gen 18S se realizaron 20 ciclos en los que se estableció un gradiente para la temperatura de anillamiento desde 58 °C hasta 45 °C, seguidos por 20 ciclos a 45 °C. Las mezclas de PCR, por muestra, contenían, 12,5



$\mu\text{L}$  de *NZYTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl<sub>2</sub>* de NZYtech, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores (universal y reverso) y 10,3  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura.

En una serie de reacciones de PCR adicionales únicamente para el gen COI, se siguió el protocolo de temperaturas descrito, empleando las temperaturas de anillamiento de 44 °C (Agnarsson, Maddison y Avilés, 2007), y de 56 y 58 °C, las sugeridas por el fabricante de los cebadores como temperaturas de anillamiento para cada uno de ellos. Asimismo, para cada temperatura se emplearon tres concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  diferentes: 1, 2 y 4 mM, variando los volúmenes de la disolución de  $\text{MgCl}_2$  comercial y de agua ultrapura. Posteriormente se ensayaron también tres concentraciones adicionales de  $\text{MgCl}_2$ : 5, 7 y 10 mM. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador T100 de Bio-Rad.

Para comprobar la obtención de los productos de PCR se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa (NZYtech) al 1,5 % en peso.

Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron en los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña. Los productos de PCR se purificaron enzimáticamente. La secuenciación se llevó a cabo en un analizador genético 3130xl de Applied Biosystems.

Para los análisis filogenéticos de la subfamilia Latrodectinae se emplearon secuencias del gen COI obtenidas de la base *Nucleotide* del *National Center for Biotechnology Information* (National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine). Asimismo, se emplearon secuencias de este gen de *Steatoda nobilis* y *Steatoda paykulliana* disponibles en la base de datos The Barcode of Life Data System (Ratnasingham y Hebert, 2007). Los números de acceso de las secuencias empleadas figuran la Tabla 4, Anexo 1 (página 25).

### **3.4. Análisis de datos filogenéticos**

El alineamiento de las secuencias se realizó empleando el software MUSCLE (Edgar, 2004), disponible en el paquete de análisis de datos genéticos y moleculares MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Posteriormente se halló el codón de inicio de la traducción a través de los datos complementarios proporcionados por la base de datos NCBI para las secuencias empleadas, y se eliminaron los fragmentos de las secuencias anteriores a la misma. Se halló la longitud codificante de los fragmentos y se eliminaron los fragmentos posteriores al final de dicha parte codificante.

Como paso previo al análisis filogenético, se realizó una estima del parámetro de forma para la distribución gamma discreta, empleando el paquete de análisis MEGA X. Posteriormente, y empleando los valores obtenidos, se realizó un análisis filogenético mediante el método *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987), obteniendo un árbol producto de 1000 réplicas de *bootstrap*. El árbol obtenido y las secuencias alineadas se emplearon para poner a prueba la hipótesis de la existencia de un reloj molecular, es decir, la existencia de tasas de evolución constante entre las diferentes secuencias

empleadas. Para ello se usó el análisis de reloj molecular mediante máxima verosimilitud del paquete MEGA X.

Además del árbol obtenido por el método *Neighbor-Joining*, se construyeron árboles mediante el método de máxima verosimilitud (Tamura y Nei, 1993) a través del paquete MEGA X, obteniendo un árbol consenso con 1000 réplicas de *bootstrap*; y según el método de máxima verosimilitud mediante el software PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) empleando el software de selección automática del modelo de sustitución SMS (*Smart Model Selection*) (Lefort, Longueville y Gascuel, 2017), con prueba estadística de soporte para las ramas del árbol *approximate likelihood ratio test* (aLRT) (Hordijk y Gascuel, 2005).

En todos los casos se consideró aceptable un apoyo estadístico superior al 70 %, pero en alguno de los árboles obtenidos se representaron ramas con un apoyo superior al 65 % para mayor claridad.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Reconstrucción de su expansión fuera de su territorio natural

#### Área de origen

La especie fue descrita como *Lithyphantes nobilis* por T. Thorell en 1875, en base a un macho adulto y una hembra inmadura. En la descripción indica escuetamente que se halla en la Isla de Madeira.

Diferentes citas posteriores tienen interés por su proximidad a la fecha de descripción (Warburton, 1892; Kulczynski, 1899), e indican su presencia en las islas de Madeira y de Porto Santo. Recientemente, aparece en catálogos de las islas de Madeira, Porto Santo y Selvagens (Borges *et al.*, 2008; Cardoso y Henriques, 2009; Crespo *et al.*, 2009).

Pickard-Cambridge, 1907 indica que halló esta especie en un cargamento de plátanos proveniente de las Islas Canarias, quizás en la primera mención a su presencia a este territorio. A pesar de que diferentes fuentes la citan en Canarias (p.ej. Wunderlich, 1987), e incluso como nativa de estas islas (Roberts, 1993; Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012), diferentes catálogos publicados (Izquierdo *et al.*, 2004; Rodríguez Luengo, Wong y Pagad, 2018) indican que la especie es probablemente introducida o introducida en el archipiélago. Aunque históricamente se citaba en Lanzarote y Tenerife, actualmente se puede hallar en todas las islas (Izquierdo *et al.*, 2004).

En las islas Azores es probablemente introducida. Como tal la listan publicaciones recientes y catálogos faunísticos de este archipiélago (Schmidt, 1990; Borges *et al.*, 2008; Lissner y Borges, 2011).

## Expansión por Europa y Oriente Medio

La primera cita en Europa de esta especie fue en Reino Unido, en Torquay (Pickard-Cambridge, 1879), como *Steatoda clarkii*. Pickard-Cambridge (1879), sin embargo, indica que el ejemplar en que se basa la cita le fue cedido por el reverendo Hamlet Clark y que estaba mal etiquetado y olvidado. Algunos autores consideran esta cita como dudosa (Bauer *et al.*, 2019). En todo caso, Jackson (1907) describe poco más tarde un ejemplar hallado en Hastings. El mismo año, Pickard-Cambridge (1907) reporta otro hallazgo de esta especie en territorio británico, en un cargamento de plátanos procedentes de las Islas Canarias.

Trabajos más recientes indican que la especie está actualmente extendida por gran parte de la isla de Gran Bretaña (Roberts, 1993; Snazell y Jones, 1993; Bee, Oxford y Smith, 2017). En los mapas de distribución basados en el Spider Recording Scheme de la *British Arachnological Society* figuran abundantes poblaciones en el tercio sur de la isla, disminuyendo hacia el norte (Bee, Oxford y Smith, 2017; Lee, 2019).

La especie ha sido citada por primera vez en Irlanda recientemente (Nolan, 1999) y se recoge su presencia y expansión en estudios recientes (Dugon *et al.*, 2017; J.P. Dunbar *et al.*, 2018; John P. Dunbar *et al.*, 2018).

Es posible que existieran poblaciones en España a finales del siglo XIX. En una comunicación de Pickard-Cambridge, se indica el examen de ejemplares provenientes de Madeira y España (Pickard-Cambridge, 1899). Aunque puede referirse a las islas Canarias, es posible también que se trate de un ejemplare recogido en la Península.

Melic, 1994 aporta las “primeras citas concretas para España peninsular”, y se cita como especie presente en Portugal en algunos trabajos de los años 1990 (Snazell y Jones, 1993). Desde entonces se ha documentado su presencia en gran parte de España y de la Península (Ferrández *et al.*, 2006; Cardoso y Morano, 2010; Martínez Sabarís, 2016; Morano *et al.*, 2019).

En Italia fue hallada por primera vez en 2004 (Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012), y se recoge su presencia en trabajos y catálogos publicados recientemente. (Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012; Pantini, Sassu y Serra, 2013; Pantini y Isaia, 2018).

Su presencia actual en Francia se recoge en inventarios (Muséum national d'Histoire Naturelle, 2019). La primera cita en este territorio data de 1998 (Ledoux, Jean-Claude Raphaël, 1998). Con esta, también se documenta su presencia en el norte de África y en Córcega.

En Alemania, se registra su presencia a mediados del siglo XX (Schmidt, 1954, 1956), aunque parece improbable que se establecieran poblaciones derivadas de esas introducciones accidentales (Bauer *et al.*, 2019). En trabajos recientes (Arachnologische Gesellschaft, 2019; Bauer *et al.*, 2019) se recogen citas dispersas por el país. Otros trabajos recogen citas para el noroeste de Europa (Van Keer, 2010).

En 2013 se registra su presencia en Irán (Zamani *et al.*, 2015), en su primera cita confirmada en territorio asiático.

Empleando el portal de citas de biodiversidad GBIF, que compila datos bibliográficos y de portales fotográficos se hallan registros de la especie en Portugal continental, Madeira y Azores, España continental, Islas Canarias, Francia (incluyendo Córcega), Reino Unido, Países Bajos, Italia y Bélgica (Gbif.org, 2017).

### **Expansión por América**

El primer hallazgo de *S. nobilis* en América se produce en California (Vetter y Rust, 2012). Actualmente parece estar extendida por California (Vetter, 2014). En la base de datos GBIF de (Gbif.org, 2017) se recoge su presencia en Texas y en Nueva York, pero estas observaciones se presentan dudosas. En la base de datos GBIF figuran citas en México, en la Baja California, próximas a la distribución confirmada en la California estadounidense. En la base de datos “naturalista.mx” figuran citas al sur de esta área, en Guadalajara o México DC (Naturalista CONABIO, sin fecha) que no pueden asignarse a *Steatoda nobilis* (comprobado personalmente a través de las imágenes disponibles de estas citas).

En Sudamérica se ha hallado por primera vez en Chile, en 2014, en su primera cita georeferenciada del hemisferio Sur (Taucare-Ríos, Mardones y Zúñiga-Reinoso, 2016), y posteriormente en Ecuador y Colombia, en 2018 (Faúndez *et al.*, 2018). Su presencia en Chile ha recibido especial atención (Faúndez y Téllez, 2016a), llegándose a registrar una mordedura (Faúndez y Téllez, 2016b). En estas fuentes se indica el hallazgo de esta especie en hábitats humanizados.

### **4.2. Evaluación de su impacto sobre especies y ecosistemas en las áreas en las que es alóctona**

Existen diferentes estudios sobre su avance en territorios de clima mediterráneo como Italia (Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012), California (Vetter y Rust, 2012), o clima atlántico, como Irlanda (Dugon *et al.*, 2017; J.P. Dunbar *et al.*, 2018) que sugieren que la especie se adapta bien a diversos climas, en especial a hábitats humanizados. Además, existen evidencias de que se reproduce con facilidad y de forma prolífica durante todo el ciclo, a excepción de los meses más fríos, gracias a la capacidad de las hembras de almacenar el esperma de los machos largo tiempo tras un único encuentro con ellos (Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012; Dugon *et al.*, 2017).

En la literatura se ha registrado la depredación de diferentes invertebrados autóctonos en áreas en las que ha sido introducida (Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012; Vetter y Rust, 2012; Dugon *et al.*, 2017) y un examen de varias fotografías en portales en línea para naturalistas sugiere que ocurre lo mismo en el territorio ibérico, donde se ha registrado el consumo de pequeños himenópteros (Valverde, 2008), coleópteros (Collado, 2008), dípteros (Antúnez, 2015a), incluso algunos invertebrados depredadores de talla comparable, como mantodeos (ninfa de *Mantis religiosa* (Linnaeus, 1758)) (Antúnez, 2015b), otros arácnidos (Antúnez, 2016) o *Vespa velutina* (Lepelletier, 1836) (Antúnez, 2015c).

Esta evidencia fotográfica es soportada por diferentes observaciones personales realizadas en Galicia y Asturias, donde se registró el consumo de coleópteros, himenópteros, hemípteros y lepidópteros nocturnos de varias tallas (Figura 5).



**Figura 5.** *Steatoda nobilis* en *Samalea*, Asturias, con varias presas, a saber, un coleóptero, un pequeño himenóptero y varios hemípteros

También existen registros de depredación extremadamente interesantes sobre *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823) en Irlanda (John P. Dunbar *et al.*, 2018) y evidencia fotográfica de la depredación sobre *Podarcis* sp. en España (Aroca, 2012).

En diferentes fuentes se indica que su modo de entrada en los territorios en los que es introducida es a través de cargamentos de plátanos (Jackson, 1907; Pickard-Cambridge, 1907; Schmidt, 1956; Roberts, 1993; Snazell y Jones, 1993; Kulczycki, Legittimo y Simeon, 2012; Vetter y Rust, 2012).

#### **4.3. Obtención de datos para llevar a cabo el análisis filogenético**

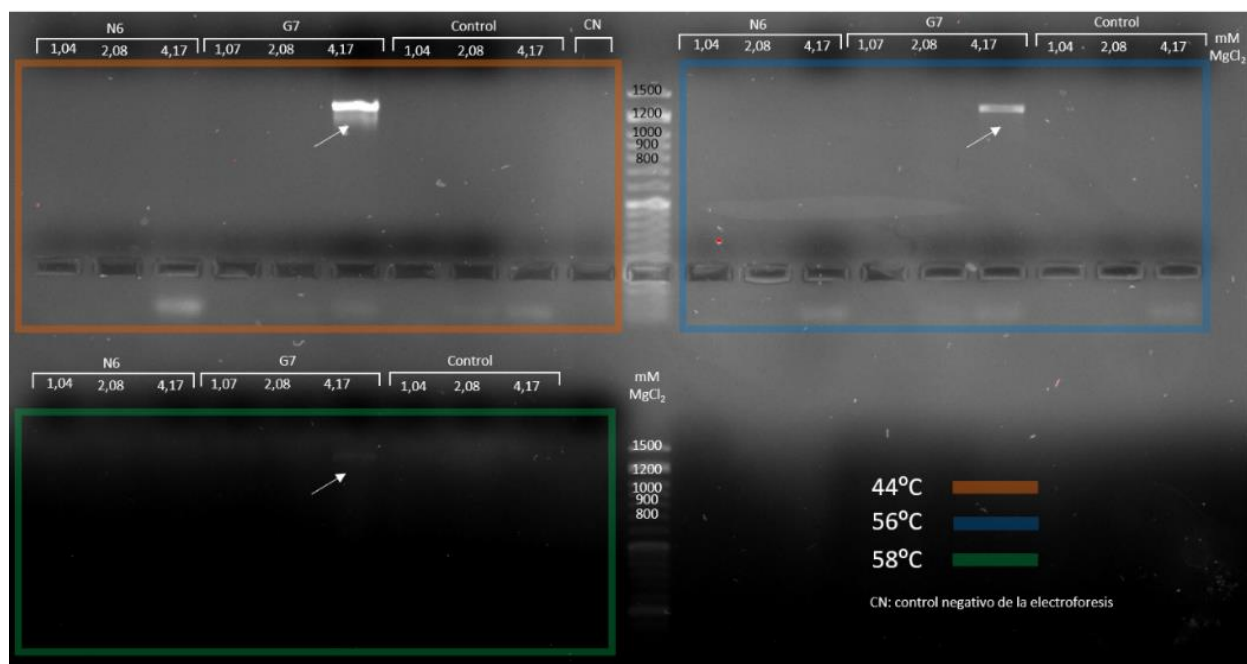
En el proceso de extracción de ADN se descartó la muestra G8 (Tabla 1), por hallarse en mal estado. Para el resto de muestras se obtuvo la concentración y diferentes parámetros de calidad y pureza de ADN genómico extraído (Tabla 5, Anexo 2). En rojo figuran los valores que no superan el umbral recomendable de calidad (Thermo Fischer, sin fecha).

Inicialmente se realizaron reacciones de PCR para todos los extractos y todos los genes. Para estas pruebas no se obtuvo ningún producto de PCR.

Posteriormente, se seleccionaron las dos muestras de mejor calidad: G7 y N6, que figuran en azul en la Tabla 5, Anexo 2, con las que siguieron los protocolos descritos a diferentes temperaturas y concentraciones de  $MgCl_2$  únicamente para el gen COI.

No se obtuvieron productos de PCR en ninguna ocasión para la muestra N6, y en el caso de la muestra G7, correspondiente a *Steatoda grossa*, se obtuvieron productos únicamente a una concentración de  $MgCl_2$  de 4,17 mM y empleando como temperaturas de anillamiento 44, 56 y 58°C. Se observó la obtención de productos de PCR para las tres temperaturas, obteniéndose una mayor concentración a la menor de

las tres (Figura 6). A pesar del aparente éxito de esta reacción, no se obtuvo una secuenciación satisfactoria del producto de PCR descrito.



**Figura 6.** Resultado de la electroforesis de los productos de PCR de las muestras N6 y G7 a tres temperaturas: 44, 56 y 58°C, y a tres concentraciones de  $MgCl_2$ : 1,04, 2,08 y 4,17 mM.

#### 4.4. Análisis de datos filogenéticos

Se consiguieron alinear las 42 secuencias empleadas. El resultado del alineamiento de los fragmentos de la secuencia codificante, se proporciona como archivo digital, en formato FASTA, en el CD adjunto a la presente memoria, con el nombre *DelgadoFerreiro\_Ignacio\_TFG\_2019\_alineamiento\_02de3.fas*

El valor hallado del parámetro de forma de la distribución gamma discreta es de 0,2599. Se obtienen 4 árboles filogenéticos, según los métodos estadísticos descritos (Tabla 3). Todos ellos muestran ramas con apoyos superiores al 70 %.

**Tabla 3.** Relación de árboles filogenéticos obtenidos

Método (Software)	Código	Figura	Página
<i>Neighbor-Joining</i> (MEGA X)	NJ	(Figura 7, Anexo 3)	27
Máxima verosimilitud (MEGA X)	ML-MEGA	(Figura 8, Anexo 3)	28
Máxima verosimilitud (PhyML 3.0) con prueba de apoyo tipo aLRT	ML-PhyML-aLRT	(Figura 9, Anexo 3)	29

## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. Reconstrucción de su expansión fuera de su territorio natural**

Las referencias al origen de esta especie la fijan en el archipiélago de Madeira, o bien en Canarias y Madeira. Las diferentes fuentes consultadas están de acuerdo en que es una especie introducida en las islas Azores.

Su presencia en Europa data de 1879, aunque esta fecha parece ser dudosa y diferentes fuentes indican 1907 como año de entrada en el Reino Unido. Aunque no está claro que la especie estuviera presente otras áreas de Europa en esas fechas, parece probable que el continuo tránsito de naves entre España continental y las Islas Canarias, y entre Portugal continental y el archipiélago de Madeira, propiciara una introducción por esta vía en el continente.

Se desconoce si se produjo una expansión a partir de estos puntos por el resto de Europa continental o la distribución actual es producto de sucesivos eventos de introducción. Para averiguarlo, serían necesarios estudios genéticos de las poblaciones europeas y del modo de dispersión de esta especie.

La distribución actual sugiere que la Península Ibérica, junto con Reino Unido, pueden haber sido los puntos de introducción en Europa más relevantes, desde los cuales se produjo una expansión creciente en el subcontinente.

En Norteamérica, su distribución localizada podría significar un número discreto o un único evento de introducción, seguido por una expansión local, mientras que en Sudamérica su colonización se adivina más compleja, al haberse hallado ejemplares en localizaciones dispersas y asociados a hábitats humanizados.

### **5.2. Evaluación de su impacto sobre especies y ecosistemas en las áreas en las que es alóctona**

Los datos disponibles, si bien no permiten construir una imagen completa del impacto global de esta especie en España, pueden considerarse preocupantes. Las evidencias de interacción con especies autóctonas en territorios en los que es introducida fuera de la Península Ibérica son relevantes, y abundantes evidencias fotográficas indican que interacciones de naturaleza similar ocurren en España. Un inventario detallado de las poblaciones en España y un estudio de su dieta, o del solapamiento de su nicho con el de otras especies autóctonas con posible desplazamiento de las mismas, reforzarían la candidatura de esta especie a ser introducida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras.

### **5.3. Obtención de datos para llevar a cabo el análisis filogenético**

La obtención de marcadores genéticos para la especie objeto de este estudio, *Steatoda nobilis*, fue insatisfactoria. Esto se puede deber a varios factores. Una de las hipótesis es la falta de correspondencia entre los cebadores y las secuencias objetivo. Sin embargo, los cebadores empleados han sido usados ampliamente en diferentes grupos de Araneae, Arthropoda o Animalia, demostrando su eficacia.

Debe examinarse la posibilidad de un error durante el procedimiento experimental, como un proceso de contaminación o una incorrecta resuspensión de los cebadores liofilizados, con agitación insuficiente, que podría explicar los resultados irregulares.

A la vista de los resultados, se ve necesario un proceso de optimización minucioso, incluyendo etapas como el diseño de los cebadores o la exploración de un amplio rango de variables experimentales.

#### 5.4. Análisis de datos filogenéticos

Los resultados obtenidos para la subfamilia Latrodectinae tienen un alcance limitado, al disponer de un único marcador genético como criterio para establecer las filogenias. A pesar de eso, permiten establecer relaciones filogenéticas entre algunas de las especies estudiadas. Los árboles "NJ" (Figura 7, Anexo 3) y "ML-MEGA" (Figura 8, Anexo 3), permiten establecer las siguientes agrupaciones:

- a) Un clado formado por las especies del género *Latrodectus*, (clado *mactans*, *sensu* Garb, González y Gillespie, 2004, que contiene todas las especies estudiadas a excepción de *Latrodectus geometricus* y *Latrodectus rhodesiensis*. Estos árboles permiten reconstruir las relaciones existentes entre alguna de las especies que los forman, que concuerdan en gran medida con lo publicado en Garb, González y Gillespie, 2004.
- b) Un clado formado por *Latrodectus geometricus* y *Latrodectus rhodesiensis* (clado *geometricus*, *sensu* Garb, González y Gillespie, 2004), que parece tener una posición basal con respecto al clado *mactans*, y estar quizás relacionado con especies de *Crustulina* o *Steatoda*
- c) Un clado formado por *Steatoda bipunctata*, *Steatoda borealis* y *Steatoda hespera*, en el que la primera de ellas tendría una posición basal con respecto a las otras dos.

En el árbol "ML-PhyML-aLTR" (Figura 9, Anexo 3) también se recogen estas relaciones, y permite adicionalmente establecer la existencia de los siguientes grupos:

- a) Un clado, con posición basal con respecto al resto de los Latrodectinae, formado por *Steatoda nobilis*, *Steatoda paykulliana* y *Steatoda capensis*.
- b) Un grupo formado por *Steatoda castanea*, como grupo hermano del grupo *Steatoda* (parte), *Crustulina*, *Asagena* y *Latrodectus*.
- c) Una agrupación de las dos especies del género *Asagena*, y de *Steatoda washona* con el clado *mactans*, *sensu* Garb, González y Gillespie, 2004.
- d) Un clado formado por el resto de especies de *Steatoda* (*S. grossa*, *S. hespera*, *S. borealis*, *S. bipunctata*, *S. triangulosa*, *S. albomaculata*), el clado *geometricus* y las especies del género *Crustulina*.
- e) Dentro de este, un clado formado por *Steatoda hespera*, *Steatoda borealis* y *Steatoda bipunctata*, pero con menor resolución que en los anteriores árboles obtenidos
- f) También dentro de este, el clado *geometricus*, relacionado con *S. triangulosa* y otras especies del género *Steatoda* y *Crustulina*.



El uso de varios métodos de análisis estadístico con resultados concordantes permite establecer una serie de relaciones entre los géneros y especies de la subfamilia Latrodectinae. Las relaciones entre los miembros del género *Latrodectus* son consistentes con las publicadas, y parece necesaria la revisión del clado *geometricus*. Por otra parte, las relaciones los géneros *Asagena*, *Crustulina* y *Steatoda* parecen presentar mayor complejidad.

En Breitling, 2019 se propone que *Crustulina* y *Asagena* son probablemente sinónimos de *Steatoda*, en base a análisis de máxima verosimilitud basados en el gen COI similares a los presentados en este trabajo. Aunque parece que existen evidencias en este sentido, al menos para *Crustulina*, a la vista de la complejidad de esta subfamilia y las limitaciones del uso de un único marcador genético, se ve necesario un análisis más completo para proponer modificaciones taxonómicas de tal calado en esta subfamilia, incluyendo un mayor número de marcadores e incluso evidencias morfológicas y comportamentales.

Sin embargo, a pesar de las limitaciones, el presente análisis permite conocer algunas relaciones interesantes, como la agrupación de *Steatoda nobilis*, *Steatoda paykulliana* y *Steatoda capensis*, que constituirían uno de los grupos basales dentro de la subfamilia Latrodectinae, la asociación de *S. hespera*, *S. borealis* y *S. bipunctata*, o la aparente proximidad del clado *geometricus* con algunas especies del género *Steatoda*.

## 6. CONCLUSIONES

### Conclusiones

- La revisión de la expansión de *Steatoda nobilis* fuera de su área de origen revela una historia de introducciones accidentales compleja. Aunque se conoce la presencia actual de la especie en Europa, no están caracterizadas las vías de expansión en este territorio. Se desconoce el origen de las poblaciones americanas, pero existen poblaciones en el sudeste de Estados Unidos y varios puntos de Sudamérica, que pueden indicar uno o varios eventos de introducción accidental.
- Las evidencias de interacción de *Steatoda nobilis* con las especies autóctonas y el medio ambiente en las áreas en las que es introducida, dibujan una situación preocupante, ya que depreda sobre fauna autóctona y se adapta a ambientes muy diversos. Los datos existentes para España indican que la especie puede causar un fuerte impacto en la fauna autóctona y que es necesario valorar que sea incluida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras.
- No fue posible la secuenciación de los genes seleccionados para *Steatoda nobilis*, posiblemente debido a algún factor experimental. Es necesario un proceso minucioso de optimización experimental para obtener las condiciones adecuadas para llegar a aislar y secuenciar los genes deseados.
- Los trabajos publicados y el presente análisis indican que la subfamilia Latrodectinae (familia Theridiidae) es compleja, y que es posible que en ella

existan géneros polifiléticos. Existen evidencias de que *Steatoda nobilis* es próxima a *Steatoda paykulliana* y *Steatoda capensis*, y que juntas constituyen uno de los grupos basales de la subfamilia.

- Ante la complejidad hallada en esta subfamilia parece necesario un estudio más detallado, empleando diferentes marcadores genéticos y evidencias morfológicas y comportamentales.

### Conclusiones

- A revisión da expansión de *Steatoda nobilis* fóra da súa ñarea de orixe revela unha historia de introduccións accidentais complexa. Aínda que se coñece a súa presenza actual en Europa, non están as vías de expansión neste territorio. Descoñécese a orixe das poboacións americanas, pero existen poboacións no sueste de Estados Unidos e varios puntos de Suramérica que poden indicar un ou varios puntos de introdución accidental.
- As evidencias de interacción de *Steatoda nobilis* coas especies autóctonas e o medio ambiente nas áreas nas que é introducida, debuxan unha situación preocupante, xa que depreda sobre fauna autóctona e se adapta a ambientes moi diversos. Os datos existentes para España indican que a especie pode causar un forte impacto na fauna autóctona e que é necesario valorar que sexa incluída no Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras.
- Non foi posible a secuenciación dos xenos seleccionados para *Steatoda nobilis*, posiblemente debido a algún factor experimental. É necesario un proceso minucioso de optimización experimental para obter as condicións adecuadas para chegar a illar e secuenciar os xenos desexados.
- Os traballos publicados e a análise indican que a subfamilia Latrodectinae (familia Theridiidae) é complexa, e que é posible que nela existan xéneros polifiléticos. Existen evidencias de que *Steatoda nobilis* é próxima a *Steatoda paykulliana* e a *Steatoda capensis*, e que xuntas constitúan un dos grupos basais da subfamilia.
- Ante a complexidade achada nesta subfamilia parece necesario un estudo máis detallado, empregando diferentes marcadores xenéticos e evidencias morfolóxicas e comportamentales.

### Conclusions

- The revision of the expansion of *Steatoda nobilis* outside its original area reveals a complex history of accidental introductions. Although the current presence of the species in Europe is known, the expansion paths are not yet characterized. The origin of the American populations is unknown, but there are populations in South-West USA and several locations of South America, that might indicate one or several accidental introduction events.
- The evidences of interaction of *Steatoda nobilis* with indigenous species and the environment in the areas in which it is introduced, illustrate a worrying situation as it preys on indigenous fauna and can adapt to very diverse environments. The existing data for Spain indicates that the species can cause a great impact on the

indigenous fauna and that it is necessary to evaluate if it should be included in the *Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras*.

- It was not possible to sequence the selected genes for *Steatoda nobilis*, possibly due to some experimental factor. A thorough experimental optimization process would be necessary to obtain the adequate conditions to isolate and sequence the desired genes.
- The published works and the present analysis indicate that the subfamily Latrodectinae (family Theridiidae) is complex and it is possible that polyphyletic genera exist within it. Evidences exist that *Steatoda nobilis* is close to *Steatoda paykulliana* and *Steatoda capensis*, and that together they constitute one of the basal groups of the subfamily.
- In the face of the complexity found in this subfamily a more detailed study appears to be necessary, using different genetic markers and different morphological and behavioral evidences.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agnarsson, I. (2004) Morphological phylogeny of cobweb spiders and their relatives (Araneae, Araneoidea, Theridiidae), *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141, pp. 447-626.
- Agnarsson, I., Maddison, W. P. y Avilés, L. (2007) The phylogeny of the social Anelosimus spiders ( Araneae: Theridiidae ) inferred from six molecular loci and morphology, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, pp. 833-851. doi: 10.1016/j.ympev.2006.09.011.
- Antúnez, J. (2015a) *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875), *Biodiversidade Ameazada Galicia-Norte de Portugal*. Disponible en: <http://biodiversidade.eu/avistamento/steatoda-sp-sundevall-1833--9/> (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Antúnez, J. (2015b) *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875), *Biodiversidade Ameazada Galicia-Norte de Portugal*. Disponible en: <http://biodiversidade.eu/avistamento/steatoda-sp-sundevall-1833--3/> (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Antúnez, J. (2015c) *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875), *Biodiversidade Ameazada Galicia-Norte de Portugal*. Disponible en: <http://biodiversidade.eu/avistamento/steatoda-sp-sundevall-1833-7/> (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Antúnez, J. (2016) *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875), *Biodiversidade Ameazada Galicia-Norte de Portugal*. Disponible en: <http://biodiversidade.eu/avistamento/steatoda-sp-sundevall-1833--6/> (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Arachnologische Gesellschaft (2019) *Steatoda nobilis*, *Atlas of the European Arachnids*. Disponible en: [https://atlas.arages.de/species/1899#species\\_result](https://atlas.arages.de/species/1899#species_result).
- Arnedo, M. A. et al. (2004) From a comb to a tree: phylogenetic relationships of the comb-footed spiders (Araneae, Theridiidae) inferred from nuclear and mitochondrial genes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, pp. 225-245. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00261-6.
- Aroca, M. (2012) *Steatoda* sp. - 342234, *Biodiversidad Virtual*. Disponible en: <https://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Steatoda-sp.-img342234.html> (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Bauer, T. et al. (2019) *Steatoda nobilis*, a false widow on the rise: a synthesis of past and current distribution trends, *NeoBiota*, 42, pp. 19-43. doi: 10.3897/neobiota.42.31582.
- Bee, L., Oxford, G. y Smith, H. (2017) *Britain's spiders. A field guide*. Hampshire: Princeton University Press.
- Bellman, H. (2011) *Nueva guía de campo de arácnidos de Europa*. Barcelona: Ediciones Omega S. A.
- Borges, P. A. V et al. (2008) *A List of the Terrestrial Fungi, Flora and Fauna of Madeira and Selvagens archipelagos*. Editado por F. and A. do H. Direcção Regional do Ambiente da Madeira and Universidade dos Açores.
- Breitling, R. (2019) Barcode taxonomy at the genus level, *Ecologica Montenegrina*, 21, pp. 17-37.
- Cardoso, P. y Henriques, S. (2009) Spiders (Araneae) from Porto Santo (Madeira, Portugal): Additions to the current knowledge, *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 45, pp. 471-475.
- Cardoso, P. y Morano, E. (2010) The Iberian spider checklist (Araneae), *Zootaxa*, 2495, pp. 1-52. doi: 10.11646/zootaxa.2495.1.1.
- Coddington, J. A. (1989) Spinneret silk spigot morphology: evidence for the monophyly of orbweaving spiders, Cyrtophorinae (Araneae), and the group Theridiidae plus Nesticidae, *The Journal of Arachnology*, 17, pp. 71-95.
- Colgan, D. J. et al. (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution, *Australian Journal of Zoology*, 46, pp. 419-437. doi: 10.1071/ZO98048.
- Collado, L. (2008) *Steatoda nobilis* - 38825, *Biodiversidad Virtual*. Disponible en:

<https://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Steatoda-nobilis-img38825.html> (Accedido: 11 de julio de 2019).

- Comisión Europea - Joint Research Centre (2012) *EASIN Catalogue of alien species*. Disponible en: <https://easin.jrc.ec.europa.eu/easin/Catalogue> (Accedido: 12 de julio de 2019).
- Crespo, L. *et al.* (2009) Spiders (Arachnida: Araneae) from the Selvagens Islands: additions to the current knowledge, *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 45, pp. 343-348.
- Dugon, M. *et al.* (2017) Occurrence , reproductive rate and identification of the non-native Noble false widow spider *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) in Ireland, *Biology & Environment Proceedings of the Royal Irish Academy*, (77-89). doi: 10.3318/BIOE.2017.11.
- Dunbar, John P. *et al.* (2018) Biting off more than one can chew: first record of the non-native Noble false widow spider *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) feeding on the native Viviparous lizard *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823), *Biology & Environment Proceedings of the Royal Irish Academy* , 118B(1), pp. 45-48. doi: 10.3318/bioe.2018.05.
- Dunbar, J.P. *et al.* (2018) New Irish record for *Steatoda triangulosa* (Walckenaer, 1802), and new county records for *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875), *Steatoda bipunctata* (Linnaeus, 1758) and *Steatoda grossa* (C.L. Koch, 1838)., *The Irish Naturalists' Journal*, 36(1), pp. 39-43.
- Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acid Research*, 32(5), pp. 1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Faúndez, E. I. *et al.* (2018) Nuevos registros de *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae) de Sudamérica, *Revista Ibérica de Aracnología*, 33, pp. 52-54.
- Faúndez, E. I. y Téllez, F. (2016a) Consideraciones sobre *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) en Chile, *Biodiversity and Natural History*, 2(1), pp. 13-15.
- Faúndez, E. I. y Téllez, F. (2016b) Primer registro de una mordedura de *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Arachnida: Araneae: Theridiidae) en Chile., *Archivos Entomológicos*, 15, pp. 237-240.
- Ferrández, M. A. *et al.* (2006) Catálogo de las arañas (Araneae) de la Comunidad de Madrid, *Graellsia*, 62(número extraordinario), pp. 53-90. doi: 10.3989/graellsia.2006.v62.iExtra.112.
- Folmer, O. *et al.* (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), pp. 294-299.
- Garb, J. E., González, A. y Gillespie, R. G. (2004) The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): phylogeny, biogeography, and invasion history, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, pp. 1127-1142. doi: 10.1016/j.ympev.2003.10.012.
- Gbif.org (2017) *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875). Disponible en: <https://www.gbif.org/es/species/2157203> (Accedido: 12 de julio de 2019).
- Giribet, G. *et al.* (1996) First Molecular Evidence Arthropoda Clade for the Existence of a Tardigrada + Arthropoda Clade, *Molecular Biology and Evolution*, 13(1), pp. 76-84.
- Guindon, S. *et al.* (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology*, 59(3), pp. 307-321.
- Hedin, M. C. y Maddison, W. P. (2001) A Combined Molecular Approach to Phylogeny of the Jumping Spider Subfamily Dendryphantinae ( Araneae: Salticidae ), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(3), pp. 386-403. doi: 10.1006/mpev.2000.0883.
- Hordijk, W. y Gascuel, O. (2005) Improving the efficiency of SPR moves in phylogenetic tree search methods based on maximum likelihood, *Bioinformatics*, 21(24), pp. 4338-4347. doi: 10.1093/bioinformatics/bti713.
- Izquierdo, I. *et al.* (eds.) (2004) *Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres)*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias.

- Jackson, R. (1907) On some Rare Arachnids captured during 1906, *Annual Report and Proceedings of the Chester Society of Natural Science, Literature and Art*, 6(1), pp. 1-8.
- Van Keer, K. (2010) An update on the verified reports of imported spiders (Araneae) from Belgium, *Nieuwsbrief Belgische Arachnologische Vereniging*, 25(3), pp. 210-214.
- Kulczycki, A., Legittimo, C. M. y Simeon, E. (2012) New records of *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) (Araneae, Theridiidae), an introduced species on the Italian mainland and in Sardinia, *Bulletin of the British Arachnological Society*, 15(8), pp. 269-272.
- Kulczynski, V. (1899) Arachnoidea operâ Rev. E. Schmidt collecta in insulis Maderianis et in insulis Selvages dictis., *Rozprawy Akademii Umiejetnosei*, 36, pp. 319-461.
- Kumar, S. *et al.* (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35(May), pp. 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Ledoux, Jean-Claude Raphaël, B. (1998) *Araignées de la réserve naturelle du Mas Larrieu (Argelès, Pyrénées Orientales)*. Perpignan: L'Office pour les insectes et leur environnement de Languedoc-Roussillon.
- Lee, B. (2019) *Summary for Steatoda nobilis (Araneae), Spider and Harvestman Recording Scheme website*. Disponible en: <http://srs.britishspiders.org.uk/portal.php/p/Summary/s/Steatoda+nobilis> (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Lefort, V., Longueville, J. y Gascuel, O. (2017) SMS: Smart Model Selection in PhyML, *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), pp. 2422-2424. doi: 10.1093/molbev/msx149.
- Lissner, J. y Borges, P. (2011) *The Spiders of the Azores Images and Species Descriptions*. Disponible en: <http://www.jorgenlissner.dk/azoreanspiders.aspx> (Accedido: 12 de julio de 2019).
- Liu, J. *et al.* (2016) A revised and dated phylogeny of cobweb spiders (Araneae, Araneoidea, Theridiidae): A predatory Cretaceous lineage diversifying in the era of the ants (Hymenoptera, Formicidae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Elsevier Inc., 94, pp. 658-675. doi: 10.1016/j.ympev.2015.09.023.
- Martínez Sabarís, E. (2016) *Arañas de Galicia (spiders of Galicia)*. Disponible en: <http://araneaedegalicia.blogspot.com> (Accedido: 9 de julio de 2019).
- Melic, A. (1994) Arañas nuevas o de interés de la fauna ibérica (Arachnida, Araneae), *Revista aragonesa de entomología*, 4, pp. 109-118.
- Morano, E. *et al.* (2019) *Iberian spider catalogue (v4.1)*. Disponible en: <http://www.biodiversityresearch.org/iberia>. (Accedido: 11 de julio de 2019).
- Muséum national d'Histoire Naturelle (2019) *Inventaire National du Patrimoine Naturel*. Disponible en: <https://inpn.mnhn.fr>.
- National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine (sin fecha) *Nucleotide*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (Accedido: 13 de julio de 2019).
- Naturalista CONABIO (sin fecha) *Falsa viuda negra mordedora (Steatoda nobilis)*. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/366894-Steatoda-nobilis> (Accedido: 14 de julio de 2019).
- Nentwig, W. *et al.* (2019) *Steatoda nobilis, Spiders of Europe, versión 7.2019*. Disponible en: <https://araneae.nmbe.ch/data/891> (Accedido: 12 de julio de 2019).
- Nolan, M. (1999) Three spiders (Araneae) new to Ireland: *Bolyphantès alticeps*, *Oonops domesticus* and *Steatoda nobilis*, *The Irish Naturalists' Journal*, 26, pp. 200-202.
- Pantini, P. y Isaia, M. (2018) Checklist of the Italian spiders. Museo Civico di Scienze Naturali di Bergamo.
- Pantini, P., Sassu, A. y Serra, G. (2013) Catalogue of the spiders (Arachnida Araneae) of Sardinia,

*Biodiversity Journal*, 4(1), pp. 3-104.

- Pickard-Cambridge, O. (1879) On some new and rare British Spiders, with Characters of a new Genus, *Annals and Magazine of Natural History*, 5(4), pp. 190-215.
- Pickard-Cambridge, O. (1899) Notes on British spiders observed or captured in 1898, *Proceedings of the Dorset Natural History and Antiquarian Field Club*, 20, pp. 1-22.
- Pickard-Cambridge, O. (1907) On some New and Little-known Araneidea, *Journal of Zoology*, 77(4), pp. 817-829.
- Ratnasingham, S. y Hebert, P. D. N. (2007) *The Barcode of Life Data System, Molecular Ecology Notes*. Disponible en: [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org) (Accedido: 13 de julio de 2019).
- Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras (2013), pp. 1-22.
- Reglamento (UE) Nº 1143/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de octubre de 2014 sobre la prevención y la gestión de la introducción y propagación de especies exóticas invasoras (2014). Estrasburgo: Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea.
- Roberts, M. J. (1993) *The spiders of Great Britain and Ireland. Part 1 - Text*. Compact. Colchester: Harley books.
- Roberts, M. J. (1996) *Spiders of Britain and northern Europe*. London: Collins.
- Rodríguez Luengo, J. L., Wong, L. J. y Pagad, S. (2018) *Global Register of Introduced and Invasive Species- Tenerife, Islas Canarias, Spain. Version 1.1. Invasive Species Specialist Group ISSG. Checklist dataset*. doi: <https://doi.org/10.15468/2fhywf>.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406-425.
- Schmidt, G. (1954) Zur Herkunftsbestimmung von Bananenimporten nach dem Besatz an Spinnen, *Journal of Applied Entomology*, 36(4), pp. 400-422.
- Schmidt, G. (1956) Die Spinnenfauna der Kanarischen Bananen, *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*, 43, pp. 237-249.
- Schmidt, G. (1990) Zur Spinnenfauna der Kanaren, Madeiras und der Azoren, *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A (Biologie)*, 451(46), pp. 2-45.
- Snazell, R. y Jones, D. (1993) The theridiid spider *Steatoda nobilis* (Thorell, 1875) in Britain, *Bulletin of the British Arachnological Society*, 9(5), pp. 164-167.
- Stu's Images (2015) *Steatoda nobilis, Noble False Widow spider, Wikimedia Commons*. Disponible en: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Steatoda\\_nobilis,\\_Noble\\_False\\_Widow\\_spider.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Steatoda_nobilis,_Noble_False_Widow_spider.jpg) (Accedido: 17 de julio de 2019).
- Tamura, K. y Nei, M. (1993) Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees, *Molecular Biology and Evolution*, 10(3).
- Taucare-Ríos, A., Mardones, D. y Zúñiga-Reinoso, Á. (2016) *Steatoda nobilis* (Araneae: Theridiidae) in South America: a new alien species for Chile, *The Canadian Entomologist*, 148, pp. 479-481. doi: 10.4039/tce.2015.83.
- Thermo Fischer (sin fecha) *260/280 and 260/230 Ratios, T042-Technical bulletin. NanoDrop Spectrophotometers*. Wilmington, Delaware USA: Thermo Fisher Scientific - NanoDrop products. Disponible en: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>.
- Thorell, T. (1875) Descriptions of several European and North African spiders., *Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar*, 13(5), pp. 1-203.
- Valverde, J. (2008) *Steatoda cf. nobilis - 54915, Biodiversidad Virtual*. Disponible en: <https://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Steatoda-cf.-nobilis-img54915.html>



(Accedido: 11 de julio de 2019).

- Vetter, R. S. (2014) *European Spider, Steatoda nobilis Theridiidae*. Disponible en: [https://civr.ucr.edu/european\\_spider.html](https://civr.ucr.edu/european_spider.html) (Accedido: 15 de mayo de 2019).
- Vetter, R. S. y Rust, M. K. (2012) A large European combfoot spider , *Steatoda nobilis* (Thorell 1875) (Araneae: Theridiidae), newly established in Ventura County, California, *Pan-Pacific Entomologist*, 88(1), pp. 92-97.
- Warburton, C. (1892) Spiders from Madeira, *Annals and Magazine of Natural History*, 6(10), pp. 216-229.
- Warrell, D. A. *et al.* (1991) Neurotoxic envenoming by an immigrant spider (*Steatoda nobilis*) in southern England, *Toxicon*, 29(10), pp. 1263-1265.
- Whiting, M. F. *et al.* (1997) The strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal dna sequences and morphology, *Systematic Biology*, 46(1), pp. 1-68.
- Wunderlich, J. (1987) *Die spinnen der Kanarischen Inseln und Madeiras. Adaptive Radiation, Biogeographie, Revisionen und Neubeschreibungen*. Langen: Tropical Scientific Books GmbH.
- Zamani, A. *et al.* (2015) New data on spider fauna of Iran (Arachnida: Araneae), Part II, *Zoology and Ecology*, 25(4), pp. 339-346. doi: 10.1080/21658005.2015.1068508.



# ANEXOS

## Anexo 1. Secuencias empleadas en la reconstrucción filogenética

**Tabla 4.** Números de acceso de las secuencias del gen COI empleadas. Se indican, sin asterisco, las recuperadas de la base de datos Nucleotide del NCBI (National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine, sin fecha), y con un asterisco, de la base de datos BOLD (Ratnasingham y Hebert, 2007)

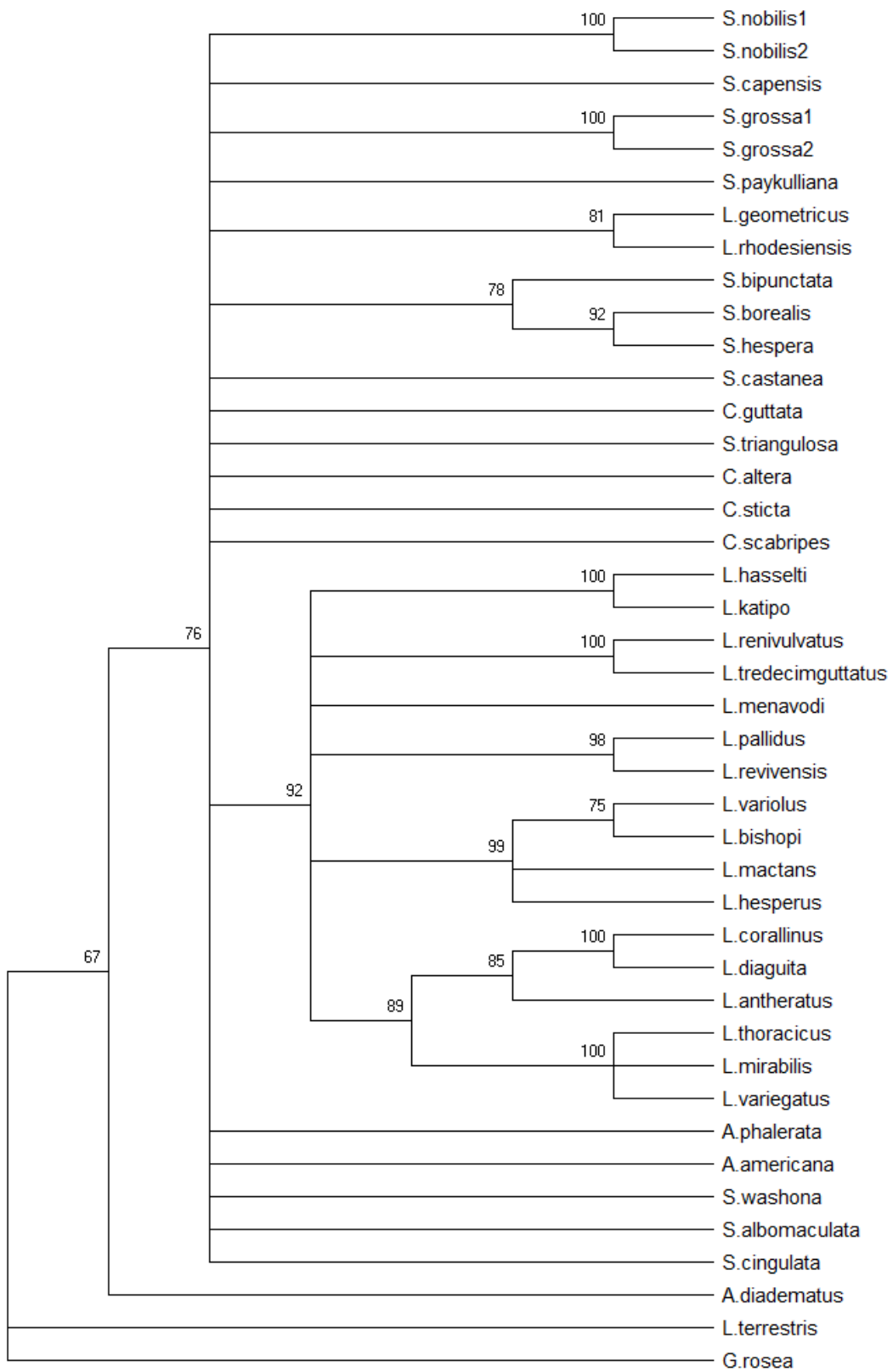
Espece	Nº de acceso NCBI o BOLD*	Código (árboles filogenéticos)
<i>Araneus diadematus</i>	HQ977123	<i>A.diadematus</i>
<i>Asagena americana</i>	KM840793	<i>A.americana</i>
<i>Asagena phalerata</i>	KT894352	<i>A.phalerata</i>
<i>Crustulina atera</i>	MG045903	<i>C.atera</i>
<i>Crustulina guttata</i>	HM417003	<i>C.guttata</i>
<i>Crustulina scabripes</i>	KX039134	<i>C.scabripes</i>
<i>Crustulina sticta</i>	HM434059	<i>C.sticta</i>
<i>Grammostola rosea</i>	HQ977123	<i>G.rosea</i>
<i>Latrodectus antheratus</i>	AY383047	<i>L.antheratus</i>
<i>Latrodectus bishopi</i>	AY383060	<i>L.bishopi</i>
<i>Latrodectus corallinus</i>	AY383061	<i>L.corallinus</i>
<i>Latrodectus diaguita</i>	AY383063	<i>L.diaguita</i>
<i>Latrodectus geometricus</i>	AY383046	<i>L.geometricus</i>
<i>Latrodectus hasseltii</i>	AY383051	<i>L.hasseltii</i>
<i>Latrodectus hesperus</i>	AY383070	<i>L.hesperus</i>
<i>Latrodectus katipo</i>	AY383052	<i>L.katipo</i>
<i>Latrodectus mactans</i>	AY383054	<i>L.mactans</i>
<i>Latrodectus menavodi</i>	AY383075	<i>L.menavodi</i>
<i>Latrodectus mirabilis</i>	AY383076	<i>L.mirabilis</i>
<i>Latrodectus pallidus</i>	AY383055	<i>L.pallidus</i>
<i>Latrodectus renivulvatus</i>	AY383057	<i>L.renivulvatus</i>
<i>Latrodectus revivensis</i>	AY383078	<i>L.revivensis</i>
<i>Latrodectus rhodesiensis</i>	AY383058	<i>L.rhodesiensis</i>
<i>Latrodectus thoracicus</i>	GU112104	<i>L.thoracicus</i>
<i>Latrodectus tredecimguttatus</i>	AY383080	<i>L.tredecimguttatus</i>
<i>Latrodectus variegatus</i>	AY383083	<i>L.variegatus</i>
<i>Latrodectus variolus</i>	AY383059	<i>L.variolus</i>
<i>Lycosa terrestris</i>	MK155004	<i>L.terrestris</i>
<i>Steatoda albomaculata</i>	KM833799	<i>S.albomaculata</i>
<i>Steatoda bipunctata</i>	GU682467	<i>S.bipunctata</i>
<i>Steatoda borealis</i>	EU003307	<i>S.borealis</i>
<i>Steatoda capensis</i>	KC414086	<i>S.capensis</i>
<i>Steatoda castanea</i>	GU338700	<i>S.castanea</i>
<i>Steatoda cingulata</i>	JN817103	<i>S.cingulata</i>
<i>Steatoda grossa</i>	AY383086	<i>S.grossa</i>
<i>Steatoda grossa</i>	HQ977152	<i>S.grossa</i>
<i>Steatoda hespera</i>	HQ580777	<i>S.hespera</i>
<i>Steatoda nobilis</i>	BBUSE071-11*	<i>S.nobilis</i>
<i>Steatoda nobilis</i>	BBUSE073-11*	<i>S.nobilis</i>
<i>Steatoda paykulliana</i>	SPIEU1297-11*	<i>S.paykulliana</i>
<i>Steatoda triangulosa</i>	GU682506	<i>S.triangulosa</i>
<i>Steatoda washona</i>	KP652859	<i>S.washona</i>

## Anexo 2. Concentración y parámetros de calidad y pureza del ADN genómico extraído

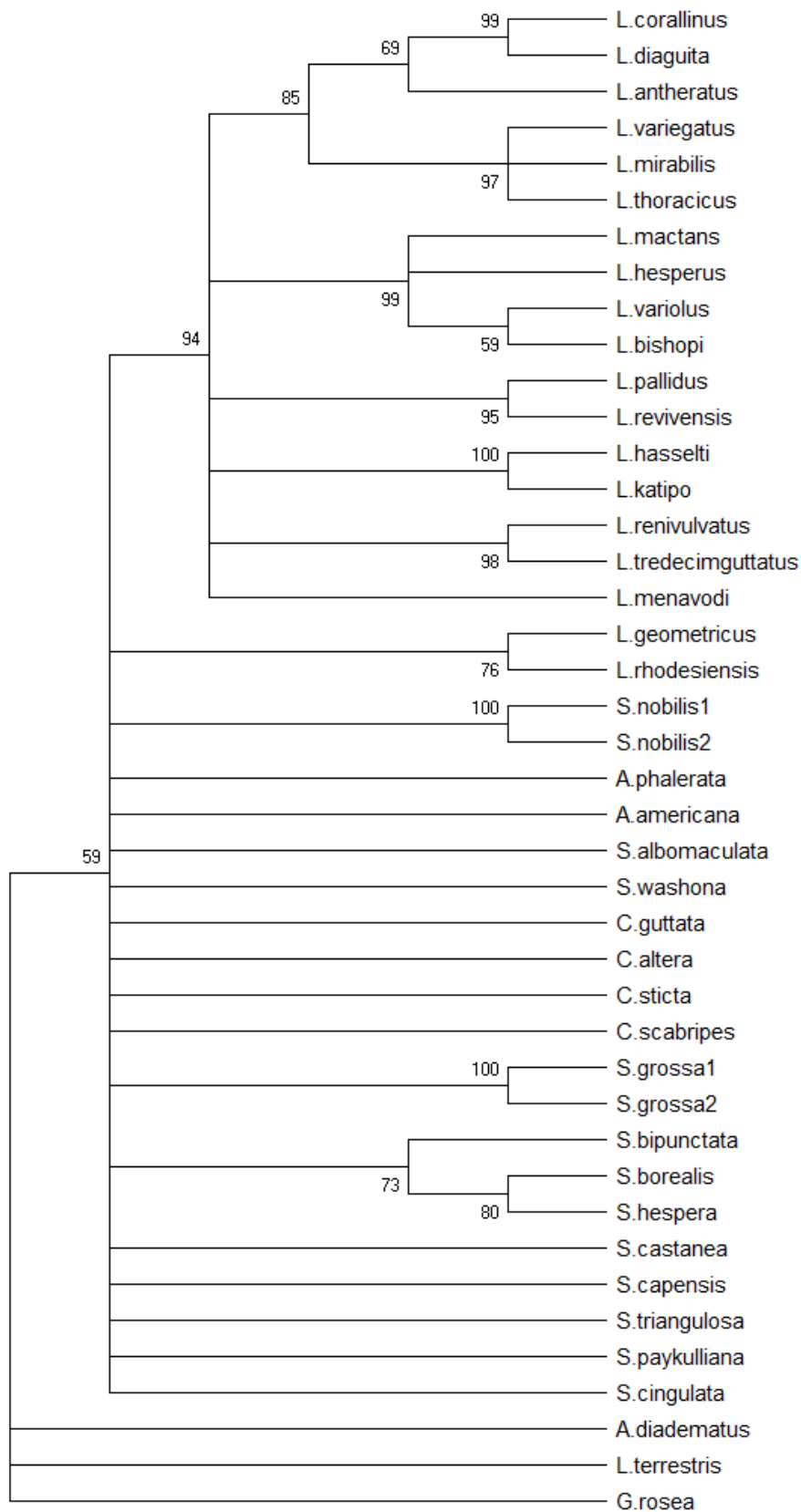
*Tabla 5. Concentración y parámetros de pureza para los productos de la extracción. Destacado en azul: muestras seleccionadas para las reacciones PCR adicionales.*

Muestra	Concentración (µg/ml)	A (260 nm)	A (280 nm)	A(260 nm)/ A (280nm)	A(260 nm)/ A (280nm)
G1	11,11	0,222	0,137	1,619	1,760
G2	9,47	0,189	0,108	1,748	1,361
G3	17,86	0,357	0,199	1,792	1,710
G4	8,29	0,166	0,092	1,800	1,344
G5	15,48	0,310	0,161	1,923	1,828
G6	18,26	0,365	0,193	1,888	1,892
G7	33,62	0,672	0,367	1,830	2,102
G9	11,00	0,220	0,117	1,888	1,447
G9	10,97	0,219	0,117	1,877	1,420
N1	15,14	0,305	0,173	1,781	1,660
N2	27,34	0,547	0,337	1,622	0,868
N3	2,73	0,055	0,032	1,795	0,708
N4	22,12	0,442	0,416	1,063	1,066
N5	6,78	0,136	0,079	1,719	1,255
N6	41,65	0,833	0,465	1,794	2,118

### Anexo 3. Árboles filogenéticos



**Figura 7.** Árbol obtenido mediante el método Neighbour-Joining en el paquete MEGA X



**Figura 8** Árbol filogenético obtenido mediante el método de máxima verosimilitud en el paquete MEGA X

