

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 18/02/2024.

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

---

**SISTEMÁTICA DO GÊNERO *Vitalius* LUCAS, SILVA & BERTANI:  
EVIDÊNCIAS MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E BIOGEOGRÁFICAS**

**ARTHUR GALLETI LIMA**

**Janeiro - 2022**

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

---

SISTEMÁTICA DO GÊNERO *Vitalius* LUCAS, SILVA & BERTANI: EVIDÊNCIAS  
MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E BIOGEOGRÁFICAS

ARTHUR GALLETI LIMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).  
Orientador: José Paulo Leite Guadanucci

L732s	<p>Lima, Arthur Galleti</p> <p>Sistemática do gênero <i>Vitalius</i> Lucas, Silva &amp; Bertani: evidências morfológicas, moleculares e biogeográficas / Arthur Galleti Lima. -- Rio Claro, 2022</p> <p>148 p. : tabs., fotos, mapas</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: José Paulo Leite Guadanucci</p> <p>1. Caranguejeiras. 2. Morfometria. 3. Contornos fechados. 4. UCE's. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: **SISTEMÁTICA DO GÊNERO *Vitalius* LUCAS, SILVA & BERTANI: EVIDÊNCIAS MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E BIOGEOGRÁFICAS**

**AUTOR: ARTHUR GALLETI LIMA**

**ORIENTADOR: JOSE PAULO LEITE GUADANUCCI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSE PAULO LEITE GUADANUCCI (Participação Virtual)  
Departamento de Biodiversidade / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. NELSON FERRETTI (Participação Virtual)  
CERZOS-CONICET, UNS / Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida - Província de Buenos Aires - Argentina

Prof. Dr. GUILHERME HENRIQUE FERNANDES DE AZEVEDO (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / San Diego State University - CA - Estados Unidos

Prof. Dr. FACUNDO MARTÍN LABARQUE (Participação Virtual)  
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCar - Universidade Federal de São Carlos - SP

Prof. Dr. EDUARDO M SOTO (Participação Virtual)  
Departamento de Ecología, Genética y Evolución / Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires - Argentina

Rio Claro, 18 de fevereiro de 2022

Dedico esta tese a todos que me incentivaram e ensinaram.

## **Agradecimentos**

Inicialmente agradeço aos meus pais, Meisa e Mello, que desde a infância sempre incentivaram e acreditaram no meu desejo de ser biólogo. Também agradeço ao meu irmão Matheus, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando de todas as formas e minha namorada Thamiris, por todo companheirismo e carinho ao longo destes anos. Além deles, agradeço a cada membro da minha família, aos que estão aqui e aos que partiram, vocês sempre estarão comigo ao longo deste caminho.

Agradeço ao meu orientador José Paulo Leite Guadanucci, pela amizade, companheirismo e por me ensinar e direcionar nos caminhos da carreira acadêmica, e também sua família.

Agradeço ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, ao antigo Departamento de Zoologia e ao Departamento de Biodiversidade, por todos estes anos de Pós-graduação. Também agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento deste doutorado (nº processo 168493/2017-9) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento de algumas coletas através do projeto “Sistemática morfológica e molecular e biogeografia de aranhas Mygalomorphae da Mata Atlântica”, processo nº 2017/11985-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - (Exigência cláusula 7ª Portaria CTA nº 03/2019 – FAPESP).

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Leonardo Carvalho e Pedro Taucce, e aos membros da banca de defesa Nelson Ferretti, Guilherme Azevedo, Facundo Labarque e Eduardo Sotto.

Agradeço a todos os curadores das coleções científicas, Antonio Domingos Brescovit (IBSP), Ricardo Ott (MCN), Renato Teixeira (PUC-RS) e Ricardo Pinto da Rocha (MZUSP), por disponibilizarem acesso as coleções e por toda ajuda com os empréstimos dos materiais.

Agradeço aos supervisores, administradores e funcionários dos Parques e Florestas nacionais e estaduais onde realizei as expedições científicas, além dos órgãos ICMBio e COTEC, pela prestação das licenças de coleta.

Agradeço ao Prof. Dr. Chris Hamilton, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e

Nematologia, da Universidade de Idaho, Moscou, Idaho, EUA, por financiar as extrações e sequenciamentos das amostras para a análise filogenômica, além de todo o ensinamento e ajuda ao longo destes anos. Thanks, Chris!

Agradeço também aos meus amigos de muitos anos por todo apoio e amizade, em especial Guilherme Castiglioni, Felipe Kastein e Rafael Govone, e ao irmão que a vida me deu, Murilo Bazon. Conseguimos finalizar o doutorado, irmão!

Agradeço também aos meus colegas e amigos de laboratório, Vivian Montemor, Giullia Rossi, Julia Ayumi, Juliana Jurgilas, Everton Trova, Maria Tereza, Ian Meireles e Heloisa Silvério pelos momentos divertidos e descontraídos, além da ajuda nas coletas e análises, também ao Pedro Henrique Martins pelas fotos doadas, coletas e discussões e a Millke Jasmine, pelas discussões e coletas. Agradeço ao meu amigo Hector Gonzales Filho, por toda ajuda ao longo destes oito anos de amizade, além das pontuais sugestões nos textos desta tese. Também aos meus amigos Victor Ghirotto, Wolf Moeller e Leandro Malta Borges pelas ajudas nas coletas e contribuições com amostras frescas para as análises moleculares. Agradeço também ao meu amigo Rafael Fonseca Ferreira pelas coletas sensacionais e também por me ajudar em diversas análises presentes neste trabalho. Finalmente, agradeço ao meu amigo Rafael Prezzi Indicatti, quem muito me ensinou e auxiliou sobre taxonomia de aranhas caranguejeiras, bem como nas diversas coletas, e também agradeço a sua esposa, Barbara Gambaré.

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por toda força, fé e amparo durante minha vida.

“(...) Ora, enquanto que o nosso planeta, obedecendo à lei fixa da gravitação, continua a girar na sua órbita, uma quantidade infinita de belas e admiráveis formas, saídas de um começo tão simples, não têm cessado de se desenvolver e desenvolvem-se ainda!”.  
(Charles Darwin)

## Resumo

Atualmente *Vitalius* é constituído por dez espécies que ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil e na província de Misiones, Argentina. Esses animais apresentam grande homogeneidade morfológica, dificultando a distinção entre espécies próximas ou mesmo mascarando a existência de diversidade genética. Esses problemas podem ser sanados com estudos integrativos com dados morfométricos e moleculares. Este trabalho buscou avaliar caracteres morfométricos que suportem a distinção entre espécies de *Vitalius*, propor uma hipótese de relacionamento evolutivo entre as espécies de *Vitalius* e testar a monofilia de uma linhagem de aranhas Theraphosinae através de filogenômica. Este trabalho foi dividido em quatro capítulos: I. Além da morfologia descritiva: diferenciação morfogeométrica de duas espécies de *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae); II. A busca por limites morfológicos: a diferenciação de duas espécies de aranhas Theraphosinae usando Análise Elíptica de Fourier; III. Biogeography and morphometrics to delimitate two species of *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae); IV. A evolução de uma linhagem de aranhas Theraphosinae e as relações entre espécies de *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae): uma visão filogenômica. Os resultados morfométricos possibilitaram a identificação de indivíduos pertencentes a *V. roseus* (Mello-Leitão, 1923) que apresentam caracteres morfogeometricamente distintos, além de evidenciar que caracteres utilizados em diagnoses de forma descritiva, como os esternos, devem ser tratados de forma morfométrica. Ainda foi possível o esclarecimento de dúvidas taxonômicas voltadas à forma do bulbo copulador masculino de *P. sazimai* Fukushima, Nagahama & Bertani, 2011 e *V. nondescriptus* (Mello-Leitão, 1926) e a diferenciação de *V. paranaensis* Bertani, 2001 e *V. vellutinus* (Mello-Leitão, 1923), que outrora não apresentavam caracteres morfológicos suficientes para a diferenciação de suas fêmeas. Por fim, foi apresentado uma análise filogenômica consistente para a linhagem de aranhas Theraphosinae com quilhas retrolateral e subapical, indicando a monofilia do clado. Este trabalho possibilita a discussão da importância de estruturas taxonômicas em grupos com poucos caracteres morfológicos diagnósticos e que são baseados muitas das vezes em caracteres

subjetivos, além de esclarecer com base em metodologia molecular as relações evolutivas de um importante grupo constituinte de Theraphosinae, criando subsídios para mais estudos envolvendo essas aranhas e contribuindo para o conhecimento acerca da evolução da família Theraphosidae.

**Palavras-chave:** caranguejeiras, morfometria, contornos fechados, UCE's

## Abstract

Currently, *Vitalius* is constituted by ten species that occur in the south and southeast regions of Brazil and Misiones, Argentina. These animals have high morphological homogeneity, turning it difficult to distinguish between closely related species or even masking the existence of genetic diversity. These problems can be solved with integrative studies with morphometric and molecular data. This work objective to evaluate morphometric characters that support the distinction between *Vitalius* species, to propose a hypothesis of an evolutionary relationship between *Vitalius* species and to test the monophyly of a lineage of Theraphosinae spiders using phylogenomics. This work was divided into four chapters: I. Besides the descriptive morphology: morphogeometric differentiation of two species of *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae; Theraphosidae); II. The search for morphological limits: the differentiation of two Theraphosinae spiders using Elliptic Fourier Analysis; III. Biogeography and morphometrics to delimitate two species of *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae); IV. The evolution of a Theraphosinae spider lineage and the relationships between *Vitalius* species Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae): a phylogenomic view. The morphometric results allowed the identification of individuals belonging to *V. roseus* (Mello-Leitão, 1923) that present morphogeometrically distinct characters, in addition to showing that characters used in descriptive diagnoses, such as the sternum, must be treated in a morphometric way. It was also possible to clarify taxonomic doubts regarding the shape of the male copulatory bulb of *P. sazimai* Fukushima, Nagahama & Bertani, 2001 and *V. nondescriptus* (Mello-Leitão, 1926) and the differentiation of *V. paranaensis* Bertani, 2001 and *V. vellutinus* (Mello-Leitão, 1923), which in the past did not have enough morphological characters to differentiate their females. Finally, a consistent phylogenomic analysis was presented for the lineage of Theraphosinae spiders with retrolateral and subapical keels, indicating the clade monophyly. This work makes it possible to discuss the importance of taxonomic structures in groups with few diagnostic morphological characters and which are often based on subjective characters, in addition to clarifying, based on molecular methodology, the evolutionary relationships of an important group of Theraphosinae,

creating subsidies for more studies involving these spiders and contributing to the knowledge about the evolution of the Theraphosidae family.

**Keywords:** Tarantulas, morphometry, closed contours, UCE's

## SUMÁRIO

Introdução geral .....	10
Infraordem Mygalomorphae .....	10
Família Theraphosidae.....	10
Subfamília Theraphosinae .....	11
Gênero <i>Vitalius</i> .....	13
Espécies Crípticas.....	15
Técnicas morfométricas para delimitação de espécies .....	16
Técnicas moleculares para delimitação de espécies .....	19
Objetivos.....	20
Referências bibliográficas .....	21
Capítulo I: Além da morfologia descritiva: diferenciação morfogeométrica duas espécies de <i>Vitalius</i> Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae) .....	31
Resumo .....	31
Introdução .....	32
Material e métodos .....	33
Resultados.....	36
Discussão.....	42
Conclusões.....	43
Referências bibliográficas.....	43
Anexo I.....	45
Anexo II.....	47
Capítulo II. A busca por limites morfológicos: a delimitação de duas espécies de aranhas Theraphosinae usando Análise Elíptica de Fourier .....	51
Resumo.....	51
Introdução.....	52
Material e métodos.....	53
Resultados.....	53
Discussão.....	56
Conclusões.....	57
Referências bibliográficas.....	57
Anexo I.....	58

Capítulo III. Biogeography and morphometrics to delimitate two species of <i>Vitalius</i> Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae).....	60
Abstract.....	60
Introduction.....	61
Material and Methods.....	62
Results.....	64
Discussion.....	65
Figures.....	67
References.....	76
File S1.....	79
File S2.....	84
File S3.....	98
Capítulo IV. A evolução de uma linhagem de aranhas Theraphosinae e as relações entre espécies de <i>Vitalius</i> (Mygalomorphae; Theraphosidae): uma visão filogenômica.....	101
Resumo.....	101
Introdução.....	102
Material e métodos.....	104
Resultados.....	106
Discussão.....	110
Conclusões.....	133
Referências bibliográficas.....	133
Anexo I.....	140
Considerações finais.....	142

## **Introdução geral**

### **INFRAORDEM MYGALOMORPHAE**

As aranhas Mygalomorphae, conhecidos popularmente como caranguejeiras, tarântulas (internacionalmente), aranhas de alçapão, aranhas de teia de lençol, aranhaçu (comunicação pessoal) apresentam cerca de 3000 espécies descritas atualmente (WORLD SPIDER CATALOG, 2021). A infraordem está dividida em 31 famílias, sendo elas: Actinopodidae, Anamidae, Atracidae, Atypidae, Antrodiaetidae, Barychelidae, Bemmeridae, Ctenizidae, Cyrtoucheniidae, Dipluridae, Euagridae, Euctenizidae, Entypesidae, Halonoproctidae, Hexathelidae, Hexurellidae, Idiopidae, Ischnothelidae, Macrothelidae, Mecicobothriidae, Megahexurellidae, Microhexuridae, Microstigmatidae, Migidae, Nemesiidae, Paratropididae, Porrhothelidae, Pycnothelidae, Rhytidicolidae, Stasimopidae e Theraphosidae (RAVEN, 1985; BOND et al., 2012; HEDIN et al., 2018; GODWIN et al., 2018; HEDIN et al., 2019; OPATOVA et al., 2020; MONTES-DE-OCA et al., 2022).

### **FAMÍLIA THERAPHOSIDAE**

Dentre as famílias de Mygalomorphae, Theraphosidae constitui a mais diversificada e possui mais de mil espécies descritas (WORLD SPIDER CATALOG, 2021). São aranhas com representantes de hábitos arborícolas e terrestres (a grande maioria), que vivem dentro de tocas, sob troncos caídos e pedras (BERTANI, 2001). Esta família passa por diversos problemas em sua sistemática, sendo considerado como um pesadelo taxonômico (RAVEN, 1990). Isto se dá principalmente pelo fato de muito exemplares terem sido descritos com base em amostras coletadas em expedições do século XIX e que não estão disponíveis para novas revisões atualmente (FUKUSHIMA et al., 2008). Somado a esta problemática, as aranhas Theraphosidae apresentam uma morfologia com alta homogeneidade, além de espécies com grande distribuição biogeográfica (RAVEN, 1990).

As aranhas Theraphosidae possuem uma classificação baseada em estruturas morfológicas diversas, como por exemplo órgãos estridulatórios, proporção do tamanho das pernas em relação ao restante do corpo, disposição de escópula e olhos, padrões de coloração

(SIMON, 1892; POCOCK, 1903; MELLO-LEITÃO, 1923; GERSCHMAN de PIKELIN & SCHIAPELLI, 1979; RAVEN, 1985; SMITH, 1995, PRENTICE, 1997, GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018, 2019), tipos de cerdas urticantes (COOKE et al., 1972, PÉREZ-MILES et al. 1996), formato da espermateca (SCHIAPELLI & GERSCHMAN de PIKELIN, 1962) e formato do bulbo copulador, bem como apófises tibiais (BÜCHERL, 1957; RAVEN, 1985; PÉREZ-MILES et al., 1996; BERTANI, 2001, GUADANUCCI, 2014). Em sua hipótese filogenética com base em caracteres morfológicos, Guadanucci (2014) considerou Theraphosidae como um grupo monofilético, sustentado pela presença de lóbulos dos címbios com tamanhos semelhantes, ausência de rastelos, maxilas com lóbulos pronunciados anteriormente, tarsos com grandes tricobótrios clavados e dispostos em duas linhas paralelas, além dos artículos apicais das fiandeiras posteriores serem digitiformes. Os representantes terafosídeos foram classificados em um total de 11 subfamílias (RAVEN, 1985; GALLON & GABRIEL, 2006; GUADANUCCI, 2014), sendo elas Thrigmopoeinae e Ornithoctoninae endêmicos da Ásia; Eumenophorinae, Stromatopelminae e Harpactirinae do continente africano; Selenogyrinae da África e Índia; Theraphosinae, Aviculariinae e Schismatothelinae endêmica das Américas; Selenocosmiinae da Austrália, Ásia e Américas; e finalmente Ischnocolinae *stricto sensu*, com espécies nas Américas e África.

Um novo estudo de Theraphosidae foi realizado em 2019, por Foley e colaboradores, quando estes desenvolveram, através de dados de transcriptoma, uma análise para entenderem o relacionamento de suas subfamílias. Neste trabalho, foram recuperados o monofiletismo de Theraphosidae e a não monofilia de Ischnocolinae (como em Guadanucci, 2014), além de apontarem evidências moleculares para a criação de duas novas subfamílias, que antes eram questionadas morfológicamente: Psalmopoeinae e Poecilotheriinae.

### **SUBFAMÍLIA THERAPHOSINAE**

A subfamília Theraphosinae é a mais diversa e distribuídas por toda Região Neotropical (América Central, América do Sul, Sul do México e ilhas do Caribe), porém também em regiões temperadas como Estados Unidos e Norte do México (PÉREZ-MILES & PERAFÁN, 2020).

Atualmente a subfamília inclui 68 gêneros e mais de 500 espécies (WORLD SPIDER CATALOG, 2021). As aranhas Theraphosinae constituem um grupo monofilético, sustentado pelas seguintes sinapomorfias: presença de quilhas no êmbolo dos bulbos copuladores, subtegulum estendido sobre o tegulum e presença de cerdas urticantes (tipos I, III, IV, V, VI ou VII) (RAVEN, 1985; PÉREZ-MILES et al., 1996; GUADANUCCI, 2014; KARDEKA et al., 2019). O primeiro trabalho a propor um estudo evolutivo dos gênero Theraphosinae foi desenvolvido por Pérez-Miles et al. (1996), que através da codificação de 27 caracteres morfológicos, propuseram que o grupo fosse considerado monofilético. No início do século XXI, um estudo desenvolvido por Bertani (2000), que descreveu diferentes quilhas encontradas nos bulbos copuladores de machos de 60 espécies de Theraphosinae, possibilitou a inclusão de novos caracteres morfológicos para serem codificados em novas análises filogenéticas para a subfamília. Em 2001, Bertani propões uma nova análise filogenética para gêneros sul americanos de Theraphosinae, com o desenvolvimento de uma nova matriz morfológica. Recentemente estas duas hipóteses filogenéticas foram investigadas por Galleti-Lima & Guadanucci (2018), quando testaram o relacionamento evolutivo de aranhas Theraphosinae, com a introdução de caracteres de cerdas estridulatórias, Perafán et al. (2016), quando estes descreveram o gênero *Kankuamo* Perafán, Galvis & Gutiérrez e Perafán & Valencia-Cuellar (2018), com a descrição de uma nova espécie de *Proshapalopus* Mello-Leitão, 1923.

Os gêneros de Theraphosinae são divididos em dois grandes grupos de acordo com Perafán et al. (2016), sendo os gêneros que apresentam cerdas urticantes tipo IV (*Bumba* Pérez-Miles, Bonaldo & Miglio, 2014, *Euathlus* Auserrer 1875, *Grammostola* Simon, 1892, *Homoeomma* Auserrer, 1871, *Melloleitaina* Gerschman & Schiapelli, 1960, *Phrixotrichus* Pocock, 1901, *Plesiopelma* Pocock, 1901, *Thrixopelma* Schmidt, 1994, *Tmesiphantes* Simon, 1892) e os que apresentam cerdas urticantes tipo I (*Acanthoscurria*, Auserrer, 1871, *Aphonopelma* Pocock, 1901, *Brachypelma* Simon, 1891, *Citharacanthus* Pocock, 1901, *Clavopelma* Chamberlin, 1940, *Cyrtopholis* Simon, 1892, *Eupalaestrus* Pocock, 1901, *Lasiodora* C. L. Koch, 1850, *Megaphobema* Pocock, 1901, *Metriopelma* Becker, 1878, *Nhandu* Lucas, 1983, *Pamphobeteus* Pocock, 1901, *Phormictopus* Pocock, 1901, *Sericopelma* Auserrer, 1875, *Sphaerobothria* Karsch,

1879, *Vitalius*, *Xenesthis* Simon, 1891).

## O GÊNERO *VITALIUS*

Estabelecido a partir de espécies brasileiras que anteriormente pertenciam a *Pamphobeteus*, o gênero *Vitalius* foi descrito por Lucas, Silva & Bertani (1993), quando estes as compararam com espécimes do Equador, Colômbia e Bolívia, detectando diferenças morfológicas entre eles. Sua etimologia é uma homenagem ao Dr. Vital Brazil, fundador do Instituto Butantan de São Paulo, Brasil. Lucas, Silva & Bertani (1993) propuseram a seguinte diagnose para *Vitalius*: machos com êmbolo com pequenas cristas, uma delas forma um espinho afiado; êmbolo sem aspecto côncavo/convexo; metatarso I que se fecha exteriormente à apófise tibial, que é formado por dois esporões; espermateca formada por dois receptáculos, originados de uma base comum.

Em 2001, Bertani revisou o gênero com base em caracteres morfológicos, e propôs uma atualização para a diagnose original: êmbolo com uma quilha subapical triangular nos machos, ausência de cerdas estridulatórias, espermateca com dois receptáculos separados por uma base fortemente esclerotizada, e pela ausência de cerdas urticantes tipo III nas fêmeas. Neste trabalho foram incluídas nove espécies para o gênero: *V. buecherli* Bertani, 2001, *V. dubius* Mello-Leitão, 1923, *V. longisternalis* Bertani, 2001, *V. lucasae* Bertani, 2001, *V. paranaensis* Bertani, 2001, *V. roseus* Mello-Leitão, 1923, *V. sorocabae* Mello-Leitão, 1923, *V. vellutinus* Mello-Leitão, 1923 e *V. wacketi* Mello-Leitão, 1923. Já em 2012, Bertani e colaboradores incluíram no gênero a espécie *Vitalius nondescriptus* Mello-Leitão, 1926, com ocorrência no estado de Minas Gerais, Brasil. Esta espécie apresenta uma quilha subapical nos bulbos dos machos bem desenvolvida, semelhante às encontradas nas outras espécies de *Vitalius* e nos gêneros *Nhandu* Lucas, 1983 e *Lasiadora* C. L. Koch, 1850. Inclusive, esta semelhança no bulbo copulador foi verificada por Galleti-Lima & Guadanucci (2018) para a espécie *Pterinopelma sazimai* Bertani, Nagahama & Fukushima, 2011, que se apresentou relacionada aos gêneros *Nhandu* e *Vitalius* e distante das outras espécies de *Pterinopelma* Pocock, 1901.

Atualmente o gênero é constituído por dez espécies, sendo que todas ocorrem no Brasil,

distribuídas pelos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 1). Além disso, existe registro para as espécies *V. paranaensis*, *V. longisternalis* e *V. roseus* para a província de Misiones, na Argentina (BERTANI, 2001; FERRETTI et al., 2014; FERRETTI et al., 2015). Segundo Bertani (2001), a biogeografia dessas aranhas está relacionada a eventos geológicos históricos das regiões sul e sudeste do Brasil, que promoveram as formações da Serra do Mar, da Serra da Mantiqueira e da depressão periférica no limite leste da bacia do Paraná. Além disso, Bertani (2001) aponta que a geomorfologia e a variação vegetal do estado de São Paulo são responsáveis pela simpatria das espécies *V. vellutinus*, que ocorre em uma área de planalto ocidental, com vegetação típica de floresta tropical, *V. sorocabae*, ocorrendo em área de Depressão Periférica, com vegetação de cerrado, *V. dubius* e *V. buercheli*, ambas ocorrendo em área de Planalto Atlântico, com vegetação de floresta tropical latifoliada e *V. wacketi*, ocorrendo na Serra do Mar, com vegetação típica floresta tropical latifoliada. Além disso, Bertani (2001) indica em suas análises filogenéticas que a espécie *V. roseus*, que ocorre no Rio Grande do Sul, é irmã da espécie *V. vellutinus*, que ocorre em São Paulo, sendo que elas estão relacionadas filogeneticamente com a espécie *V. paranaensis*, que ocorre no Paraná.

A morfologia das espécies de *Vitalius*, bem como de outros Theraphosidae, é altamente homogênea, muitas vezes baseadas em caracteres descritivos, e que por apresentar casos de simpatria, podem gerar erros de identificação e problemas na codificação de matrizes filogenéticas morfológicas. Esses erros são gerados, principalmente, devido aos exemplares estarem depositados em álcool de coleções científicas, que acabam perdendo características de coloração, cerdas e espinhos corporais, caracteres comumente utilizados para suas identificações.

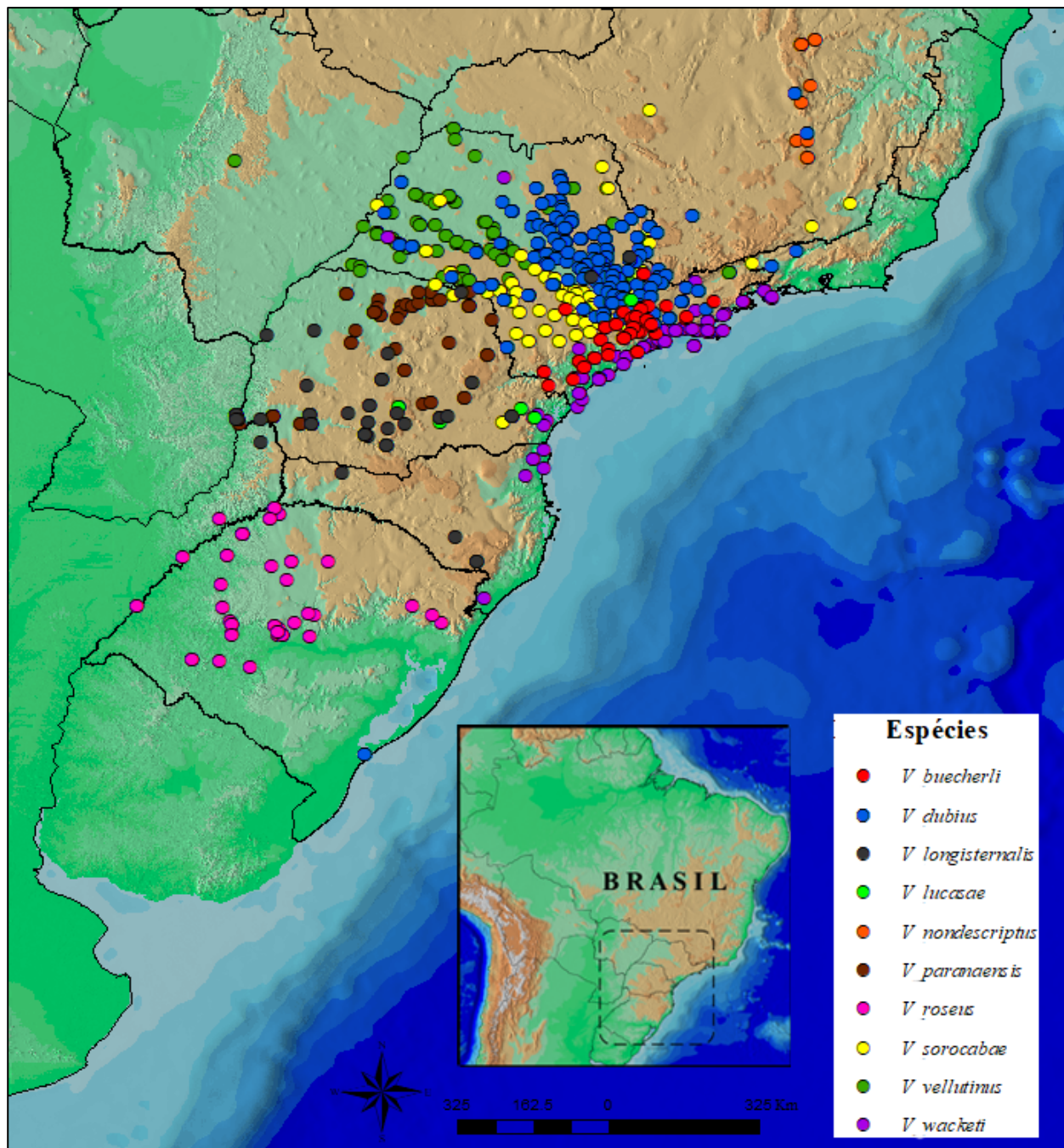


Figura 1. Mapa de ocorrência das espécies do gênero *Vitalius* de acordo com Bertani (2001), Bertani et al. (2012), Ferretti et al. (2014; 2015).

### ESPÉCIES CRÍPTICAS

A identificação e descoberta de novas espécies é algo importante para o enriquecimento do conhecimento da biodiversidade. Entretanto, alguns grupos biológicos apresentam dificuldades na definição de suas características morfológicas, gerando muitas vezes incapacidade na distinção de duas ou mais espécies. Bickford et al. (2007) consideraram como espécies crípticas duas ou mais espécies diferentes, que são classificadas como apenas uma,

devido à impossibilidade de serem distinguidas apenas pela morfologia. A identificação de espécies crípticas em aranhas Mygalomorphae, assim como o conhecimento sobre delimitação de espécies, vem ganhado notoriedade no meio científico (HENDRIXSON & BOND, 2007, 2009; STARRETT & HEDIN, 2007; BAILEY et al., 2010; HAMILTON et al., 2011; HENDRIXSON et al., 2013; SATLER et al., 2013; WILSON et al., 2013; HAMILTON et al., 2014; ORTIZ & FRANCKE, 2017, MENDOZA & FRANCKE, 2017), pois se apresentam como grandes obstáculos para um conhecimento e trabalho mais abrangente em prol da ecologia e evolução de diferentes grupos de estudo. Em grupos onde a morfologia é baseada em poucos caracteres, como as aranhas Mygalomorphae, a identificação de espécies se torna um problema. Além disso, muitas espécies de Mygalomorphae acabam compartilhando uma mesma área de ocorrência, aumentando as possibilidades de novos erros de identificação. Dúvidas sobre especiações e relações evolutivas podem ser respondidas por trabalhos morfológicos mais detalhados, acrescido com pesquisas de cunho moleculares.

## **TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS PARA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES**

O conceito de morfometria em biologia teve sua primeira aplicação no meio científico no final do século XIX, com trabalhos dos pesquisadores Francis Garton, W. F. R. Weldon e Karl Pearson, onde estudavam a relação de medidas morfológicas em organismos (FORNEL & CONDEIRO-ESTRELA, 2012). Apesar de iniciarem uma nova metodologia de estudo, essas obras iniciais não apresentavam suportes estatísticos (MARCUS et al., 1996; MONTEIRO & REIS, 1999). Conceitos estatísticos que pudessem revigorar as análises morfométricas surgiram na década de 1930 com Geoges Teissier, com a criação das análises de componentes principais (ACP) e R. A. Fisher, com o desenvolvimento de análises univariadas e multivariadas, bem como análises discriminantes (AD) (MARCUS et al., 1996; MONTEIRO e REIS, 1999). De acordo com Rohlf & Marcus (1993), a morfometria consiste em métodos de descrição e análise estatística da variação de forma em diferentes organismos. Na aracnologia, mais precisamente em estudos envolvendo a descrição de espécies que hoje constituem o gênero *Vitalius*, já se utilizavam comumente mensurações de estruturas morfológicas para discutirem diferenças

entre indivíduos e até mesmo serem decisivas para classificações a nível de espécies (MELLO-LEITÃO, 1923; PIZA, 1944; BÜECHERL, 1947, 1949, 1957; BÜECHERL, TOMOTHEO & LUCAS, 1971; PIZA, 1976; LUCAS, SILVA & BERTANI, 1993 & BERTANI, 2001).

De acordo com Rohfl & Marcus (1993), existem duas abordagens morfométricas que podem ser utilizadas em trabalhos de cunho biológico, a morfometria clássica (ou tradicional) e a morfometria geométrica. A morfometria clássica também pode ser denominada de morfometria multivariada, pois nelas as medidas correspondem à diferentes variáveis e consistem em valores métricos de comprimentos, larguras, ângulos e razões de estruturas morfológicas ou até distâncias entre pontos homólogos (ROHFL & MARCUS, 1993). De acordo com estes autores, elas podem ser analisadas estatisticamente através de análises de componentes principais, análise de variáveis canônicas e análises discriminantes, e serem expressas por gráficos e valores numéricos. Esta técnica morfométrica vem se mostrando útil para diferenciar espécies que possuem similaridade morfológica (LUMLEY & SPERLING, 2010; BUCK et al. 2012).

A morfometria geométrica, por sua vez, recupera coordenadas cartesianas através da inserção de pontos anatômicos homólogos (*landmarks*) (BOOKSTEIN, 1984; ROHFL, 1990; ROHFL & MARCUS, 1993; MONTEIRO & REIS, 1999). De acordo com os autores, essas coordenadas podem ser expressas em duas dimensões (eixo X e eixo Y) ou três dimensões (eixo X, eixo Y e eixo Z), possibilitando a visualização desses pontos através de imagens gráficas chamadas de *thin plates*, que recebe esse nome por ser assemelhar com uma placa fina de metal (BOOKSTEIN, 1989, 1991; ROHFL & BOOKSTEIN, 1990).

Os *landmarks* podem ser classificados em três tipos, de acordo com seus graus de confiabilidade, sendo eles: tipo I, quando tratam-se de pontos homólogos altamente confiáveis, como uma região de junção de estruturas; tipo II, quando os pontos homólogos apresentam confiabilidade média, como em uma região de máxima curvatura; e tipo III (também chamados de *semilandmarks*), quando os pontos homólogos apresentam confiabilidade baixa, como em uma região de mínima curvatura (BOOKSTEIN, 1991; MONTEIRO & REIS, 1999).

Quando se estuda a variação geométrica de uma estrutura, assume-se um conceito chamado na morfometria geométrica de conformação estrutural, que consiste na soma da forma e tamanho da estrutura (MONTEIRO & REIS, 1999). Outro conceito importante é o centróide, que é definido por Bookstein (1991) como o centro de gravidade da forma.

Para o desenvolvimento das análises morfométricas são necessárias determinadas condições específicas para se obter resultados satisfatórios, estatisticamente, e evitar problemas analíticos. Essas condições são por exemplo a padronização do foco da câmera, a resolução da imagem e também um número amostral, pelo menos, quatro vezes maior que o número de *landmarks* utilizados (MONTEIRO & REIS, 1999; FORNEL & CORDEIRO-ESTRELA, 2012).

De acordo com Bookstein (1991), ao serem recuperadas através das inserções dos *landmarks*, as diferentes coordenadas analisadas devem passar por um processo de sobreposição, que visa eliminar efeitos de posição, orientação e escalonamento. Um dos processos de sobreposição mais utilizados é a sobreposição generalizada de *procrustes* (ou *Generalizes Procrustes Analysis – GPA*). Após a GPA, as transformações dos *landmarks* das estruturas analisadas podem ser observadas em imagem através das *thin plates* (BOOKSTEIN, 1889, 1991; ROHFL & BOOKSTEIN, 1990).

A morfometria geométrica, assim como a morfometria clássica, pode ser analisada através de estatísticas multivariadas, como análises exploratórias (análises de componentes principais), análises classificatórias (análises de variáveis canônicas e análises discriminantes lineares) e testes univariados ou multivariados, além da utilização de distâncias de Mahalanobis e *procrustes* para evidenciar as diferenças de formas entre grupos (FORNEL & CORDEIRO-ESTRELA, 2012). As distâncias de Mahalanobis são valores que indicam as diferenças das estruturas analisadas entre os grupos, baseados em variações que existem dentro destes, sendo que quanto maiores os valores, maiores as diferenças (MARDIA et al., 2000; VISCOSI & CARDINI, 2011). Já as distâncias de *procrustes* são valores que contribuem para a identificação de diferenças nas configurações anatômicas das estruturas analisadas entre os diferentes grupos

(COOKE & TERHUNE, 2015).

Quando uma estrutura morfológica a ser analisada compreende uma grande quantidade de *landmarks* tipo III ou quando essa quantidade não é suficiente para cobrir toda a estrutura, podendo comprometer uma correta comparação entre os pontos, é necessário a utilização de outras metodologias morfométricas. Dentre elas estão as análises de contornos (ROHLF, 1990).

Rohlf (1990) diz que contornos podem ser classificados em dois tipos: contornos abertos, quando existe a ligação entre dois pontos homólogos, ou contornos fechados, quando essa ligação é iniciada e terminada em um mesmo ponto. Os contorno fechados podem ser estudados por metodologias analíticas como a Análise Elíptica de Fourier.

A Análise Elíptica de Fourier, desenvolvida por Kuhl & Giardina (1982), é expressa por meio de uma função paramétrica que não leva em conta a posição, rotação e tamanho do contorno (o mesmo princípio da sobreposição de procrustes), sem perder informações da forma da estrutura analisada (KUHLE & GIARDINA, 1982; LESTREL, 1997). Essa função paramétrica é definida por coeficientes de harmônicas, sendo que cada uma delas possui quatro coeficientes ( $a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$ ,  $d_n$ ) e que podem ser analisados por estatísticas multivariadas (KUHLE & GIARDINA, 1982; CRAMPTON, 1995; DUARTE-NETO et al., 2008; LESTREL, 1997).

## **TÉCNICAS MOLECULARES PARA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES**

Técnicas moleculares tem sido constantemente utilizadas para auxiliarem pesquisadores na delimitação de espécies, bem como entender padrões evolutivos entre grupos ou caracteres morfológicos, como por exemplo em diversos trabalhos envolvendo aranhas Mygalomorphae (HENDRIXSON & BOND, 2005; HENDRIXSON & BOND, 2006; LONGHORN et al., 2007; PETERSEN et al., 2007; HAMILTON et al., 2011; BOND et al., 2012; HENDRIXSON et al., 2013; WILSON et al., 2013; HAMILTON et al., 2014; HENDRIXSON et al., 2015; HAMILTON et al., 2016; ORTIZ & FRANCKE, 2016; MONTES DE OCA & PÉREZ-MILES, 2016; MENDOZA & FRANCKE, 2017; ORTIZ et al., 2018; HÜSSER, 2018; TURNER et al., 2018; HEDIN et al., 2018; GODWIN et al., 2018; FOLEY et al., 2018; LÜDDECKE et al., 2018; HEDIN et al., 2019; OPATOVA et al., 2020; MONTES DE OCA et al., 2022).

Com rápido avanço tecnológico, novas técnicas de sequenciamentos moleculares foram surgindo, buscando acessar um maior número de dados multilocus, como as de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS).

Estes métodos de NGS vem se mostrando efetivos para entender questões evolutivas de grupos taxonômicos (HAMILTON et al., 2016; DIMITROV et al., 2017). Uma das metodologias é o Enriquecimento Híbrido Ancorado (*Anchored Hybrid Enrichment* – AHE). Este é um método de sequenciamento que recupera centenas de *loci* ortólogos (aqueles que divergiram por especiação) que são considerados únicos e por isso apresentam alto potencial para resolver problemas cladísticos entre grupos considerados não-modelos (HAMILTON et al., 2016).

De acordo com Behjati & Tarpey (2013), a metodologia de NGS produzem sequências mais rapidamente, em apenas uma corrida, através de suas capturas. As sequências são enriquecidas e seus espaços genômicos reduzidos, gerando uma maior cobertura da região segmentada (GROVER et al., 2012). Um dos métodos que capturam essas sequências utilizam marcadores específicos chamados elementos ultraconservados (*Ultraconserved Elements* – UCE's). Estes elementos são pequenos trechos (aproximadamente 500 pb) que constituem regiões ultraconservadas do genoma (FAIRCLOTH et al., 2012). Alguns trabalhos vem utilizando os UCEs para estudos evolutivos, como relações evolutivas de mamíferos placentários (McCORMACK et al., 2012), origem evolutiva de tartarugas (CRAWFORD et al., 2012), entre pássaros e papagaios (McCORMACK et al., 2013) e peixes (FAIRCLOTH et al., 2012; BURRESS et al., 2018; ALFARO et al., 2018). Em aranhas Mygalomorphae, esta técnica vem ganhando notoriedade nos últimos anos com trabalhos como Hedin et al (2018; 2019).

## **Objetivos**

O fato de as aranhas *Vitalius* apresentarem grande semelhança morfológica e algumas espécies simpátricas (Figura 1) compromete a precisa identificação no nível de espécie, principalmente quando armazenadas em coleções científicas, pois ao longo do tempo os espécimes acabam sofrendo degradação, como perda de estruturas morfológicas (espinhos, cerdas, artículos) e coloração. Com base nisso, este trabalho buscou avaliar caracteres

morfométricos (medidas e formas) que suportem a distinção entre espécies similares de *Vitalius*, propor uma hipótese de relacionamento evolutivo, com dados filogenômicos, entre as espécies de *Vitalius* e entre gêneros próximos e testar a monofilia de *Vitalius* e da linhagem de aranhas Theraphosinae caracterizadas morfologicamente por possuírem quilhas retrolateral e subapical nos bulbos dos machos.

Este trabalho foi dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo é realizado um estudo morfogeométrico dos esternos e genitálias de *V. longisternalis* e *V. roseus*. O segundo capítulo mostra um estudo prático de diferenciação dos contornos dos bulbos copuladores masculinos de *P. sazimai* e *V. nondescriptus*, duas espécies de Theraphosinae que acumulam dúvidas sobre a morfologia de suas genitálias masculinas. O terceiro capítulo apresenta a diferenciação morfométrica entre fêmeas de *V. paranaensis* e *V. vellutinus*, que apenas se diferenciam por suas distribuições biogeográficas. Ainda neste capítulo apresentamos um estudo de forma morfométrica e diferenciação entre os bulbos copuladores masculinos destas espécies. No quarto capítulo é apresentada uma análise filogenômica utilizando UCEs com representantes de aranhas Theraphosinae.

### **Referências bibliográficas**

ALFARO, M. E. et al. Explosive diversification of marine fishes at the Cretaceous–Palaeogene boundary. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 4, p. 688–696, 2018.

BAILEY, A. L. et al. Phylogeny and classification of the trapdoor spider genus *Myrmekiaphila*: an integrative approach to evaluating taxonomic hypotheses. **Plos one**, v. 5, n. 9, p. e12744, 2010.

BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. What is next generation sequencing? **Archives of Disease in Childhood–Education and Practice**, v. 98, n. 6, p. 236–238, 2013.

BERTANI, R. Male palpal bulbs and homologous features in Theraphosinae (Araneae, Theraphosidae). **The Journal of Arachnology**, v. 28, n. 1, p. 29–42, 2000.

BERTANI, R. Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 36, n. 3, p. 265–356, 2001.

BERTANI, R.; NAGAHAMA, R. H.; FUKUSHIMA, C. S. *Vitalius nondescriptus* comb. nov. (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae): an example of theraphosid taxonomic chaos. **Zoologia (Curitiba)**, v. 29, p. 467-473, 2012.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.

BOND, J. E. et al. Phylogenetic reconsideration of *Myrmekiaphila* systematics with a description of the new trapdoor spider species *Myrmekiaphila tigris* (Araneae, Mygalomorphae, Cyrtaucheniidae, Euctenizinae) from Auburn, Alabama. **ZooKeys**, n. 190, p. 95, 2012.

BOOKSTEIN, F. L. A statistical method for biological shape comparisons. **Journal of theoretical biology**, v. 107, n. 3, p. 475–520, 1984.

BOOKSTEIN, F. L. "Size and shape": a comment on semantics. **Systematic zoology**, v. 38, n. 2, p. 173–180, 1989.

BOOKSTEIN, F. L. Morphometric tools for landmark data Cambridge University Press. **New York**, 1991.

BÜCHERL, W. Estudo comparativo das espécies brasileiras do género *Pamphobeteus* Pocock, 1901. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 233–282, 1947.

BÜCHERL, W. Em tomo das três espécies insulares e praianas do género *Pamphobeteus* Pocock, 1901 (Mygalomorphae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 21, n. 1, p. 17–136, 1949.

BÜCHERL, W. Sobre a importância dos bulbos copuladores e das apófises tibiais dos machos na sistemática das aranhas caranguejeiras (Orthognatha). **Anais da Academia brasileira de Ciências**, v. 29, n. 3, p. 377–416, 1957.

BÜCHERL, W., TIMOTHEO DA COSTA, A. & LUCAS, S. Revisão de alguns tipos de aranhas caranguejeiras (Orthognatha) estabelecidos por Cândido de Mello-Leitão e depositados no Museu Nacional do Rio. **Memórias do Instituto Butantan**, 35: 117-138, 1971.

BUCK, M. et al. Unravelling cryptic species diversity in eastern Nearctic paper wasps, *Polistes* (Fuscopolistes), using male genitalia, morphometrics and DNA barcoding, with descriptions of two new species (Hymenoptera: Vespidae). **Zootaxa**, v. 3502, n. 3502, p. 1–48, 2012.

BURRESS, E. D. et al. Island–and lake–like parallel adaptive radiations replicated in rivers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 20171762. 2018.

COOKE, J. A. L.; ROTH, V. D.; MILLER, F. H. The urticating hairs of theraphosid spiders. *American Museum novitates*; n. 2498, 1972.

COOKE, S. B.; TERHUNE, C. E. Form, function, and geometric morphometrics. **The Anatomical Record**, v. 298, n. 1, p. 5–28, 2015.

CRAMPTON, J. S. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. **Lethaia**, v. 28, n. 2, p. 179–186, 1995.

CRAWFORD, N. G. et al. More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. **Biology letters**, v. 8, n. 5, p. 783–786, 2012.

DE PIKELIN, B. S. Gerschmann; SCHIAPPELLI, Rita D. Las Arañas de la subfamilia "Theraphosinae" (Araneae, Theraphosidae). **Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"**, v. 5, p. 287–330, 1979.

DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1905–1916, 2005.

DIMITROV, D. et al. Rounding up the usual suspects: A standard target-gene approach for resolving the interfamilial phylogenetic relationships of ecribellate orb-weaving spiders with a new family-rank classification (Araneae, Araneoidea). **Cladistics**, v. 33, n. 3, p. 221–250, 2017.

DUARTE–NETO, P. et al. The use of sagittal otoliths in discriminating stocks of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off northeastern Brazil using multishape descriptors. **ICES Journal of Marine Science**, v. 65, n. 7, p. 1144–1152, 2008.

FAIRCLOTH, B. C. et al. Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. **Systematic biology**, v. 61, n. 5, p. 717–726, 2012.

FERRETTI, N. et al. First record of *Vitalius roseus* (Mello-Leitão, 1923) (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae) in Argentina: distribution map, natural history, and sexual

behaviour. **Arachnology**, v. 16, n. 7, p. 241-243, 2014.

FERRETTI, N. et al. First record of *Vitalius longisternalis* Bertani, 2001 (Araneae, Theraphosidae) in Argentina and notes on its natural history in Misiones province. **Check List**, v. 11, n. 5, p. 1748, 2015.

FOLEY, S. et al. Tarantula phylogenomics: A robust phylogeny of multiple tarantula lineages inferred from transcriptome data sheds light on the prickly issue of urticating setae evolution. **bioRxiv**, p. 501262, 2018.

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria Geométrica ea quantificação da forma nos organismos-Temas em Biologia: Edição Comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus Erechim. **PPG-Ecologia, Erechim**, 2012.

FUKUSHIMA, C. S.; NAGAHAMA, R. H.; BERTANI, R. The identity of *Mygale brunnipes* CL Koch 1842 (Araneae, Theraphosidae), with a redescription of the species and the description of a new genus. **The Journal of Arachnology**, v. 36, n. 2, p. 402–410, 2008.

GALLETI-LIMA, A.; GUADANUCCI, J. P. L. Morphology of setae on the coxae and trochanters of theraphosine spiders (Mygalomorphae: Theraphosidae). **The Journal of Arachnology**, v. 46, n. 2, p. 214–225, 2018.

GALLETI-LIMA, A.; GUADANUCCI, J. P. L. Comparative morphology of stridulating setae of Theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 283, p. 58–68, 2019.

GALLON, R. C.; GABRIEL, R. Theraphosidae egg-sac types. **Newsletter of the British arachnological Society**, v. 106, p. 5–10, 2006.

GODWIN, R. L. et al. Phylogeny of a cosmopolitan family of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Ctenizidae) using Anchored Hybrid Enrichment, with a description of the family, Halonoproctidae Pocock 1901. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 126, p. 303–313, 2018.

GROVER, C. E.; SALMON, A.; WENDEL, J. F. Targeted sequence capture as a powerful tool for evolutionary analysis. **American journal of botany**, v. 99, n. 2, p. 312–319, 2012.

GUADANUCCI, J. P. L. Theraphosidae phylogeny: relationships of the ‘Ischnocolinae’ genera (Araneae, Mygalomorphae). **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 5, p. 508–518, 2014.

HAMILTON, C. A.; FORMANOWICZ, Daniel R.; BOND, Jason E. Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): cryptic diversity in North American tarantulas. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26207, 2011.

HAMILTON, C. A. et al. An evaluation of sampling effects on multiple DNA barcoding methods leads to an integrative approach for delimiting species: a case study of the North American tarantula genus *Aphonopelma* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 79–93, 2014.

HAMILTON, C. A. et al. Expanding anchored hybrid enrichment to resolve both deep and shallow relationships within the spider tree of life. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–20, 2016.

HEBERT, P. D. N et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HEDIN, M. et al. Phylogenomic reclassification of the world’s most venomous spiders (Mygalomorphae, Atracinae), with implications for venom evolution. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

HEDIN, M. et al. Phylogenomic analysis and revised classification of atypoid mygalomorph spiders (Araneae, Mygalomorphae), with notes on arachnid ultraconserved element loci. **PeerJ**, v. 7, p. e6864, 2019.

HENDRIXSON, B. E.; BOND, J. E. Testing species boundaries in the *Antrodiaetus unicolor* complex (Araneae: Mygalomorphae: Antrodiaetidae): “paraphyly” and cryptic diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, n. 2, p. 405–416, 2005.

HENDRIXSON, B. E.; BOND, J. E. Molecular phylogeny and biogeography of an ancient Holarctic lineage of mygalomorph spiders (Araneae: Antrodiaetidae: *Antrodiaetus*). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 42, n. 3, p. 738–755, 2007.

HENDRIXSON, B. E.; BOND, J. E. Evaluating the efficacy of continuous quantitative

characters for reconstructing the phylogeny of a morphologically homogeneous spider taxon (Araneae, Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Antrodiaetus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 1, p. 300–313, 2009.

HENDRIXSON, B. E. et al. An exploration of species boundaries in turret–building tarantulas of the Mojave Desert (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae, *Aphonopelma*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 1, p. 327–340, 2013.

HENDRIXSON, B. E.; GUICE, A. V.; BOND, J. E. Integrative species delimitation and conservation of tarantulas (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae) from a North American biodiversity hotspot. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 2, p. 120–131, 2015.

HÜSSER, M. A first phylogenetic analysis reveals a new arboreal tarantula genus from South America with description of a new species and two new species of *Tapinauchenius* Ausserer, 1871 (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). **ZooKeys**, n. 784, p. 59, 2018.

KADERKA, R. et al. Urticating setae of tarantulas (Araneae: Theraphosidae): Morphology, revision of typology and terminology and implications for taxonomy. **PLoS one**, v. 14, n. 11, p. e0224384, 2019.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes: methods and protocols. In: **DNA Barcodes**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 3–8.

KUHL, F. P.; GIARDINA, C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **Computer graphics and image processing**, v. 18, n. 3, p. 236–258, 1982.

LESTREL, P. E. **Fourier descriptors and their applications in biology**. Cambridge University Press, 1997.

LONGHORN, S. J. et al. The utility of molecular markers from non–lethal DNA samples of the CITES II protected “tarantula” *Brachypelma vagans* (Araneae, Theraphosidae). **The Journal of Arachnology**, v. 35, n. 2, p. 278–292, 2007.

LUCAS, S.; SILVA, P. I.; BERTANI, R. *Vitalius* a new genus of the subfamily Theraphosinae Thorell, 1870 from Brazil (Araneae, Theraphosidae). **Spixiana**, v. 16, p. 241–245, 1993.

LÜDDECKE, T. et al. Discovering the silk road: Nuclear and mitochondrial sequence data

resolve the phylogenetic relationships among theraphosid spider subfamilies. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 119, p. 63–70, 2018.

LUMLEY, L. M.; SPERLING, F. A. H. Integrating morphology and mitochondrial DNA for species delimitation within the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) cryptic species complex (Lepidoptera: Tortricidae). **Systematic Entomology**, v. 35, n. 3, p. 416–428, 2010.

MARCUS, L. F.; CORTI, M. Overview of the new, or geometric morphometrics. In: **Advances in morphometrics**. Springer, Boston, MA, 1996. p. 1-13.

MARDIA, K. V.; BOOKSTEIN, F. L.; MORETON, I. J. Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. **Biometrika**, p. 285–300, 2000.

MCCORMACK, J. E. et al. Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species–tree analysis. **Genome research**, v. 22, n. 4, p. 746–754, 2012.

MCCORMACK, J. E. et al. A phylogeny of birds based on over 1,500 loci collected by target enrichment and high–throughput sequencing. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54848, 2013.

MELLO–LEITÃO, C. F. Theraphosoideas do Brasil. **Revista do Museo Paulista**, v. 13, p. 1–438, 1923.

MENDOZA, J.; FRANCKE, O. Systematic revision of *Brachypelma* red–kneed tarantulas (Araneae: Theraphosidae), and the use of DNA barcodes to assist in the identification and conservation of CITES–listed species. **Invertebrate Systematics**, v. 31, n. 2, p. 157–179, 2017.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. Princípios de morfometria geométrica. In: **Princípios de morfometria geométrica**. p. 189–189, 1999.

MONTES DE OCA, L. et al. Phylogenomic analysis, reclassification, and evolution of South American nemesioid burrowing mygalomorph spiders. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, V. 168, n 107377, p. 1-19. 2022.

MONTES-DE-OCA, L.; D'ELÍA, G.; PÉREZ-MILES, F. An integrative approach for species delimitation in the spider genus *Grammostola* (Theraphosidae, Mygalomorphae). **Zoologica Scripta**, v. 45, n. 3, p. 322–333, 2016.

OPATOVA, V. et al. Phylogenetic systematics and evolution of the spider infraorder Mygalomorphae using genomic scale data. **Systematic Biology**, v. 69, n. 4, p. 671–707, 2020.

ORTIZ, D.; FRANCKE, O. F. Two new species of *Bonnetina* tarantulas (Theraphosidae: Theraphosinae) from Mexico: contributions to morphological nomenclature and molecular characterization of types. **Journal of Natural History**, v. 49, n. 11–12, p. 685–707, 2016.

ORTIZ, D.; FRANCKE, O. F. Reconciling morphological and molecular systematics in tarantulas (Araneae: Theraphosidae): revision of the Mexican endemic genus *Bonnetina*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 180, n. 4, p. 819–886, 2017.

ORTIZ, D.; FRANCKE, O. F.; BOND, J. E. A tangle of forms and phylogeny: Extensive morphological homoplasy and molecular clock heterogeneity in *Bonnetina* and related tarantulas. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 127, p. 55–73, 2018.

PERAFÁN, C. et al. *Kankuamo*, a new theraphosid genus from Colombia (Araneae, Mygalomorphae), with a new type of urticating setae and divergent male genitalia. **ZooKeys**, n. 601, p. 89, 2016.

PERAFÁN, C.; VALENCIA-CUELLAR, D. *Proshapalopus marimbai*, a new tarantula species (Mygalomorphae, Theraphosidae) and first genus record from Colombia. **Tropical Zoology**, v. 31, n. 4, p. 200-213, 2018.

PÉREZ–MILES, F. et al. Systematic revision and cladistic analysis of Theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). **Mygalomorph**, v. 1, n. 3, p. 33–68, 1996.

PÉREZ–MILES, F.; PERAFÁN, C. Theraphosinae. In: **New World Tarantulas**. Springer, Cham, 2020. p. 121–151.

PETERSEN, S. D. et al. Species identification of tarantulas using exuviae for international wildlife law enforcement. **Conservation Genetics**, v. 8, n. 2, p. 497–502, 2007.

PIZA JR, S. T. Seis aranhas e um opilião novos do Brasil. **Revista de Agricultura, São Paulo**, v. 19, p. 263–276, 1944.

PIZA JR, S. T. Uma espécie nova de aranha brasileira do gen. *Pamphobeteus* (Theraphosidae). 1976.

- POCOCK, R. I. XIII. —On some genera and species of South–American Aviculariidae. **Journal of Natural History**, v. 11, n. 61, p. 81–115, 1903.
- PRENTICE, T. R. Theraphosidae of the Mojave Desert west and north of the Colorado River (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). **Journal of Arachnology**, p. 137–176, 1997.
- RAVEN, R. J. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): cladistics and systematics. **Bulletin of the AMNH**, v. 182, article 1. 1985.
- RAVEN, R. J. Comments on the proposed precedence of *Aphonopelma* Pocock, 1901 (Arachnida, Araneae) over *Rhechostica* Simon, 1892. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 47, n. 2, p. 126–127, 1990.
- ROHLF, F. J.; BOOKSTEIN, F. L. **Proceedings of the Michigan morphometrics workshop**. University of Michigan Museum of Zoology, 1990.
- ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annual Review of Ecology and systematics**, p. 299–316, 1990.
- ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in ecology & evolution**, v. 8, n. 4, p. 129–132, 1993.
- SATLER, J. D.; CARSTENS, B. C.; HEDIN, M. Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, Aliatypus). **Systematic biology**, v. 62, n. 6, p. 805–823, 2013.
- SCHIAPELLI, R. D.; DE PIKELIN, B. S. Gerschmann. Importancia de las espermatecas en la sistemática de las arañas del suborden Mygalomorphae (Araneae). **Physis**, v. 23, n. 64, p. 69–75, 1962.
- SIMON, E. Histoire Naturelle des Araignés. **Paris: Roret**, v. 1, p. 256, 1892.
- SMITH, A. M. **Tarantula spiders: tarantulas of the USA and Mexico**. Fitzgerald Pub., p. 196, 1995.
- STARRETT, J.; HEDIN, M. Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 3, p. 583–604, 2007.
- TURNER, S. P. et al. Re–evaluating conservation priorities of New World tarantulas (Araneae:

Theraphosidae) in a molecular framework indicates non-monophyly of the genera, *Aphonopelma* and *Brachypelma*. **Systematics and Biodiversity**, v. 16, n. 1, p. 89–107, 2018.

VISCOSI, V.; CARDINI, A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25630, 2011.

WILSON, J. S. et al. Testing the species limits of the tarantulas (Araneae: Theraphosidae) endemic to California's Southern Coast Ranges, USA. **Insect Conservation and Diversity**, v. 6, n. 3, p. 365–371, 2013.

WORLD SPIDER CATALOG. World spider catalog, version 22.0. **Bern: Natural History Museum**, online em <http://wsc.nmbe.ch>. 2021.

XI, Z.; LIU, L.; DAVIS, C. C. Genes with minimal phylogenetic information are problematic for coalescent analyses when gene tree estimation is biased. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 63-71, 2015.

## Considerações finais

Os resultados apresentados nesta tese indicaram que indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar variações estruturais diferentes, e em alguns casos, se assemelhando a outras espécies. O esterno, caráter usualmente utilizado na diagnose de espécies de aranhas *Vitalius*, é um exemplo deste problema. O caráter, que é tratado de maneira descritiva para a espécie *V. longisternalis* (mais longo do que largo), também é encontrado em proporções semelhantes em alguns indivíduos de *V. roseus*. Nossos estudos apontam que a maneira ideal para se tratar este caráter é morfometricamente, o que também pode valer para outras estruturas morfológicas, como carapaça, lábio, enditos e cômodo ocular.

O estudo de forma de um caráter também se mostrou eficaz para diferenciar estruturas morfológicas homogêneas em aranhas Theraphosinae, que acabam gerando confusões de identificação ou possíveis erros de codificação em uma matriz filogenética morfológica. O bulbo copulador das espécies simpátricas *P. sazimai* e *V. nondescriptus* apresentam tal similaridade morfológica, principalmente pelo fato de se levarem em conta apenas as quilhas constituintes deste caráter. Aqui apresentamos uma metodologia para análise de forma (Análise Elíptica de Fourier), que possibilitou a diferenciação de tais estruturas, bem como mapear as principais transformações em suas formas.

Destacamos ainda a importância das medidas clássicas realizadas em descrições de espécies, visto que elas podem demonstrar diferenças morfométricas que podem ser utilizadas para diferenciação entre espécies. Um exemplo disso são as fêmeas de *V. paranaensis* e *V. vellutinus*, que não apresentavam diferenças morfológicas suficientes para distingui-las. Aqui apontamos que proporções de pernas e carapaça apresentam diferenças entre as espécies. Além disso, apresentamos neste estudo, mais um caso de como o estudo da forma de um caráter supostamente pouco informativo (espermateca), pode ser utilizado para diferenciar espécies semelhantes.

Finalmente, propomos uma hipótese filogenética consistente, baseada em Elementos Ultraconservados, em que esclarecemos as principais dúvidas acerca das relações evolutivas dos

grupos pertencentes a uma linhagem de aranhas Theraphosinae muito comum no Brasil, as caranguejeiras com quilhas retrolateral e subapical no bulbo copulador masculino. Nossa hipótese também indicou os relacionamentos das espécies do gênero *Vitalius*, que deverá ser reclassificado e manterá apenas as espécies *V. buecherli*, *V. dubius*, *V. lucasae*, *V. paranaensis*, *V. sorocabae* e *V. vellutinus*, restringindo a distribuição do gênero para os estados de São Paulo e Paraná. Ainda apresentamos a existência de uma nova espécie para o gênero, também para o estado do Paraná. Os machos desta nova espécie apresentam características morfológicas semelhantes aos machos de *V. paranaensis*, e só foram diferenciados devido a estarem relacionados a um indivíduo feminino morfológicamente distinto. A partir deste posicionamento filogenético foi possível observar as pequenas diferenças morfológicas nas apófises tibiais e bulbo copulador.

Esta tese abordou através de metodologias modernas uma nova visão de como devemos entender a taxonomia morfológica de aranhas Theraphosinae, auxiliando na tomada de decisões e resolvendo questões morfológicas e evolutivas que outrora geravam questionamentos. Desta maneira, criamos subsídios para futuros estudos que podem ser replicados em outros grupos de aranhas Mygalomorphae.