

CONCILIANDO EL BIOINVENTARIADO SEMI-CUANTITATIVO CON LOS CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA INFERIR PATRONES DE DIVERSIDAD Y BIOGEOGRÁFICOS EN LA RED DE PARQUES NACIONALES

MIQUEL A. ARNEDO¹, JAGOBA MALUMBRES-OLARTE^{1, 2, 3}, MARC DOMÈNECH¹,
LUIS CARLOS CRESPO^{1,2}, PEDRO CARDOSO^{2,3}, JORDI MOYA-LARAÑO⁴,
CARLES RIBERA¹

RESUMEN

Las arañas se cuentan entre los depredadores más abundantes y ubicuos del planeta, juegan un papel clave en el funcionamiento de los ecosistemas y constituyen un excelente indicador de perturbaciones ambientales. Sin embargo, debido a su gran abundancia y dificultad de identificación, han sido tradicionalmente excluidas de los estudios sobre conservación. Este proyecto propone superar dichas limitaciones mediante la integración de protocolos optimizados de recolección con técnicas taxonómicas basadas en el ADN. El objetivo del estudio es revelar los patrones de biodiversidad de las comunidades de arañas de la Red de Parques Nacionales, e identificar los factores que las han modelado. El estudio se ha centrado en robledales que, dada su representatividad y altos niveles de endemismo, son de gran interés para la conservación.

Se realizaron un total de 384 horas de muestreo en 16 parcelas de 1 ha distribuidas en 6 Parques Nacionales, en un gradiente climático y biogeográfico. Se recogieron 20.539 especímenes, correspondientes a 39 familias, 190 géneros y 375 especies. Se descubrieron 13 nuevas especies, 7 nuevas citas para la península ibérica y 3 para España. Así mismo, se generó una biblioteca de códigos de barras de ADN de las especies identificadas para facilitar la identificación automática en futuros programas de monitoreo, y proporcionar información para inferir la diversidad filogenética.

Los patrones de riqueza de especies indican que los bosques de *Quercus faginea* Lam. son los más diversos. Los parques del norte están dominados por especies paleárticas mientras que los centrales y meridionales son más ricos en especies ibéricas y mediterráneas. Los patrones de diversidad están explicados principalmente por factores climáticos y probablemente geológicos y muestran niveles extremadamente altos de reemplazo entre los parques, lo que sugiere que la mejor estrategia de conservación es maximizar la distribución geográfica de las áreas de conservación en lugar de preservar hábitats específicos.

Palabras clave: arañas, robledal ibérico, diversidad filogenética, montaje de comunidades, rasgos funcionales.

¹ Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals e Institut de Recerca de la Biodiversitat, Universitat de Barcelona; Av. Diagonal 643 – 08028, Barcelona, Catalunya, España. Teléfono: +34 934034808, Fax: +34 934035740, marnedo@ub.edu

² Finnish Museum of Natural History, University of Helsinki; PO Box 17, 00014 Helsinki, Finlandia.

³ CE3C – Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes / Azorean Biodiversity Group and Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Azores, Portugal.

⁴ Departamento de Ecología funcional y evolutiva, Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA, CSIC); Carretera de Sacramento, s/n. La Cañada de San Urbano 04120, Almería, España.

RECONCILING SEMI-QUANTITATIVE BIOINVENTORING WITH DNA BARCODING TO INFER DIVERSITY AND BIOGEOGRAPHICAL PATTERNS IN THE SPANISH NATIONAL PARKS NETWORK

ABSTRACT

Spiders are among the most abundant and ubiquitous predators on the planet, they play a key role in the functioning of ecosystems and are excellent indicators of environmental disturbances. However, because of their abundance and challenging identification they have been traditionally overlooked in conservation studies. This project aims to overcome former limitations by integrating optimized collection protocols with taxonomic techniques based on DNA. Our main aim is to reveal the biodiversity patterns of the spider communities of the Spanish National Parks and identify the factors that have shaped them. The study has focused on white-oak woods, since they are among the most representative Iberian forests, show high levels of endemism and, therefore, are of interest for conservation.

A total of 384 sampling hours were carried out in 16 plots of 1 ha distributed in 6 National Parks, along a climatic and biogeographic gradient. A total of 20,539 specimens were collected, corresponding to 39 families, 190 genera and 375 species. We discovered 13 new species, 7 new records for the Iberian Peninsula and 3 for Spain. A library of DNA barcodes of the identified species was also generated to facilitate automatic identification in future monitoring programs and to provide information to infer phylogenetic diversity.

The patterns of species richness indicated that the forests of *Q. faginea* are the most diverse. The northern parks are dominated by Palearctic species while the central and southern ones are richer in Iberian and Mediterranean species. The patterns of diversity are mainly explained by climatic and probably geological factors and show extremely high levels of replacement among the parks, suggesting that the best conservation strategy is to maximize the geographical distribution of the conservation areas instead of preserving specific habitats.

Key words: spiders, Iberian white oaks, phylogenetic diversity, functional traits, community assembly.

INTRODUCCIÓN

La vida en el planeta tierra, producto de más de 3.500 millones de años de evolución, está desapareciendo a un ritmo solo comparable al de los episodios de extinción masiva registrados en su historia (ELDREDGE 2001). La pérdida de biodiversidad tiene un impacto directo sobre el funcionamiento de los ecosistemas (LOREAU *et al.*, 2001; HOOPER *et al.*, 2005; SRIVASTAVA & VELLEND 2005), comprometiendo, por tanto, los servicios ecológicos que estos proporcionan a las sociedades humanas (DAILY & MATSON 2008). El desarrollo de estrategias efectivas para la conservación de la biodiversidad requiere mejorar el conocimiento sobre sus patrones espaciales y los mecanismos que los generan (GASTON 2000; CABEZA *et al.*, 2004; LAMOREUX *et al.*, 2005).

Por su elevada diversidad y creciente vulnerabilidad a la actividad humana, la península ibérica constituye un área prioritaria de conservación en Europa. En este contexto, el principal objetivo de la Red de Parques Nacionales es garantizar la conservación a largo plazo de una muestra representativa de los sistemas naturales españoles como legado a las generaciones futuras y fomentar su conocimiento.

(http://reddeparquesnacionales.mma.es/parques/org_auto/red_ppnn/objetivos.htm).

Arañas y otros artrópodos como bioindicadores de salud ambiental

Tradicionalmente, la gestión e investigación en los parques nacionales se han focalizado en vertebrados y plantas vasculares, para los cuales se dispone de amplia información sobre su diversidad y distribución. Sin embargo, dichos grupos taxonómicos a penas constituyen el 4% de la riqueza global de especies (MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT 2005). Los artrópodos son los organismos más abundantes y diversos del planeta, y ocupan una gran variedad de microhábitats y nichos funcionales, a lo largo de un amplio espectro de escalas espaciales y temporales, informando sobre patrones de diversidad y salud ambiental a escalas más finas que las que proporcionan plantas y vertebrados (YEN & BUTCHER 1997). Por otra parte, debido a sus tasas elevadas de reproducción y tiempos cortos de generación, son más sensibles a

las perturbaciones ambientales que los vertebrados, proporcionando su seguimiento una alerta temprana de posibles cambios ecológicos. Adicionalmente, los artrópodos permiten detectar el efecto de la fragmentación en áreas que, por su tamaño, ya no soportan indicadores vertebrados (KREMEN *et al.*, 1993).

Las arañas se cuentan entre los depredadores más abundantes y ubicuos del planeta (WISE 1993), y se consideran bioindicadores por su sensibilidad a los cambios ambientales e impactos antropogénicos y su facilidad de muestreo (MARC *et al.*, 1999; ENTLING *et al.*, 2007; FINCH *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2011). A pesar de su abundancia y su papel clave en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, existe un escaso conocimiento sobre la diversidad de sus comunidades y su estado de conservación. Dicha falta de conocimiento, extensible a otros grupos de invertebrados terrestres, compromete los principios de representatividad y complementariedad que son básicos en cualquier plan de conservación (CARVALHO *et al.*, 2011).

Nuestro conocimiento actual de la araneofauna ibérica es fragmentado. La mayor parte de registros se concentran en unas pocas provincias, sus áreas de distribución están mal caracterizadas y todavía existen muchas especies por catalogar (CARDOSO & MORANO 2019). El catálogo de especies ibéricas incluye actualmente 30.834 registros de arañas, correspondientes a 56 familias, 402 géneros y 1.493 especies, 282 de las cuales (17%) son endemismos ibéricos (MORANO *et al.*, 2018). Los linífidos (familia Linyphiidae) presentan el mayor número de especies (302 especies) pero los disdéridos (Dysderidae) presentan la mayor riqueza endémica (58 especies) (CARDOSO & MORANO 2019). Entre los factores responsables del conocimiento incompleto de la araneofauna ibérica destacan (1) la escasa implantación de protocolos de muestreo óptimos estandarizados y (2) la escasez de expertos en la taxonomía del grupo (NEW 1999; CARDOSO 2008).

Bioinventarios y evaluación rápida de la biodiversidad

Los programas de evaluación rápida de biodiversidad (*Rapid Biodiversity Assessment*, RBA) son herramientas diseñadas para obtener la mayor cantidad posible

de información de un área concreta en el mínimo de tiempo, utilizando pocos recursos (OLIVER & BEATTIE 1996). Por otra parte, los programas de muestreo de corto-plazo (*short-term*) representan una alternativa eficiente en grupos megadiversos, que incluyen muchos linajes de invertebrados, ya que minimizan el número y la extensión de los periodos de colecta. Elegir cuál es el mejor momento del año para realizar dichos muestreos es de gran importancia, especialmente en ambientes tan fluctuantes como los que se dan en el área mediterránea. Un problema añadido al muestreo de grupos megadiversos es la dificultad de detectar especies poco frecuentes, lo que se traduce en una dramática subestimación de la riqueza real de especies (NOVOTNY & BASSET 2000). Una forma de atenuar dicha subestimación es el uso de extrapolación estadística a partir de curvas de acumulación de especies muestreadas (COLWELL & CODDINGTON 1994). Cardoso (2009) ha propuesto un protocolo específicamente optimizado para arañas ibéricas, que está basado en el propuesto por Coddington (1991), el cual combinaba métodos eficientes de colecta y había sido contrastado empíricamente (SCHARFF *et al.*, 2003). El nuevo protocolo denominado COBRA, por sus siglas en inglés: *Conservation Oriented Biodiversity Rapid Assessment* ha sido aplicado con éxito en distintos estudios (CARDOSO, GASPARI *et al.*, 2008; CARDOSO, SCHARFF *et al.*, 2008; CARDOSO 2009; CARVALHO *et al.*, 2010; CRESPO *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2017; MALUMBRES-OLARTE *et al.*, 2017; MALUMBRES-OLARTE *et al.*, 2018).

El uso de los códigos de barras de DNA para acelerar los bioinventarios

La identificación de arañas, y en general de artrópodos, resulta a veces problemática debido a su diversidad, taxonomía compleja y escasez de taxónomos especializados. Los códigos de barras de DNA son fragmentos cortos (500-800 pb) estandarizados de la secuencia nucleotídica del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) (en el caso de los animales) utilizados como identificador de especies (HEBERT *et al.*, 2003). La construcción de una librería de referencia de código de barras a partir de especímenes convenientemente identificados por expertos y con metadatos asociados, permite la identificación automatizada de especímenes desconocidos mediante la asignación de la secuencia de dicho espécimen a

secuencias identificadas de acuerdo a las diferencias observadas entre la variación inter- e intraespecífica (*barcoding gap*). En los últimos años ha surgido una serie de consorcios, instituciones e iniciativas para difundir y promover el uso de los código de barras (*Consortium Barcode of Life*, CBOL: <http://www.barcodeoflife.org>), coordinar e incentivar la generación de dichos datos (*International Barcode of Life*, iBOL, <http://ibol.org>) y proporcionar una plataforma de trabajo pública para almacenar y analizar dichos códigos y metadatos asociados (*Barcode of Life Data Systems*, BOLD, <http://www.boldsystems.org>).

El *DNA barcoding* se ha establecido como una herramienta esencial en taxonomía y como una metodología fundamental para acelerar el bioinventariado de organismos y la clasificación e identificación en campañas de monitorización. Los beneficios del uso de códigos de barras de DNA para el estudio e inventariado de artrópodos, y otros organismos megadiversos mal conocidos, no se reducen a la posibilidad de identificación automatizada, que es, dicho sea de paso, de gran importancia para gestores del patrimonio natural. Los códigos de barras permiten (1) asignar estadios vitales y sexos, (2) descubrir especies crípticas y obtener una visión más detallada de la variabilidad genética de las especies y (3) proporcionar información filogenética y filogeográfica.

Aunque generalmente se utilizan criterios operativos basados en la similitud para la delimitación de especies mediante códigos de barras (ver AUSTERLITZ *et al.*, 2009 para una revisión), se ha demostrado que la utilización de modelos evolutivos para la agrupación de códigos de barras (FUJISAWA & BARRACLOUGH 2013; ZHANG *et al.*, 2013; KAPLI *et al.*, 2017) genera linajes más relevantes ecológicamente (POWELL *et al.*, 2010). Estos métodos permiten delimitar linajes evolutivos basándose en la información proporcionada por el DNA que pueden ser posteriormente contrastados con la evidencia fenotípica o ecológica para determinar su relevancia taxonómica y evolutiva en el contexto de una taxonomía integrativa (PIRES & MARINONI 2010).

Las múltiples dimensiones de la biodiversidad

Una de las grandes ventajas del uso de códigos de barras de DNA es que permiten estimar la diversidad

filogenética PD (FAITH 1992), una medida de diversidad obtenida de la suma de la longitud total de las ramas de una filogenia, frecuentemente empleada para seleccionar áreas de conservación (ej. RODRIGUES & GASTON 2002; FERRIER *et al.*, 2004) o formas de gestión (p.ej. STRAUSS *et al.*, 2006). La integración de los códigos de barras en la estima del PD facilita la comparación de estimas de diversidad entre organismos y comunidades (SMITH & FISHER 2009), así, se ha observado que las curvas de diversidad filogenética (PD) siguen un perfil muy similar al de las curvas de acumulación de especies (ZHOU *et al.*, 2009).

La diversidad funcional (FD), por otra parte, es un indicador de la diversidad morfológica, fisiológica y de rasgos ecológicos de una comunidad (PETCHEY & GASTON 2006), y se ha sugerido que explica el funcionamiento del ecosistema mejor que otras medidas de diversidad (HOOPER *et al.*, 2005). La integración de la información filogenética (evolutiva) con datos ecológicos (distribución, rasgos funcionales) permite caracterizar los factores que condicionan el montaje de las comunidades y facilita la comprensión de los mecanismos subyacentes (WEBB *et al.*, 2002; FOREST *et al.*, 2007; CAVENDER-BARES *et al.*, 2009; VAMOSI *et al.*, 2009; WINTER *et al.*, 2009; DEVICTOR *et al.*, 2010). La teoría más generalizada es que los factores ambientales promueven el agrupamiento filogenético (las especies de una comunidad están más relacionadas entre sí que lo esperado al azar), mientras que las interacciones biológicas (diferenciación de nicho) favorecen la dispersión filogenética. Sin embargo, ambos factores pueden interactuar a diferentes escalas en las comunidades naturales, afectando diferencialmente la estructura filogenética. Así, por ejemplo, se ha observado que el filtrado ambiental es más relevante a escala regional, mientras que a nivel local la diferenciación de nicho es más importante. Por otra parte, las comunidades tienden a ser más similares cuando se comparan niveles taxonómicos elevados, mientras que entre taxones estrechamente relacionados se observa el patrón contrario.

Es importante destacar que ninguna de las dimensiones de la diversidad (taxonómica, filogenética y funcional) explica por separado las demás, por lo que se hace necesaria la adopción de una aproximación integrativa para diseñar estrategias eficientes de conservación.

Ecosistema de estudio: Los robledales ibéricos

Las quercíneas (*Quercus* spp.) constituyen la vegetación climática de aproximadamente el 85% del territorio ibérico. Los robles blancos europeos (*Quercus* subgn. *Quercus*) están ampliamente distribuidos por toda Europa, donde forman bosques de considerable importancia económica. Se trata de robles caducifolios (algunos marcescentes), hermafroditas con semillas grandes (bellotas) a menudo comestibles, que producen abundante polen anemocórico y se dispersan mediante aves. En la península ibérica existen 6 especies, 2 de las cuales no se encuentran en el resto de Europa (FRANCO 1990). La península ibérica es el límite occidental y meridional de las dos especies de clima templado de roble albar, *Quercus robur* L. y *Quercus petraea* (Matoe) Liebl., el primero cubre las áreas más occidentales, mientras que el segundo predomina en el noreste. Estudios moleculares y palinológicos indican que *Q. petraea* y *Q. pubescens* Willd. (= *Q. humilis* Miller), restringido al norte del valle del río Ebro, son inmigrantes postglaciales recientes (PETIT *et al.*, 2002). El roble melojo, *Quercus pyrenaica* Willd., se localiza en la mayor parte del cuadrante noroeste de la península ibérica, donde es simpátrica con *Q. robur*, aunque su área se extiende a zonas más continentales. *Quercus canariensis* Willd. es el más escaso y de distribución más restringida, limitándose a bosques relictuales en Andalucía oriental y rodales en el suroeste de Portugal y Cataluña. Por el contrario, el quejigo, *Q. faginea* Lam., es el roble blanco más abundante en la península ibérica, tiene una distribución mediterránea, a pesar de que algunos de los bosques llegan a las costas del Atlántico y el Cantábrico. Los bosques de quejigos y melojos se hallan listados como Hábitats Naturales de Interés Comunitario (GARCÍA & MEJÍAS 2009; MARAÑÓN & PÉREZ-RAMOS 2009).

Estudios palinológicos y moleculares (OLALDE *et al.*, 2002; PETIT *et al.*, 2002) sugieren la existencia de refugios ibéricos durante los ciclos glaciales para al menos 4 de las especies de robles. Los principales refugios se habrían localizado cerca de la costa, uno en el suroeste, otros en el sistema bético, y un tercero cerca de la cuenca del Ebro.

El principal objetivo del presente proyecto fue el de desarrollar herramientas para el inventariado de organismos megadiversos, como las arañas y otros ar-

trópodos, que han sido frecuentemente excluidos de los planes de gestión de las áreas protegidas debido a su gran abundancia, pero pobre conocimiento taxonómico, y sentar las bases para un futuro protocolo de monitorización de estos. Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos: (1) construir una librería de códigos de barras de arañas ibéricas de acuerdo con un sistema automático de identificación de estos organismos, (2) caracterizar los factores que determinan los patrones de coexistencia de especies de arañas en los robledales de la red de parques, (3) investigar si los patrones de diversidad taxonómica y filogenética en las comunidades de arañas de robledales se relacionan con la historia evolutiva de los robledales a lo largo de la Red de Parques Nacionales y (4) investigar los patrones de diversidad funcional en las comunidades de arañas de robledales ibéricos y correlacionarlos con la diversidad taxonómica y filogenética para identificar fenómenos de reemplazamientos taxonómicos sin pérdida de funcionalidad y caracterizar su nivel de redundancia funcional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Zona de estudio

El estudio se desarrolló en 6 Parques Nacionales: Aigüestortes i Estany de Sant Maurici (Catalunya) (A), Cabañeros (Castilla-La Mancha) (C), Monfragüe (Extremadura) (M), Ordesa y Monte Perdido (Aragón) (O), Picos de Europa (Asturias, Cantabria, León) (P) y Sierra Nevada (Andalucía) (S). Los parques fueron escogidos en base a (1) poseer robledales representativos, (2) incluir las principales áreas biogeográficas de la península (Atlántica, Alpina, Mediterránea) (<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/natura-2000-sites-biogeographical-regions-4>) y (3) constituir un fuerte gradiente ambiental a lo largo de la península, relacionado con los diferentes niveles de influencia climática, de mediterráneo a continental y alpino. La gran diversidad climática, el amplio rango de distancia geográficas y la variada historia evolutiva que abarcan los parques estudiados, permiten investigar el papel relativo de factores ambientales e históricos en la determinación de la riqueza local y los gradientes de diversidad de las comunidades de arañas de los robledales ibéricos.

Protocolo de muestreo

La recolecta de muestras se realizó mediante el protocolo semi-cuantitativo COBRA50, diseñado para garantizar la colecta del 50% de la diversidad de una parcela (CARDOSO 2009). La colecta consistió en 12 horas de esfuerzo de muestreo directo y 12 h de indirecto en cada parcela de 1 hectárea. El muestreo directo combinó tres métodos distintos de colecta: (1) captura directa visual por encima de la rodilla mediante aspirador entomológico y pinzas, (2) barrido con manga aplicada sobre el estrato arbustivo y (3) batido de vegetación del estrato arbóreo sobre una sábana colectora de 1m². En cada muestra se recolectaron con el método correspondiente el máximo número de arañas durante 1 hora, distribuidas de la siguiente manera: 2 horas diurnas y 2 horas nocturnas de batido, 2 horas diurnas y 2 horas nocturnas de barrido, y 4 horas nocturnas de captura visual, para un total de 12 muestras. La colecta indirecta se implementó mediante trampas de caída. Cada trampa consistió en un vaso de plástico de 7,5 cm de diámetro enterrado con el borde superior a nivel del suelo y cubierto con una tapa de plástico protectora etiquetada, que dejaba aproximadamente un espacio con el suelo de 1 cm. Las trampas contenían propilenglicol como líquido de captura y conservación, el cual garantiza la preservación de DNA. Las trampas se distribuyeron en 12 grupos de 4 trampas dispuestas formando un cuadrado de 5 m de lado, distribuidos uniformemente en la parcela. Para el análisis, cada grupo de 4 trampas se consideró una sola muestra, para un total de 12 muestras indirectas (CARVALHO *et al.*, 2011). Para cada parcela se anotaron las características de la comunidad vegetal y se realizaron fotos de las trampas para calcular posteriormente índices de cobertura. Los muestreos se realizaron durante los meses de Mayo y Junio por coincidir con el máximo de riqueza y abundancia de arañas adultas en los ambientes Mediterráneos (CARDOSO *et al.*, 2007).

Clasificación e identificación

Los especímenes fueron clasificados e identificados utilizando la literatura taxonómica especializada disponible y la base de datos en línea «Araneae» (<http://www.araneae.unibe.ch>). Las identificaciones se realizaron con un estereomicroscopio Leica MZ 16A, con una cámara Leica DFC 450 montada para la obten-

ción de imágenes y su procesamiento mediante el software Leica Application Suite v4.4. Se obtuvieron imágenes en diferentes visiones (habitus, dorsal y lateral, bulbo masculino, prolateral y ventral, y epigino de la hembra, ventral) de una pareja de cada una de las especies colectadas, para facilitar su identificación posterior.

Códigos de barras

Se obtuvieron secuencias del fragmento 5' del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) y un fragmento del 28S rRNA (28S). En el caso del COI, y en la medida de lo posible, se analizaron cinco individuos por morfoespecie y por parcela, mientras que para el 28S se analizó un individuo por morfoespecie. Para las extracciones de DNA se utilizaron patas y el resto del individuo se guardó como referencia. Para especies pequeñas (< 5 mm), se utilizó el espécimen completo. En estos casos, la extracción no fue destructiva (es decir, las muestras no se trituraron) y los especímenes se recuperaron como referencia tras la lisis de los tejidos blandos internos. El DNA genómico total se extrajo utilizando el kit de PCR para tejidos REDEExtract-N-Amp™ de Sigma-Aldrich, siguiendo el protocolo del fabricante y se realizó en placas de 96 pocillos. Los cebadores utilizados para la amplificación se detallan en la Tabla 1. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en placas de 96 pocillos utilizando 8 µl de REDEExtract-N-Amp™ PCR Ready-Mix de Sigma-Aldrich, cebadores directos e inversos, 4 µl de DNA diluido y ultrapuro, destilado agua hasta

un volumen de reacción total de 20 µL. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: para el COI una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 30 s, 45 °C durante 35 s, 72 °C durante 45 s) y una etapa final a 72 °C durante 5 min. En algunos casos, se utilizó un protocolo *Touchdown*, que consistía en 16 ciclos de temperatura de recocido que comenzaban a 62 °C y disminuían 1 °C en cada ciclo y 25 ciclos adicionales de recocido a 46 °C. Para el 28S, las temperaturas de anillamiento variaron entre 52 y 48 °C, dependiendo de la extracción y la pareja de cebadores. Los productos de PCR se secuenciaron por ciclos en ambas direcciones con los cebadores de amplificación de la muestra en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias sin procesar se ensamblaron, editaron y manipularon aún más utilizando el software Geneious v7.1.9 (<http://www.geneious.com>, KEARSE *et al.*, 2012). Los alineamientos de cada gen se obtuvieron utilizando la versión en línea del programa de alineamiento automático MAFFT v.7 con la opción -auto. Se analizaron las matrices de cada gen por separado, y concatenadas. Para las matrices combinadas se utilizó un único representante por especie. Para cada matriz se infirió el árbol de máxima verosimilitud utilizando el programa IQ-TREE v1.6.1 (NGUYEN *et al.*, 2015 14963; CHERNOMOR *et al.*, 2016 14964). Para ello primero se estimó el mejor esquema de partición y modelo evolutivo correspondiente para cada

Location	Nickname	Sequence	Reference
C1-J-1490	LCOI1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	(FOLMER <i>et al.</i> 1994)
C1-N-2198	HCOI2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	(FOLMER <i>et al.</i> 1994)
C1-N-2191	Nancy	CCCGGTTAAAATATAAACTTC	(SIMON <i>et al.</i> 1994)
C1-J-1751	Ron	GGATCACCTGATATAGCATTCCC	(SIMON <i>et al.</i> 1994)
C1-J-1834	mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	(LERAY <i>et al.</i> 2013)
C1-N-2198	jgHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICRAARAAYCA	(LERAY <i>et al.</i> 2013)
28S	28S-A	GACCCGTCTTGAAACACGGA	(GIRIBET <i>et al.</i> 1999)
28S	28S-B	TCGGAAGGAACGAGCTAC	(GIRIBET <i>et al.</i> 1999)
28S	28S-O	GAAACTGCTCAAAGGTAAACGG	(HEDIN & MADDISON 2001)
28S	28S-C	GGTTCGATTAGTCTTTCCGC	(HEDIN & MADDISON 2001)
28S	28S rD1a	CCC SCG TAA YTT AGG CAT AT	(GIRIBET <i>et al.</i> 1999)

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) y el 28S rRNA (28S).

Table 1. Primers used to amplify the genes cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) and the 28S rRNA (28S).

gen (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2017 14962) y seguidamente se infirió el mejor árbol.

Para la delimitación molecular de especies candidatas se compararon los resultados de diferentes métodos operativos y evolutivos aplicados sobre las secuencias de COI. De los primeros se utilizó el agrupamiento objetivo (MEIER *et al.*, 2006), para el que se utilizó un umbral del 3% de divergencia no corregida tal y como se implementa en el programa *SpeciesIdentifier* (TaxonDNA 1.6.2, MEIER *et al.*, 2006); el *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE *et al.*, 2011), utilizando la versión en línea del programa (<http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) con los valores por defecto de los parámetros y distancia genética no corregida; y el *Barcode Index Number* (BIN) (RATNASINGHAM & HEBERT 2013) analizado en línea en la aplicación proporcionada por BOLD. Los métodos evolutivos empleados fueron los algoritmos GMYC (FUJISAWA & BARRACLOUGH 2013) y el mPTP (KAPLI *et al.*, 2017 14586). Para delimitar los clústeres GMYC se procedió primero a obtener un árbol ultramétrico utilizando para ello el programa BEAST v.1.8.4 (DRUMMOND *et al.*, 2012), definiendo un prior de coalescencia de tamaño poblacional constante, un modelo Yule para el árbol y un reloj relajado lognormal. Se estimó el tamaño relativo de las ramas asignando un valor arbitrario de 1 al parámetro *ucl.d.mean*. La delimitación GMYC se realizó con ayuda del paquete de R *splits*. El método mPTP permite identificar los límites de las especies en función de la longitud de las ramas obtenidas de un solo lugar, sin la necesidad de un árbol ultramétrico, y se ha demostrado que genera resultados más estables que los enfoques alternativos (BLAIR & BRYSON 2017 14961). Se utilizó para ello el árbol de máxima verosimilitud obtenido para el COI. Las distancias genéticas no corregidas (*p-distances*) dentro y entre los grupos identificados por morfología se calcularon en MEGA v.7 (KUMAR *et al.*, 2016). Se utilizó un código de barras de ADN por cada especie putativa para la identificación automática utilizando BOLD (RATNASINGHAM & HEBERT 2007).

Los rasgos funcionales fueron obtenidos de la bibliografía, en especial los referentes a los gremios de estrategias de caza (CARDOSO *et al.*, 2011). Por otra parte, la información proveniente de las capturas semi-cuantitativas nos permitió incorporar información

adicional sobre (1) el mejor microhábitat de las diferentes especies (p.ej. suelo, arbustivas, arbóreas) y (2) su ritmo circadiano (diurnas o nocturnas). Finalmente se tomaron medidas lineales de diferentes partes del cuerpo de 5 individuos por especie. Las medidas incluyen el tamaño y forma, representado por la longitud, anchura y altura del prosoma, que es una aproximación aceptable a la biomasa y además determina otros aspectos relevantes de la vida de los organismos, incluyendo la depredación o la selección sexual, la longitud de la pata (tibia 1) y de las piezas bucales (longitud del segmento basal del quelíceros y de la uña quelicerals) rasgos relevantes en la locomoción y alimentación, respectivamente. Las medidas se obtuvieron para 10 individuos por especie, 5 machos y 5 hembras. La obtención del total de medidas no pudo finalizarse en el transcurso del proyecto y, por tanto, los análisis de estas no han sido incluidos en el presente artículo.

Análisis estadísticos

Para evaluar la similitud en la composición taxonómica y la abundancia relativa de especies de arañas entre las comunidades estudiadas, se crearon diagramas de ordenación a través de escalas multidimensionales no métricas (*non-metric multidimensional scaling*, NMDS) (MCCUNE & GRACE 2002) basadas en matrices de disimilitud de presencia/ ausencia (índice Sørensen) y abundancia relativa (índice Steinhaus) (LEGENDRE & LEGENDRE 1998). Antes de este análisis (y de los siguientes análisis basados en dichas matrices), aplicamos la transformación de Hellinger a los datos para dar menor peso a las especies raras (LEGENDRE & GALLAGHER 2001).

Como técnica de agrupamiento de comunidades (*clustering*), aplicamos el método de varianza mínima de Ward a matrices de disimilitud basadas en la presencia/ ausencia de especies para identificar la similitud en la diversidad y la composición de arañas entre las comunidades (WARD 1963).

Las estructuras de las comunidades se compararon basándose en sus distribuciones de abundancia relativa de las especies, obtenidas mediante el modelo Gambin (UGLAND *et al.*, 2007; MATTHEWS *et al.*, 2014). El modelo Gambin supera a otros modelos, como log-series o lognormal, y su única variable α describe la «dimensionalidad» de las comunidades.

Para comprobar si las diferentes comunidades eran significativamente diferentes, se compararon mediante ANOSIM (índice de Bray-Curtis, con 999 permutaciones) según su región y el tipo de bosque.

Se evaluaron los cambios espaciales en las comunidades de arañas analizando la relación entre el índice (log transformado) de similitud de especies de Sørensen (calculado para cada par de comunidades) y la distancia geográfica entre ellas.

Se investigaron las posibles variables explicativas de los patrones de diversidad taxonómica, funcional y filogenética mediante el encaje de modelos lineares generalizados. Las variables utilizadas fueron parque, elevación, especie de roble dominante, latitud y longitud. Los análisis de patrones de biodiversidad a nivel de comunidad en sus múltiples dimensiones fueron realizados en el entorno R (R CORE TEAM 2016), con los paquetes estadísticos *vegan*, *BAT*, *cluster*, *maptree*, *labdsv*, *car*, *psych* y *effects*.

RESULTADOS

Muestreos

Se muestrearon un total de 16 parcelas de 1 ha cada una, distribuidas en distintos bosques de robles (*Quercus* spp) marcescentes y caducifolios de 6 parques nacionales. En Picos de Europa se muestrearon 2 parcelas de *Quercus petraea* y 2 de *Q. faginea*, en Ordesa 2 parcelas de *Q. subpyrenaica* (*Q. humilis* x *Q. faginea*), en Aigüestortes 2 parcelas de *Q. humilis*, en Monfragüe 2 parcelas de *Q. faginea*, en Cabañeros 2 parcelas de *Q. faginea* y 2 parcelas de *Q. pyrenaica* y en Sierra Nevada 2 parcelas de *Q. pyrenaica* (Fig. 1). Los muestreos se realizaron en los meses de mayo y junio de 2013 en los parques del norte peninsular, y en los mismos meses del 2014 en los del centro y sur. En los muestreos participaron un total de 15 personas, incluyendo investigadores, doctorandos y estudiantes de máster y grado. La información sobre las características de las parcelas muestreadas se resume en la Tabla 2.

Análisis taxonómico

En total se recolectaron 20.539 individuos, 8.521 de los cuales (40%) resultaron ser adultos y pudieron ser identificados a nivel de especie. En total se colectaron 375 especies pertenecientes a 190 géneros

y 39 familias, 342 de las cuales corresponden a especies nominales y el resto a morfotipos provisionalmente no asignados a ninguna especie nominal, entre los que se cuentan hasta 13 nuevas especies (Fig. 2). El listado completo de especies colectadas en el estudio, con su identificación asistida por la información obtenida de los códigos de barras (ver sección siguiente), así como la composición biogeográfica de las comunidades se encuentra disponible en CRESPO *et al.* (2018). Así mismo, puede accederse a un listado actualizado de dichas especies en el siguiente enlace <http://doi.org/10.5281/zenodo.3239089> (ARNEDO *et al.*, 2019).

Catálogo de códigos de barras y delimitación taxonómica molecular

Se obtuvieron un total de 3.207 secuencias del COI y 356 del 28S, representando todas las especies obtenidas en los muestreos. Las secuencias del COI fueron depositadas en BOLD para análisis posteriores, y constituyen, así mismo, la base de un catálogo ibérico para la identificación automática de arañas ibéricas. Las matrices del COI y del 28S se completaron con secuencias disponibles en Genbank para aquellas especies colectadas en las que no se pudieron obtener las secuencias respectivas. En el caso del COI *Pardosa pullata* (Clerck, 1757) (Lycosidae, KY270438.1) y *Stemonyphantes lineatus* (Linnaeus, 1758) (Linyphiidae, KY268612.1) y para el 28S, *Oecobius machadoi* Wunderlich, 1995 (Oecobiidae, FJ607540.1), *Stemonyphantes lineatus* (Linyphiidae, FJ838738.1), *Piratula hygrophila* (Thorell, 1872) (Lycosidae reemplazo de *P. latitans* (Blackwall, 1841), MF410708.1). Además, se incluyó el 28S de *Nemesia caementaria* (Latreille, 1799) (Nemesiidae) disponible en el laboratorio de otro proyecto. En el árbol obtenido del análisis de la matriz concatenada de códigos de barras COI y del 28S (Fig. 3) se observa que, aunque la mayor parte de familias se recuperan como monofiléticas, las relaciones entre las mismas distan de estar bien soportadas. Por esta razón no se ha utilizado todavía la información filogenética obtenida para estimar los índices de diversidad filogenética de las comunidades, y se ha preferido completar dichos análisis con la inclusión de más genes y taxones disponibles en bases de datos públicas de otros estudios (WHEELER *et al.*, 2017; FERNANDEZ *et al.*, 2018). En el momento de la redacción de este artículo, se están realizando dichos análisis combinados.

Parque	Localidad	Tipo roble	Code	Fechas	Vallado	Nombre	Lat	Lon	Altura
Picos de Europa	Monte Robledo	<i>Q. petraea</i>	P1	7-21/6/2013	No	P1T4COR	43.14436357	-4.92601675	1077.3
			PITEST	43.14382595	-4.926774055	1097.7			
			PITEST2	43.14456029	-4.92756648	1052.5			
Picos de Europa	Joyoguelas	<i>Q. faginea</i>	P2	7-22/6/2013	No	P3DEF	43.14525708	-4.926623181	1058.8
			P5T2	43.17810399	-4.905659789	748.7			
			P5T2	43.17751986	-4.904838027	747.5			
Picos de Europa	Las Arroyas	<i>Q. petraea</i>	P3	8-23/6/2013	No	P5TEST2	43.17803132	-4.906564113	779.0
			P5TEST3	43.17719045	-4.906102354	780.7			
			P3DEF2	43.14412577	-4.948488045	1115.2			
Picos de Europa	El Canto	<i>Q. faginea</i>	P3DEF3	43.14358237	No	P3DEF3	43.14358237	-4.949619435	1108.8
			P3DEF4	43.1430057	-4.949031612	1076.3			
			P3DEF	43.14332966	-4.947975073	1088.1			
			P6DEF	43.17179192	-4.908217527	914.3			
			P6DEF2	43.17256247	-4.907816369	940.8			
			P6DEF3	43.17273916	-4.908864778	964.6			
Ordesa	O Fumo	<i>Q. subpyrenaica</i>	P6DEF4	43.17199979	No	P6DEF4	43.17199979	-4.90939334	954.2
			O1DEF	42.60713085	0.131728649	1444.3			
			O1DEF2	42.60666917	0.132078091	1363.7			
			O1DEF3	42.60631101	0.131063629	1366.1			
Ordesa	Rebilla	<i>Q. subpyrenaica</i>	O1DEF4	42.6069565	No	O1DEF4	42.6069565	0.130515536	1412.8
			O2DEF	42.59374143	0.15332303	1125.8			
			O2DEF2	42.59443637	0.153484298	1183.0			
			O2DEF3	42.59493744	0.1525182	1171.2			
Aigüestortes	Sola de Boi 1	<i>Q. humilis</i>	O2DEF4	42.59398308	No	O2DEF4	42.59398308	0.152291218	1152.5
			A1DEF	42.55003693	0.873071942	1787.9			
			A1DEF2SI	42.54980441	0.871844413	1790.3			
			A1DEF3	42.5490803	0.872023199	1738.4			
Aigüestortes	Sola de Boi 2	<i>Q. humilis</i>	A1DEF4	42.54939403	No	A1DEF4	42.54939403	0.873231869	1722.6
			A2DEF2	42.54947425	0.870910836	1766.8			
			A2DEF4	42.54877822	0.87194751	1698.0			
			A2DEF5I	42.54958573	0.871871989	1773.0			
Monfragüe	Peña Falcón	<i>Q. faginea</i>	A2T3	42.54868501	No	A2T3	42.54868501	0.870758202	1717.0
			PMIF1	39.83350938	-6.064440971	298.1			
			PMIF2	39.83312884	-6.063399436	298.6			
			PMIF3	39.83240716	-6.063823225	347.4			

Parque	Localidad	Tipo roble	Code	Fechas	Vallado	Nombre	Lat	Lon	Altura
Monfragüe	Fuente del Frances	<i>Q. faginea</i>	M2	24/5-7/6/2014	No	PM1F4	39,83280413	-6,064752107	338,3
			PM2F1	39,82763576	-6,033088546	334,2			
			PM2F2	39,827562	-6,03191223	350,3			
			PM2F3	39,82844998	-6,031898232	306,5			
Cabañeros	Valle Brezoso	<i>Q. pyrenaica</i>	C1	27/5-9/6/2014	Sí	PC1F1	39,35725895	-4,358736919	751,4
			PC1F2	39,3572421	-4,359453237	763,6			
			PC1F3	39,35605547	-4,359519538	753,8			
			PC1F4	39,35596948	-4,358776985	757,4			
Cabañeros	Valle Brezoso	<i>Q. pyrenaica</i>	C2	27/5-10/6/2014	No	PC2F1	39,35213232	-4,359151907	740,1
			PC2F2	39,35179453	-4,3581325	745,6			
			PC2F3	39,35105089	-4,358693585	736,2			
			PC2F4	39,35140067	-4,359613834	735,3			
Cabañeros	La Quesera	<i>Q. faginea</i>	C3	29/5-11/6/2014	Sí	PC3F1	39,36240259	-4,417332541	768,7
			PC3F2	39,36223872	-4,416455459	769,9			
			PC3F3	39,36106618	-4,417518871	764,69			
			PC3F4	39,361381	-4,418028323	767			
Cabañeros	La Quesera	<i>Q. faginea</i>	C4	28/5-12/6/2014	No	PC4F1	39,36344236	-4,417842077	779,59
			PC4F2	39,3639835	-4,416903639	774,0			
			PC4F3	39,36332879	-4,416325372	769,9			
			PC4F4	39,36270894	-4,41709307	765,8			
Sierra Nevada	Soportujar	<i>Q. pyrenaica</i>	S1	28/5-12/6/2014	No	PS1F1	36,96149745	-3,419654472	1808
			PS1F2	36,962081	-3,418811839	1797,0			
			PS1F3	36,96152947	-3,418013128	1763,9			
			PS1F4	36,96091793	-3,418774372	1777,3			
Sierra Nevada	Camarate	<i>Q. pyrenaica</i>	S2	1-15/6/2014	No	PS2F1	37,18321974	-3,263266766	1689,1
			PS2F2	37,18403564	-3,263498778	1738,6			
			PS2F3	37,18425281	-3,262469899	1732,9			
			PS2F4	37,18358972	-3,26204678	1695,1			

Tabla 2. Localización y descripción de las parcelas muestreadas. Vallado indica si la parcela se delimitó dentro de una zona de exclusión de jabalís y ciervos mediante cercado. Los nombres indican los vértices de la parcela y sus correspondientes coordenadas (Lat N, Lon E) en grados decimales y elevación en metros. Las fechas corresponden al periodo de actividad de las trampas de caída, y el muestreo directo (último día).

Tabla 2. Location and description of the plots sampled in the study. «Vallado» refers to fenced plots against herbivores. «Nombre» refers to the plot corners and corresponding coordinates in decimal degrees and elevation in meters. «Fechas» refers to the active period of the pitfall traps and the day (last) of direct collecting.

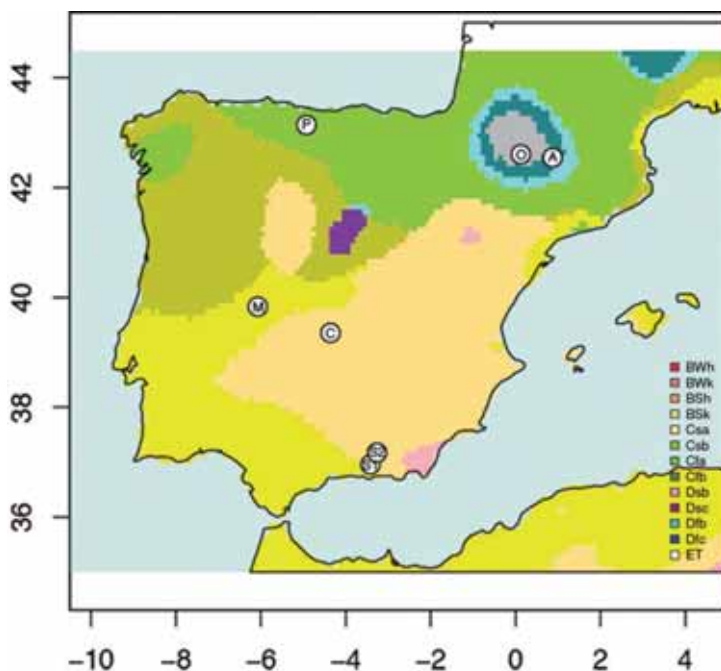


Figura 1. Mapa de la Península Ibérica con las localidades de los Parques Nacionales donde se realizaron los muestreos (círculos) y las zonas climáticas según la clasificación Köppen–Geiger. A: Parc Nacional d’Aigüestortes i Estany de Sant Maurici; C: Parque Nacional de Cabañeros; M: Parque Nacional de Monfragüe; O: Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido; P: Parque Nacional de Picos de Europa; S: Parque Nacional de Sierra Nevada. BWk = Clima desértico frío, BSh = Clima semiárido cálido, BSk = Clima semiárido frío, Csa = Clima mediterráneo de verano, Csb = Clima mediterráneo de verano cálido, Cfa = Clima subtropical húmedo, Cfb = Clima oceánico templado, Dsb = Clima continental seco y seco del verano, Dsc = Clima subártico seco del verano, Dfb = Clima continental húmedo del verano cálido, Dfc = Clima subártico.

Figure 1. Map of the Iberian Peninsula with the location of the plots (circles) and climatic zones after Köppen–Geiger classification. A: Parc Nacional d’Aigüestortes i Estany de Sant Maurici; C: Parque Nacional de Cabañeros; M: Parque Nacional de Monfragüe; O: Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido; P: Parque Nacional de Picos de Europa; S: Parque Nacional de Sierra Nevada. BWk = Arid desert hot, BWk = Arid desert cold, BSh = Arid steppe hot, BSk = Arid steppe cold, Csa = Temperate dry and hot summer, Csb = Temperate dry and warm summer, Cfa = Temperate without dry season and hot summer, Cfb = Temperate without dry season and warm summer, Dsb = Continental dry and warm summer, Dsc = Continental dry and cold summer, Dfb = Continental without dry season and warm summer, Dfc = Continental without dry season and cold summer.

La comparación de la información de los códigos de barras con la proporcionada por los caracteres morfológicos tradicionales facilitó la identificación de algunas especies especialmente complicadas debido a su taxonomía conflictiva o al hecho que solo se contaba con hembras, las cuales en algunos grupos de arañas proporcionan escasos caracteres fenotípicos para su identificación (CRESPO *et al.*, 2018). Así mismo, los códigos de barras proporcionaron información sobre la diversidad genética de las diferentes

especies y sobre su estructuración poblacional, como en el caso de la familia Philodromidae. Se trata de una familia de arañas de diversidad media (cerca de 500 especies en unos 30 géneros) con una distribución mundial. Los filodromídeos muestran una característica disposición laterigrada de las patas y una mancha cardíaca dorsal en el opistosoma. No utilizan la seda para cazar y capturan activamente a sus presas, generalmente en el suelo o sobre la vegetación. Los individuos de esta familia y en especial las hembras



Figura 2. Algunos ejemplos de las especies colectadas en el estudio: A) *Segestria florentina* (Segestriidae), B) *Steatoda triangulosa* (Theridiidae), C) *Synema globosum* (Thomisidae), D) *Mangora acalypha* (Araneidae), E) *Oxyopes* cf. *lineatus* (Oxyopidae), F) *Alopecosa albofasciata* (Lycosidae). Créditos de las fotografías: Marc Domènech

Figure 2. Some examples of species collected in the study: A) *Segestria florentina* (Segestriidae), B) *Steatoda triangulosa* (Theridiidae), C) *Synema globosum* (Thomisidae), D) *Mangora acalypha* (Araneidae), E) *Oxyopes* cf. *lineatus* (Oxyopidae), F) *Alopecosa albofasciata* (Lycosidae). Photo credits: Marc Domènech.

son a menudo difíciles de identificar, con lo que el uso de la información de los códigos de barras puede facilitar enormemente su delimitación e identificación. Se obtuvieron secuencias del COI de 259 especímenes, correspondientes a 149 códigos de barras únicos (haplotipos). La identificación morfológica reveló la existencia de 19 especies nominales correspondientes a 4 géneros: *Philodromus* Walckenaer, 1826 (11 especies), *Pulchellodromus* Wunderlich, 2012 (4 especies), *Thanatus* C. L. Koch, 1837 (3 especies) y *Tibellus* Simon, 1875 (1 especie). Además, se detectó la existencia de un conjunto de hembras de *Philodromus* que no pudo asignarse a ninguna especie nominal (*Philodromus* sp. 18). Los diferentes métodos de delimitación molecular sugirieron la existencia de 20 («umbral 3%») y ABGD), 21 (m-PTP), 23 (BINS) y 24 (GMYC) clústeres genéticos, respectivamente, todos ellos compatibles con las especies nominales (Fig. 4). En algunos

casos las especies nominales quedaban escindidas en más de un clúster (*Ph. aureolus* (Clerck, 1757), *Ph. rufus* Walckenaer, 1826, *Th. atratus* Simon, 1875 y *Th. vulgaris* Simon, 1870). Sin embargo, los clústeres obtenidos no se correspondían a unidades geográficas, lo que sugiere que dicha estructuración es fruto de la alta variabilidad genética de algunas especies, tal y como confirman los mayores valores de divergencias intraespecíficas observados en estas especies (1,1; 1; 0,8 y 1,6%; respectivamente). El resto de las especies mostraron valores de divergencia intraespecífica inferiores al 0.5%. Las menores divergencias interespecíficas se observaron entre las especies *Ph. praedatus* O. Pickard-Cambridge, 1871 y *Ph. sp.18* (5,4%) y entre las especies *Pu. pulchellus* (Lucas, 1846) y *Pu. glaucinus* (Simon, 1870) (5,1%). La divergencia media entre las especies de cada género fue del 9,7; 7,3 y 13,2%, respectivamente.

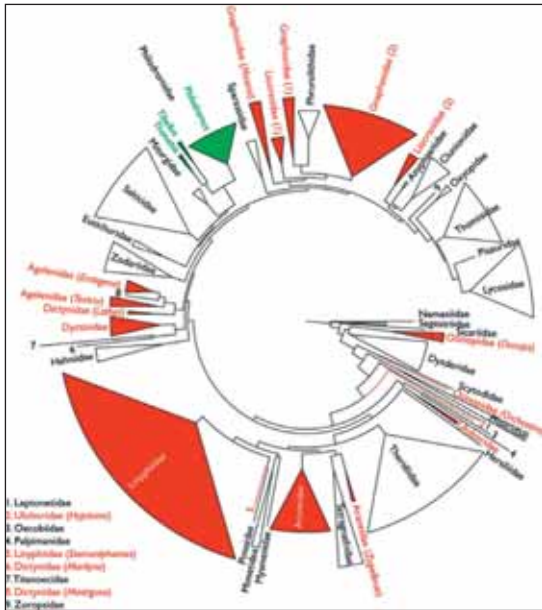


Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud obtenido con IQTREE para la matriz concatenada del COI+28S. Las especies de las mismas familias han sido colapsadas. Los clados, ramas y terminales en rojo indican familias que no fueron recuperadas como monofiléticas. En verde los tres géneros recolectados de la familia Philodromidae.

Figure 3. Maximum likelihood tree of the concatenated COI+28S matrix obtained with IQTREE. Species have been collapsed by family. Clade, branches and terminals in red refer to families recovered as non-monophyletic. Clade in green corresponded to the three genera of Philodromidae collected in the study.

Para 9 de las especies nominales se obtuvieron identificaciones automáticas en BOLD (secuencias identificadas con una similitud igual o mayor al 99%) coincidentes con nuestras identificaciones morfológicas. Otras 8 especies no contaban con representación en BOLD y, por tanto, los códigos generados en el presente estudio contribuyen a completar la librería de código de barras. El resto de las especies, aunque representadas en BOLD, mostraron divergencias mayores al umbral establecido para la asignación automática de la identificación ($\leq 1\%$). Por ejemplo, las secuencias de *Ph. emarginatus* (Schrank, 1803) mostraron una similitud del 93.52%, con conspecíficos de Finlandia, Noruega y Rusia. El morfotipo *Philodromus* sp. 18 presenta un caso interesante. Las secuencias de dicho morfotipo fueron identificadas como *Ph. praedatus* (similitud $>99\%$). Sin embargo, se observó que en el árbol de distancias para la identificación generado por BOLD, los códigos identificados como *Ph. praedatus* formaban dos clústeres independientes, uno que incluía la práctica totalidad de códigos de dicha especie provenientes de localidades distribuidas por distintos puntos de Europa, incluyendo las identificadas en nuestro estudio, y un segundo clúster formado por 2 especímenes de Alemania, 1 de Eslovenia y un código identificado como *Ph. longi-*

palpis. Estos datos sugieren que *Philodromus* sp. 18 o bien es *Ph. longipalpis* Simon, 1870 (si dicho código es correcto) o bien se trata de una nueva especie.

Diversidad de las comunidades

El estimador no paramétrico Chao 1 sugiere que el valor observado de especies correspondería a una estima de 454 especies, indicando que se capturó el 84% de las especies presentes en las 16 comunidades. Las comunidades de arañas en los bosques de *Q. faginea* de Picos de Europa fueron las más ricas en especies, seguidas por las comunidades de bosques de *Q. subpyrenaica* de Ordesa y las de bosques de *Q. faginea* de Cabañeros (Tabla T1). El porcentaje de especies capturadas según las estimaciones de Chao 1 en las 16 comunidades variaron entre 60-82% (Tabla T1).

Similitudes entre las comunidades

Las diferencias en la composición y abundancia de especies entre las 16 comunidades permiten agruparlas según el tipo de bosque al que pertenecen, pero, sobre todo, según el parque nacional donde fueron recolectadas. El análisis NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*, índice de similitud Steinhaus)

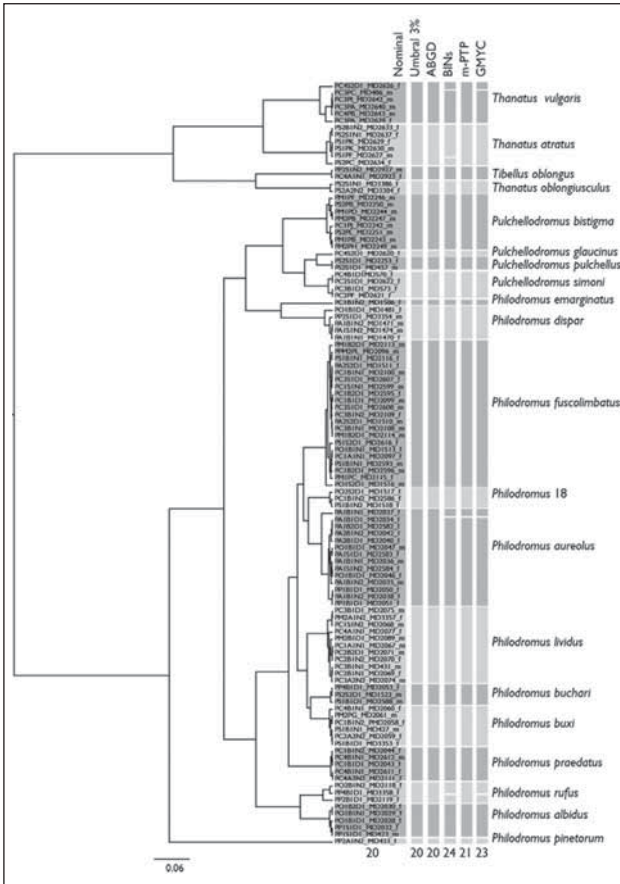


Figura 4. Árbol Bayesiano ultramétrico obtenido con BEAST a partir de los códigos de barras únicos obtenidos para la familia Philodromidae. Las barras al lado de las etiquetas corresponden a las delimitaciones genéticas obtenidas con los diferentes modelos utilizados (operacionales: umbral del 3% de distancia genética, ABGD, BINs, y evolutivos: m-PTP y GMYC). Los nombres de las especies nominales se indican a la derecha de las delimitaciones moleculares. Números al pie de las barras indican el número de clúster obtenido con cada modelo.

Figure 4. Ultrametric Bayesian tree inferred with BEAST for the unique DNA barcodes generated for the family Philodromidae. Bars indicate genetic delimitation under alternative methods (operational: 3% threshold, ABGD and BINs, and evolutionary, m-PTP and GMYC). Species names on the right side of the bars refer to nominal species. Numbers at the bottom refer to the number of clusters delimited with each method.

muestra las comunidades pertenecientes al mismo parque cercanas, lo que indica que son similares en cuanto a composición de especies y abundancias relativas (Fig. 5). Estas comunidades están también separadas a lo largo del eje principal (Dim1) según su localización geográfica, ya sea en el norte (Picos de Europa, Ordesa y Aigüestortes) o en el sur (Sierra Nevada, Cabañeros y Monfragüe) de la Península Ibérica. Dichas agrupaciones aparecen también en el análisis de grupos (*clustering analysis*), donde las comunidades de arañas aparecen agrupadas primero según su localización en la península ibérica (norte/sur) y después según el parque nacional al que pertenecen (Fig. 6). A pesar de que el Parque Nacional de Sierra Nevada se encuentra en una zona termoclimática oromediterránea, sus comunidades de arañas son más similares a las de zonas cercanas, pero con condiciones mesomediterráneas –Cabañeros y

Monfragüe–. El análisis de las distribuciones de las abundancias de especies (modelos Gambin) también indican que las comunidades residentes en el mismo tipo de bosque y en la misma región presentan estructuras de comunidad similares (Fig. 7).

El análisis de similitudes entre las diferentes comunidades (ANOSIM) corrobora que las diferencias entre las comunidades son significativas cuando se agrupan por parque ($R=0.99$, $p=0.001$) pero no según el tipo de bosque ($R=0.28$, $p=0.04$).

Patrones espaciales de diversidad

En cuanto a los cambios espaciales en las comunidades, la mayor parte de la diversidad beta se debe al reemplazo de especies (turnover) y no a la exclu-

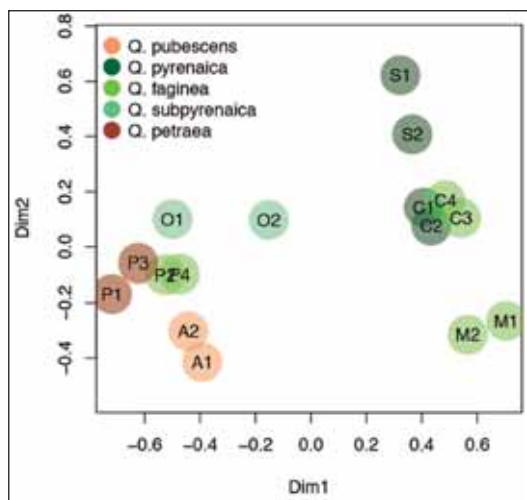


Figura 5. Gráfico NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) a partir de los índices de similitud Steinhaus entre comunidades de parques (código de letras) y tipos de bosques (colores).

Figure 5. NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) plot based on Steinhaus similarity indexes between communities of different parks (letter codes) and forest types (colors).

sión o solapamiento de especies (nestedness) (Jaccard total beta diversity=0.94, turnover=0.93, nestedness=0.01; Sorensen total beta diversity=0.89, turnover=0.87, nestedness=0.02). Las diferencias en la composición de especies entre las comunidades incrementan logarítmicamente con la distancia geográfica ($R^2=0.78$, $p<0.001$) (Fig.8).

Diversidad filogenética y diversidad funcional

Desgraciadamente, en el momento de la redacción de este capítulo, no contamos todavía con la información completa para poder estimar de forma precisa la diversidad filogenética de las comunidades estudiadas (ver sección de Material y Métodos). A modo de análisis preliminar, contrastamos la posibilidad de usar la jerarquía taxonómica como un sustituto de la información filogenética, mediante la construcción de un árbol cuyos distintos niveles corresponden a los distintos niveles taxonómicos (CARDOSO *et al.*, 2015). Los resultados indican que esta aproximación no constituye una buena alternativa, ya que básicamente

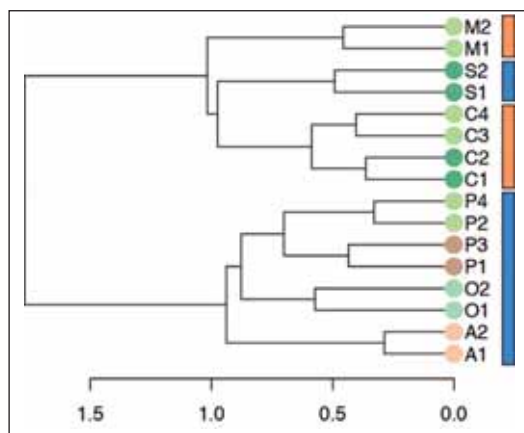


Figura 6. Análisis de agrupamiento (*clustering*) de comunidades de arañas utilizando la varianza mínima de Ward en los datos de presencia/ ausencia. Los rectángulos de la derecha representan las zonas oromediterráneas (azul) y mesomediterráneas (naranja) a las cuales corresponden las ubicaciones de las comunidades.

Figure 6. Cluster analysis of spider communities based on Ward's minimum variance obtained from absence/ presence data. Boxes on right side indicate the corresponding termo-climatic areas (Orange: Mesomediterranean, Blue: Oromediterranean).

refleja los mismos resultados de la riqueza taxonómica (Fig. 9). Por otra parte, realizamos algunos análisis exploratorios de la diversidad funcional estimada a partir de la información obtenida de los muestreos (hábitat, temporalidad de la actividad) y de la literatura (gremio de caza). Los resultados, aunque preliminares, reflejan patrones distintos a los de la diversidad taxonómica, tanto en lo referente a las estimas de diversidad (Fig. 9) como a los de reemplazamiento (datos no mostrados). En este último caso los patrones sugieren un reemplazamiento más atenuado (menor pendiente de la correlación con la distancia) en el caso de la diversidad funcional, congruente con nuestras expectativas de una mayor conservación de la riqueza funcional.

Factores determinantes de los patrones de diversidad

El análisis preliminar de las variables explicativas disponibles (parque, elevación, especie de roble dominante, latitud y longitud), sugieren que la diversidad taxonómica y la filogenética están fuertemen-

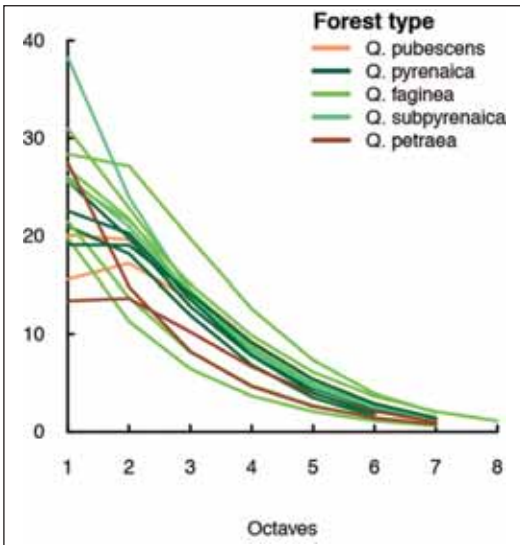


Figura 7. El análisis de las distribuciones de las abundancias de especies (modelos Gambin) acorde a la especie de roble dominante en cada parcela.

Figure 7. Species abundance distribution analyses (Gambin models) based on the dominant oak-tree species in each plot.

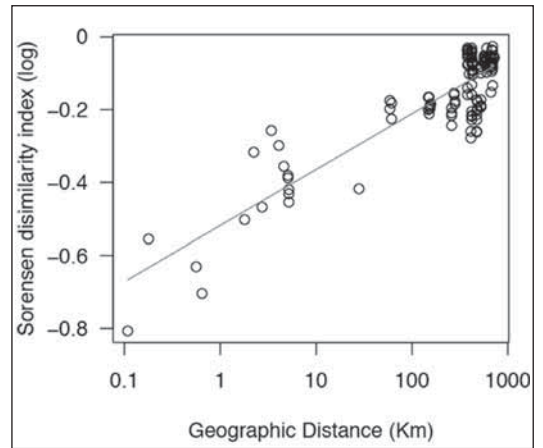


Figura 8. Relación entre el índice de similaridad de Sørensen entre cada par de comunidades (log transformada) y su distancia geográfica (km).

Figure 8. Relationship between pairwise community Sorensen similarity index and the geographic distance between communities (km, log-transformed).

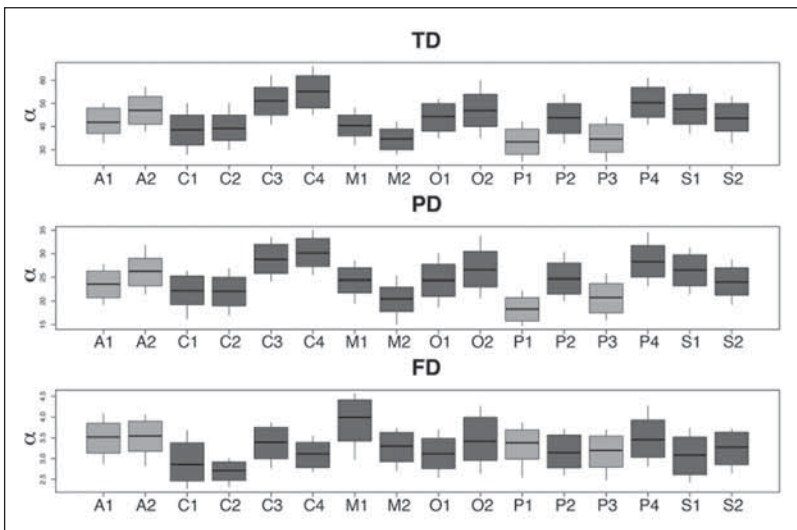


Figura 9. Valores de riqueza taxonómica, filogenética (jerarquía taxonómica) y funcional por parcela. Las barras oscuras corresponden a bosques marcescentes y las claras a caducifolios.

Figure 9. Taxonomic, phylogenetic (taxonomic hierarchy) and functional diversity per plot. Dark bars indicate semi-evergreen woods and light boxes deciduous woods.

te correlacionadas y en ambos casos sus patrones están fundamentalmente explicados por el parque, la longitud, que puede estar asociada hasta cierto punto con la historia geológica, y el tipo de bosque, siendo los bosques de *Q. faginea* los más diversos. En el caso de la diversidad funcional, los principales factores son el parque, con valores relativos similares a los observado con la diversidad taxonómica, aunque más extremos, y la latitud, positivamente, y la longitud, negativamente (Fig. 10).

DISCUSIÓN

El presente estudio ha contribuido a mejorar substancialmente el conocimiento de la fauna de arañas de los parques nacionales españoles. En este sentido, se han generado y proporcionado a la dirección de los parques listados de las especies de las arañas, y su abundancia y distribución espacial, que habitan en los robledales. Cabe también destacar que, con excepción de Picos de Europa (JIMENEZ-SEGURA *et al.*, 2017) y Cabañeros (BARRIGA *et al.*, 2007), la información que se tenía de las comunidades de arañas en los mismos era prácticamente inexistente. Al menos 13 de los morfotipos encontrados seguramente representan nuevas especies (de las familias Dysderidae, Oonopidae, Gnaphosidae, Liocranidae y Zodariidae). A nivel faunístico, se destaca la primera cita para la península ibérica de 7 especies: *Dictyna pusilla* Thorell, 1856; *Agyneta orites* (Thorell, 1875); *Philodromus buchari* Kubco-

vá, 2004; *Pseudeuophrys nebrodensis* Alicata & Cantarella, 2000; *Euryopis flavomaculata* (C. L. Koch, 1836); *Euryopis sexalbomaculata* (Lucas, 1846) y *Titanoeca schineri* L. Koch, 1872, y de tres nuevas citas para España: *Dipoena torva* (Thorell, 1875), *Sardinidion blackwalli* (O. Pickard-Cambridge, 1871) y *Zora silvestris* Kulczyński, 1897. Además, en el presente estudio se describen por primera vez las hembras de *Phrurolinillus tibialis* (Simon, 1878) y *Nigma gratiosa* (Simon, 1881). Estos resultados demuestran la excelente eficiencia y productividad de los protocolos COBRA no solo para obtener listados de especies, sino también para proporcionar información cuantitativa sobre su abundancia y aspectos funcionales tales como el nicho hábitat, los ciclos de actividad y la estrategia de caza, y, potencialmente, para la monitorización de comunidades.

Por otra parte, los resultados de este estudio proporcionan criterios para la racionalización de la estrategia de áreas protegidas y la detección del impacto de prácticas de explotación. La agrupación de comunidades según parque y no bosque sugiere que los factores regionales (clima, cubierta, gestión de suelo, historia evolutiva) y los procesos relacionados (el filtro de especies a partir del *pool* regional de especies) tienen una influencia mayor que los factores locales (estructura física del hábitat, composición de especies de plantas, etc.). Esta interpretación coincide con una de las hipótesis de nuestro proyecto: el clima es en gran medida, el factor determinante en la configuración de los patrones de

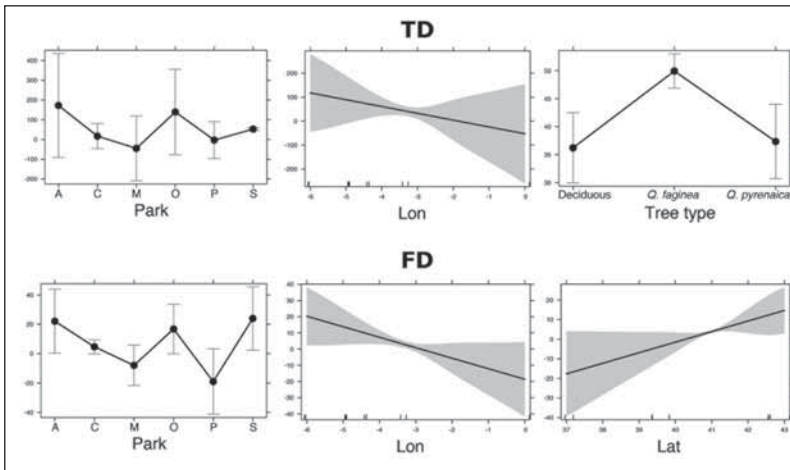


Figura 10. Efectos de las variables en los modelos lineares generalizados seleccionados. Las variables incluidas fueron parque, elevación, tipo de robledal, latitud y longitud.
Figure 10. Effects of the variables selected in the selected generalised linear models. Explanatory variables were park, elevation, oak tree type, latitude and longitude.

diversidad en arañas. Por otra parte, los resultados reflejan cambios relativamente abruptos entre las comunidades de los diferentes parques, causados por las considerables distancias geográficas entre las localidades. El análisis comparativo de la riqueza taxonómica de las comunidades estudiadas sugiere pues que los factores a nivel de macroescala, fundamentalmente los climáticos y probablemente los históricos, son los principales determinantes de la diversidad de las comunidades, por encima de factores locales. Estos datos indican que la estrategia óptima para proteger la mayor diversidad posible es maximizar la distribución del número de áreas protegidas, por encima de la protección de uno u otro hábitat particular. Desde el punto de vista de la conservación de la aracnofauna ibérica, estos resultados aconsejan que para maximizar el número de especies conservadas se debería crear una red de áreas protegidas ampliamente distribuida por la península ibérica, que priorizara la protección de

diferentes zonas climáticas por encima de la consideración de hábitats específicos dentro de cada área.

La clasificación de las diferentes especies según su distribución u origen permite ver que las comunidades del norte de la península ibérica están dominadas por especies paleárticas, mientras que en las del sur las especies ibéricas y, especialmente, las mediterráneas tienen una mayor presencia (CRESPO *et al.*, 2018, en bibliografía figura 2013). Merece la pena señalar la presencia de especies cosmopolitas (especies con distribuciones a nivel global), sobre todo en las comunidades de Monfragüe y Cabañeros, lo que quizás pueda estar relacionado con un mayor uso y manejo del hábitat natural, ya sea por explotación directa o por el impacto de especies roneadoras y, por tanto, de una mayor alteración (Tabla 3), algo que debería tenerse en cuenta también en el desarrollo de los planes de gestión de los parques.

Localidad	Individuos	Adultos	Juveniles (número)	Juveniles (%)	Especies observadas	Especies estimadas (Chao 1)	Especies capturadas (%)
A1	1010	578	432	43%	65	79.11	82%
A2	959	509	450	47%	73	107.93	68%
C1	2900	694	2206	76%	74	94.87	78%
C2	2039	487	1552	76%	63	101.81	62%
C3	1162	375	787	68%	76	118.61	64%
C4	1539	450	1089	71%	86	120.53	71%
M1	965	269	696	72%	53	90.50	59%
M2	799	272	527	66%	45	95.60	47%
O1	1226	542	684	56%	78	118.14	66%
O2	1015	608	407	40%	93	137.38	68%
P1	817	503	314	38%	51	72.26	71%
P2	1415	851	564	40%	85	129.78	65%
P3	835	453	382	46%	60	99.20	60%
P4	1586	909	677	43%	101	131.69	77%
S1	1031	421	610	59%	70	94.90	74%
S2	1243	602	641	52%	71	98.23	72%

Tabla 3. Riqueza y abundancia de especies de las localidades estudiadas. Adultos: número de adultos; Juveniles (número): número de inmaduros; Juveniles (%): porcentaje de individuos inmaduros del total; Especies observadas; Especies estimadas (Chao 1): especies estimadas mediante el estimador Chao 1; Especies capturadas (%): porcentaje de las especies capturadas respecto a la estima de especies totales. Para abreviaciones de las localidades ver texto.

Table 3. Species richness and abundance per locality. Adultos: number of adult specimens; Juveniles (número): number of immature specimens; Juveniles (%): percentage of immature specimens out of total specimens; Especies observadas; species richness observed; Especies estimadas (Chao 1): estimated species richness using the ChaoI estimator; Especies capturadas (%): percentage of collected species out of estimated total. See text for locality abbreviations.

Este proyecto ha sentado las bases para el desarrollo de un sistema automático de identificación que permita la identificación de arañas de los parques nacionales por no expertos. Debemos destacar que se ha diseñado a partir de los datos obtenidos en este estudio, y otros trabajos realizados con métodos de muestreo semi-cuantitativos similares, un protocolo optimizado (CARDOSO *et al.*, 2016) para la monitorización de áreas cuya diversidad haya sido previamente caracterizada. La integración de métodos automatizados de identificación y de protocolos optimizados de monitoreo permitirá en el futuro utilizar las parcelas donde se han desarrollado el presente estudio como estaciones de seguimiento de posibles cambios en la comunidad de arañas de estas. Dichos cambios pueden ser indicadores de perturbaciones antropogénicas, ya sea de tipo climático (calentamiento global) o biológico (introducción de especies invasoras, exceso de ramoneo). A diferencia de los planes de seguimientos de especies concretas desarrollados en otros organismos, los métodos aquí propuestos permiten analizar comunidades completas. Además, en el caso particular de las arañas, se ha demostrado que estas son especialmente sensibles a cambios en la composición del resto de la comunidad y por tanto, son excelentes indicadores de la existencia de perturbaciones en el ecosistema.

Conclusiones

Se ha demostrado que la conciliación de métodos de muestreo semi-cuantitativos con la información proporcionada por los códigos de barras de DNA proporcionan una herramienta útil para abordar el estudio de los patrones de diversidad a nivel de comunidad, en sus múltiples dimensiones, de organismos megadiversos. Se ha caracterizado la riqueza y abundancia de las comunidades de arañas de los robledales de la mayor parte de parques de la península, y se ha construido la librería de códigos de barras que permitirá la identificación automática de nuevos individuos colectados. En lo referente a los patrones de diversidad encontrados, se ha observado que los principales determinantes de la riqueza de las comunidades de arañas de robledales en la península ibérica son las variables climáticas y probablemente, la historia geológica parti-

cular, por encima de factores locales como el tipo de hábitat. Estos resultados sugieren que la mejor estrategia para maximizar la preservación de la biodiversidad es maximizar la distribución geográfica de las áreas protegidas, en lugar de priorizar hábitats específicos. Finalmente, los datos recopilados han permitido diseñar un protocolo optimizado para poder monitorear dicha diversidad en el tiempo, proporcionando una nueva herramienta para la detección precoz de cambios en el ecosistema. Aún más importante, el establecimiento de estos protocolos permite que este trabajo sea realizado por técnicos de los parques sin la necesidad de depender de instituciones externas.

AGRADECIMIENTOS

Estamos profundamente agradecidos a todas las personas que contribuyeron a las diferentes etapas en el desarrollo de este proyecto. Cristina Frías-López, Nuria Macías-Hernández, Eva De Mas, Paola Mazzuca, Elisa Mora, Vera Opatova, Enric Planas, Marcos Roca-Cusachs, Dolores Ruiz, Pedro Sousa y Vanina Tonzo participaron en las campañas de recolección. Youcef Alioua, Raquel García Sarrión, Iratxe Uribarri y Najet Dimassi asistieron en la clasificación e identificación inicial de las muestras. Raquel Alvarez, Paola Mazzuca y Alba Enguñados generaron la información del código de barras del ADN. Los siguientes directores y administradores de parques otorgaron los permisos y proporcionaron instalaciones para la recolección en los parques: Miguel M. de la Hoz (Picos de Europa), Elena Villagrasa (Ordesa), María Merced Aniz Montes (Aigüestortes), Ángel Rodríguez Martín (Monfragüe), Ángel Gómez Manzanque (Cabañeros) y Blanca Ramos Losada (Sierra Nevada). Así mismo, agradecemos el apoyo logístico que nos brindaron los guardas y agentes de los distintos parques. Josep M. Ninot, Jose Luis Benito, Álvaro Bueno, Gerard Giménez Pérez y Jordi Vayreda nos guiaron en la selección de las parcelas del parque en las primeras etapas del proyecto. Este estudio fue financiado por el Organismo Autónomo Parques Nacionales (OAPN # 485/2012). Recibimos financiación adicional del proyecto 2014SGR1604 del Gobierno de Cataluña.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNEDO, M.A.; MALUMBRES-OLARTE, J.; DOMÈNECH, M.; CRESPO, L.C.; CARDOSO, P.; MOYA-LARAÑO, J.; RIBERA, C. 2019. Updated checklist of the spider (arachnida, araneae) communities associated to white oak woodlands in spanish national parks (version 2.0). Zenodo <http://doi.org/10.5281/zenodo.3239089>.
- AUSTERLITZ, F.; DAVID, O.; SCHAEFFER, B.; BLEAKLEY, K.; OLTEANU, M.; LEBLOIS, R.; VEUILLE, M.; LAREDO, C. 2009. DNA barcode analysis: A comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics* 10(Suppl 14): S10.
- BARRIGA, J. C.; JIMENEZ-VALVERDE, A.; MORANO, E.; MELIC, A.G.M.A. 2007. Arañas de la provincia de ciudad real (arachnida: Araneae) (castilla la mancha, españa). 1-18.
- BLAIR, C.; BRYSON, R.W., JR. 2017. Cryptic diversity and discordance in single-locus species delimitation methods within horned lizards (phrynosomatidae: Phrynosoma). *Mol Ecol Resour* 17(6): 1168-1182.
- BRANCO, V. V.; MORANO, E.; CARDOSO, P. 2019. An update to the Iberian spider checklist (Araneae). *Zootaxa*, 4614(2), 201-55. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4614.2.1>
- CABEZA, M.; ARAUJO, M.B.; WILSON, R.J.; THOMAS, C.D.; COWLEY, M.J.R.; MOILANEN, A. 2004. Combining probabilities of occurrence with spatial reserve design. *Journal of Applied Ecology* 41: 252-262.
- CARDOSO, P. 2008. Biodiversity and conservation of iberian spiders: Past, present and future. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 42: 487-492.
- CARDOSO, P. 2009. Standardization and optimization of arthropod inventories—the case of iberian spiders. *Biodiversity and Conservation* 18(14): 3949-3962.
- CARDOSO, P.; CARVALHO, J.C.; CRESPO, L.C.; ARNEDO, M.A. 2016. Optimal inventorying and monitoring of taxon, phylogenetic and functional diversity. *bioRxiv*.
- CARDOSO, P.; GASPAR, C.; PEREIRA, L.C.; SILVA, I.; HENRIQUES, S.S.; DA SILVA, R.R.; SOUSA, P. 2008. Assessing spider species richness and composition in mediterranean cork oak forests. *Acta Oecologica* 33(1): 114-127.
- CARDOSO, P.; HEIKKINEN, L.; JALKANEN, J.; KOHONEN, M.; LEPONIEMI, M.; MATTILA, L.; OLLONEN, J.; RANKI, J.-P.; VIROLAINEN, A.; ZHOU, X.; PAJUNEN, T. 2017. Standardized spider (arachnida, araneae) inventory of hankoniemi, finland. *Biodiversity Data Journal* 5.
- CARDOSO, P.; PEKÁR, S.; JOCQUÉ, R.; CODDINGTON, J. A. 2011. Global patterns of guild composition and functional diversity of spiders. *PLoS ONE* 6(6): e21710.
- CARDOSO, P.; RIGAL, F.; CARVALHO, J.C. 2015. Bat - biodiversity assessment tools, an r package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution* 6(2): 232-236.
- CARDOSO, P.; SCHARFF, N.; GASPAR, C.; HENRIQUES, S.S.; CARVALHO, R.; CASTRO, P.H.; SCHMIDT, J.B.; SILVA, I.; SZÜTS, T.; DE CASTRO, A.; CRESPO, L. C. 2008. Rapid biodiversity assessment of spiders (araneae) using semi-quantitative sampling: A case study in a mediterranean forest. *Insect Conservation and Diversity* 1(2): 71-84.
- CARDOSO, P.; SILVA, I.; DE OLIVEIRA, N.G.; SERRANO, A.R.M. 2007. Seasonality of spiders (araneae) in mediterranean ecosystems and its implications in the optimum sampling period. *Ecological Entomology* 32(5): 516-526.
- CARVALHO, J.C.; CARDOSO, P.; CRESPO, L.C.; HENRIQUES, S.; CARVALHO, R.; GOMES, P. 2010. Determinants of beta diversity of spiders in coastal dunes along a gradient of mediterraneity. *Diversity and Distributions* 17(2): 225-234.

- CARVALHO, J.C.; CARDOSO, P.; CRESPO, L.C.; HENRIQUES, S.; CARVALHO, R.; GOMES, P. 2011. Biogeographic patterns of spiders in coastal dunes along a gradient of mediterraneity. *Biodiversity and Conservation* 20(4): 873-894.
- CAVENDER-BARES, J.; KOZAK, K.; FINE, P.; KEMBEL, S. 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12(7): 693-715.
- CHERNOMOR, O.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. 2016. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Syst Biol* 65(6): 997-1008.
- CODDINGTON, J.; GRISWOLD, C.E.; DÁVILA, D.S.; PEÑARANDA, E.; LARCHER, S.F. (1991). Designing and testing sampling protocols to estimate biodiversity in tropical ecosystems. En: E. C. DUDLEY (ed.), *The unity of evolutionary biology: Proceedings of the fourth international congress of systematics and evolutionary biology* (pp. 44-60). Discorides Press. Place.
- COLWELL, R.K.; CODDINGTON, J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 345(1311): 101-118.
- CRESPO, L.C.; DOMÈNECH, M.; ENGUÍDANOS, A.; MALUMBRES-OLARTE, J.; CARDOSO, P.; MOYA-LARAÑO, J.; FRÍAS-LÓPEZ, C.; MACÍAS-HERNÁNDEZ, N.; DE MAS, E.; MAZZUCA, P.; MORA, E.; OPATOVA, V.; PLANAS, E.; RIBERA, C.; ROCA-CUSACHS, M.; RUIZ, D.; SOUSA, P.; TONZO, V.; ARNEDO, M.A. 2018. A DNA barcode-assisted annotated checklist of the spider (arachnida, araneae) communities associated to white oak woodlands in spanish national parks. *Biodiversity Data Journal* 6(e29443): 1-273.
- CRESPO, L.C.; SILVA, I.; BORGES, P.A.V.; CARDOSO, P. 2013. Rapid biodiversity assessment, faunistics and description of a new spider species (araneae) from desertas islands and madeira (portugal). *Revista ibérica de Aracnología* 23: 11-23.
- DAILY, G.C.; MATSON, P.A. 2008. Ecosystem services: From theory to implementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9455-9456.
- DEVICTOR, V.; MOUILLOT, D.; MEYNARD, C.; JIGUET, F.; THUILLER, W.; MOUQUET, N. 2010. Spatial mismatch and congruence between taxonomic, phylogenetic and functional diversity: The need for integrative conservation strategies in a changing world. *Ecology Letters*: no-no.
- DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with beauty and the beast 1.7. *Molecular Biology And Evolution*.
- ELDRIDGE, N. 2001. The sixth extinction. American Institute of Biological Sciences, Washington, DC Available from <http://www.actionbioscience.org/newfrontiers/eldredge2.html>.
- ENTLING, W.; SCHMIDT, M.H.; BACHER, S.; BRANDL, R.; NENTWIG, W. 2007. Niche properties of central european spiders: Shading, moisture, and the evolution of the habitat niche. *Global Ecology and Biogeography* 16(6): 440-448.
- FAITH, D.P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61(1): 1-10.
- FERNANDEZ, R.; KALLAL, R.J.; DIMITROV, D.; BALLESTEROS, J.A.; ARNEDO, M.A.; GIRIBET, G.; HORMIGA, G. 2018. Phylogenomics, diversification dynamics, and comparative transcriptomics across the spider tree of life. *Current Biology* 28(9): 1489-+.
- FERRIER, S.; POWELL, G.V.N.; RICHARDSON, K.S.; MANION, G.; OVERTON, J.M.; ALLNUTT, T.F.; CAMERON, S.E.; MANTLE, K.; BURGESS, N.D.; FAITH, D.P. 2004. Mapping more of terrestrial biodiversity for global conservation assessment. *BioScience* 54: 1101-1109.
- FINCH, O.-D.; BLICK, T.; SCHULDT, A. 2008. Macroecological patterns of spider species richness across europe. *Biodiversity and Conservation* 17: 2849-2868.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.

- FOREST, F.; GRENYER, R.; ROUGET, M.; DAVIES, T.; COWLING, R.; FAITH, D.; BALMFORD, A.; MANNING, J.; PROCHE, S.; BANK, M.; REEVES, G.; HEDDERSON, T.; SAVOLAINEN, V. 2007. Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445: 757 - 760.
- FRANCO, J.D.A. (1990). *Quercus*. En: S. CASTROVIEJO *et al.* (eds.), *Flora ibérica* (Vol. 2, pp. 16-36). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Place.
- FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T.G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology* 62(5): 707-724.
- GARCÍA, I.; MEJÍAS, P.J. (2009). 9230. Robledales de quercus pyrenaica y robledales de *quercus robur* y *quercus pyrenaica* del noroeste ibérico. En: VV.AA. (ed.), *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España*. (pp. 66). Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Place.
- GASTON, K.J. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405: 220-227.
- GIRIBET, G.; RAMBLA, M.; CARRANZA, S.; BAGUÑA, J.; RIUTORT, M.; RIBERA, C. 1999. Phylogeny of the arachnid order Opiliones (Arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18S and partial 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(2): 296-307.
- HEBERT, P.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270.
- HEDIN, M.; MADDISON, W. P. 2001. A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily Dendryphantinae (Araneae: Salticidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18(3): 386-403.
- HOOPER, D.U.; CHAPIN III, F.S.; EWEL, J.J.; HECTOR, A.; INCHAUSTI, P.; LAVOREL, S.; LAWTON, J.H.; LODGE, D.M.; LOREAU, M.; NAEEM, S. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75(1): 3-35.
- JIMENEZ-SEGURA, M.M.; MORANO, E.; MÉNDEZ-IGLESIAS, M. 2017. Arañas epigeas (Araneae) de matorrales y roquedos del antiguo Parque Nacional de la Montaña de Covadonga (norte de España). *Revista Ibérica de Aracnología* 31: 97-105.
- KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B.Q.; WONG, T.K.F.; VON HAESLER, A.; JERMIIN, L.S. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 14(6): 587-589.
- KAPLI, P.; LUTTEROPP, S.; ZHANG, J.; KOBERT, K.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A.; FLOURI, T. 2017. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics* 33(11): 1630-1638.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. 2012. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- KREMEN, C.; COLWELL, R.K.; ERWIN, T.L.; MURPHY, D.D.; NOSS, R.F.; SANJAYAN, M.A. 1993. Terrestrial arthropod assemblages: Their use in conservation planning. *Conservation Biology* 7(4): 796-808.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. 2016. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874.
- LAMOREUX, J.F.; MORRISON, J.C.; RICKETTS, T.H.; OLSON, D.M.; DINERSTEIN, E.; MCKNIGHT, M.W.; SHUGART, H.H. 2005. Global tests of biodiversity concordance and the importance of endemism. *Nature* 440: 212-214.

- LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129(2): 271-280.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. 1998. *Numerical ecology* (second ed.). Elsevier B. V. Amsterdam, The Netherlands.
- LERAY, M.; YANG, J.Y.; MEYER, C.P.; MILLS, S.C.; AGUDELO, N.; RANWEZ, V.; BOEHM, J.T.; MACHIDA, R.J. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial *coi* region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* 10(1): 1-1.
- LOREAU, M.; NAEEM, S.; INCHAUSTI, P.; BENGTSSON, J.; GRIME, J.P.; HECTOR, A.; HOOPER, D.U.; HUSTON, M.A.; RAFFAELLI, D.; SCHMID, B. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science* 294(5543): 804-808.
- MALUMBRES-OLARTE, J.; CRESPO, L.; CARDOSO, P.; SZÚTS, T.; FANNES, W.; PAPE, T.; SCHARFF, N. 2018. The same but different_ equally megadiverse but taxonomically variant spider communities along an elevational gradient. *Acta Oecologica*, 88, 19-28. <http://doi.org/10.1016/j.actao.2018.02.012>
- MALUMBRES-OLARTE, J.; SCHARFF, N.; PAPE, T.; CODDINGTON, J. A.; CARDOSO, P. 2017. Gauging megadiversity with optimized and standardized sampling protocols: A case for tropical forest spiders. *Ecology and Evolution*, 7(2), 494-506. <http://doi.org/10.1002/ece3.2626>
- MARAÑÓN, T.; PÉREZ-RAMOS, I.M. (2009). 9240. Robledales ibéricos de *quercus faginea* y *quercus canariensis*. En: VV.AA. (ed.), Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. (pp. 66). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Place.
- MARC, P.; CANARD, A.; YSNEL, F. 1999. Spiders (araneae) useful for pest limitation and bioindication. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 229-273.
- MATTHEWS, T.J.; BORREGAARD, M.K.; UGLAND, K.I.; BORGES, P.A.V.; RIGAL, F.; CARDOSO, P.; WHITTAKER, R. J. 2014. The gambin model provides a superior fit to species abundance distributions with a single free parameter: Evidence, implementation and interpretation. *Ecography* 37(10): 1002-1011.
- MCCUNE, B.; GRACE, J.B. 2002. *Analysis of ecological communities*. MjM Software Design. Glenden Beach, Oregon.
- MEIER, R.; SHIYANG, K.; VAIDYA, G.; NG, P. 2006. DNA barcoding and taxonomy in diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55(5): 715-728.
- MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. 2005. *Ecosystems and human well-being: Biodiversity synthesis*. World Resources Institute. Washington, DC.
- MORANO, E.; BRANCO, V.V.; CARRILLO, J.; CARDOSO, P. (2018). Iberian spider catalogue (v4.0). Available online at <http://www.Biodiversityresearch.Org/iberia>.
- NEW, T.R. 1999. Untangling the web: Spiders and the challenges of invertebrate conservation. *Journal of Insect Conservation* 3: 251-256.
- NGUYEN, L.T.; SCHMIDT, H.A.; VON HAESLER, A.; MINH, B.Q. 2015. Iq-tree: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32(1): 268-274.
- NOVOTNY, V.; BASSET, Y. 2000. Rare species in communities of tropical insect herbivores: Pondering the mystery of singletons. *Oikos* 89: 564-572.
- OLALDE, M.; HERRÁN, A.; ESPINEL, S.; GOICOECHEA, P.G. 2002. White oaks phylogeography in the Iberian peninsula. *Forest Ecology and Management* 156(1-3): 89-102.
- OLIVER, I.; BEATTIE, A. 1996. Designing a cost-effective invertebrate survey: A test of methods for rapid assessment of biodiversity. *Ecological Applications* 6: 594-607.

- PETCHEY, O.L.; GASTON, K.J. 2006. Functional diversity: Back to basics and looking forward. *Ecol Lett* 9(6): 741-758.
- PETIT, R.J.; BREWER, S.; BORDÁCS, S.; BURG, K.; CHEDDADI, R.; COART, E.; COTTRELL, J.; CSAIKL, U.M.; VAN DAM, B.; DEANS, J.D. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of european white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156(1-3): 49-74.
- PIRES, A.C.; MARINONI, L. 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through integrative taxonomy: A view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica* 10(2): 339-346.
- POWELL, J.R.; MONAGHAN, M.T.; ÖPIK, M.; RILLIG, M. C. 2010. Evolutionary criteria outperform operational approaches in producing ecologically relevant fungal species inventories. *Molecular Ecology* 20(3): 655-666.
- PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. 2011. Abgd, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. no-no.
- R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D. 2007. Bold: The barcode of life data system (www.Barcodinglife.Org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. 2013. A DNA-based registry for all animal species: The barcode index number (bin) system. *PLoS ONE* 8(7): e66213.
- RODRIGUES, A. S. L.; GASTON, K. J. 2002. Maximising phylogenetic diversity in the selection of networks of conservation areas. *Biological Conservation* 105: 103-111.
- SCHARFF, N.; CODDINGTON, J.; GRISWOLD, C.E.; HORMIGA, G.; DE PLACE BJORN, P. 2003. When to quit? Estimating spider species richness in a northern european deciduous forest. *Journal of Arachnology* 31: 246-273.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87(6): 651-701.
- SMITH, M.A.; FISHER, B. L. 2009. Invasions, DNA barcodes, and rapid biodiversity assessment using ants of mauritius. *Frontiers in Zoology* 6(1): 31.
- SRIVASTAVA, D.S.; VELLEND, M. 2005. Biodiversity-ecosystem function research: Is it relevant to conservation? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36(1): 267-294.
- STRAUSS, S.Y.; WEBB, C.O.; SALAMIN, N. 2006. Exotic taxa less related to native species are more invasive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5841-5845.
- UGLAND, K.I.; LAMBSHEAD, P.J.D.; MCGILL, B.; GRAY, J.S.; O'DEA, N.; LADLE, R.J.; WHITTAKER, R.J. 2007. Modelling dimensionality in species abundance distributions: Description and evaluation of the gambin model. *Evolutionary Ecology Research* 9(2): 313-324.
- VAMOSI, S.M.; HEARD, S. B.; VAMOSI, J. C.; WEBB, C. O. 2009. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Molecular Ecology* 18(4): 572-592.
- WARD, J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58(301): 236-244.
- WEBB, C.O.; ACKERLY, D.D.; MCPEEK, M.A.; DONOGHUE, M.J. 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 475-505.

- WHEELER, W.C.; CODDINGTON, J.A.; CROWLE, L.M.; DIMITROV, D.; GOLOBOFF, P.A.; GRISWOLD, C.E.; HORMIGA, G.; PRENDINI, L.; RAMIREZ, M.J.; SIERWALD, P.; ALMEIDA-SILVA, L.; ALVAREZ-PADILLA, F.; ARNEDO, M.A.; SILVA, L.R.B.; BENJAMIN, S.P.; BOND, J.E.; GRISMADO, C.J.; HASAN, E.; HEDIN, M.; IZQUIERDO, M.A.; LABARQUE, F.M.; LEDFORD, J.; LOPARDO, L.; MADDISON, W.P.; MILLER, J. A.; PIACENTINI, L.N.; PLATNICK, N.I.; POLOTOW, D.; SILVA-DAVILA, D.; SCHARFF, N.; SZUTS, T.; UBICK, D.; VINK, C. J.; WOOD, H.M.; ZHANG, J. 2017. The spider tree of life: Phylogeny of araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics* 33(6): 574-616.
- WINTER, M.; SCHWEIGERA, O.; KLOTZA, S.; NENTWIG, W.; ANDRIOPOULOS, P.; ARIAN-OUTSUD, M. *et al.*, 2009. Plant extinctions and introductions lead to phylogenetic and taxonomic homogenization of the european flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21721-21725.
- WISE, D.H. 1993. *Spiders in ecological webs*. Cambridge University Press. Cambridge; New York.
- YEN, A.L.; BUTCHER, R.J. 1997. *An overview of the conservation of non-marine invertebrates in australia*. Environment Australia. Canberra, Australia.
- ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29(22): 2869-2876.
- ZHOU, X.; ADAMOWICZ, S. J.; JACOBUS, L.M.; DEWALT, R.E.; HEBERT, P.D. 2009. Towards a comprehensive barcode library for arctic life - ephemeroptera, plecoptera, and trichoptera of churchill, manitoba, canada. *Frontiers in Zoology* 6(1): 30.