

---

**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, aranhaçú (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; espermoteca 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, espermoteca 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.

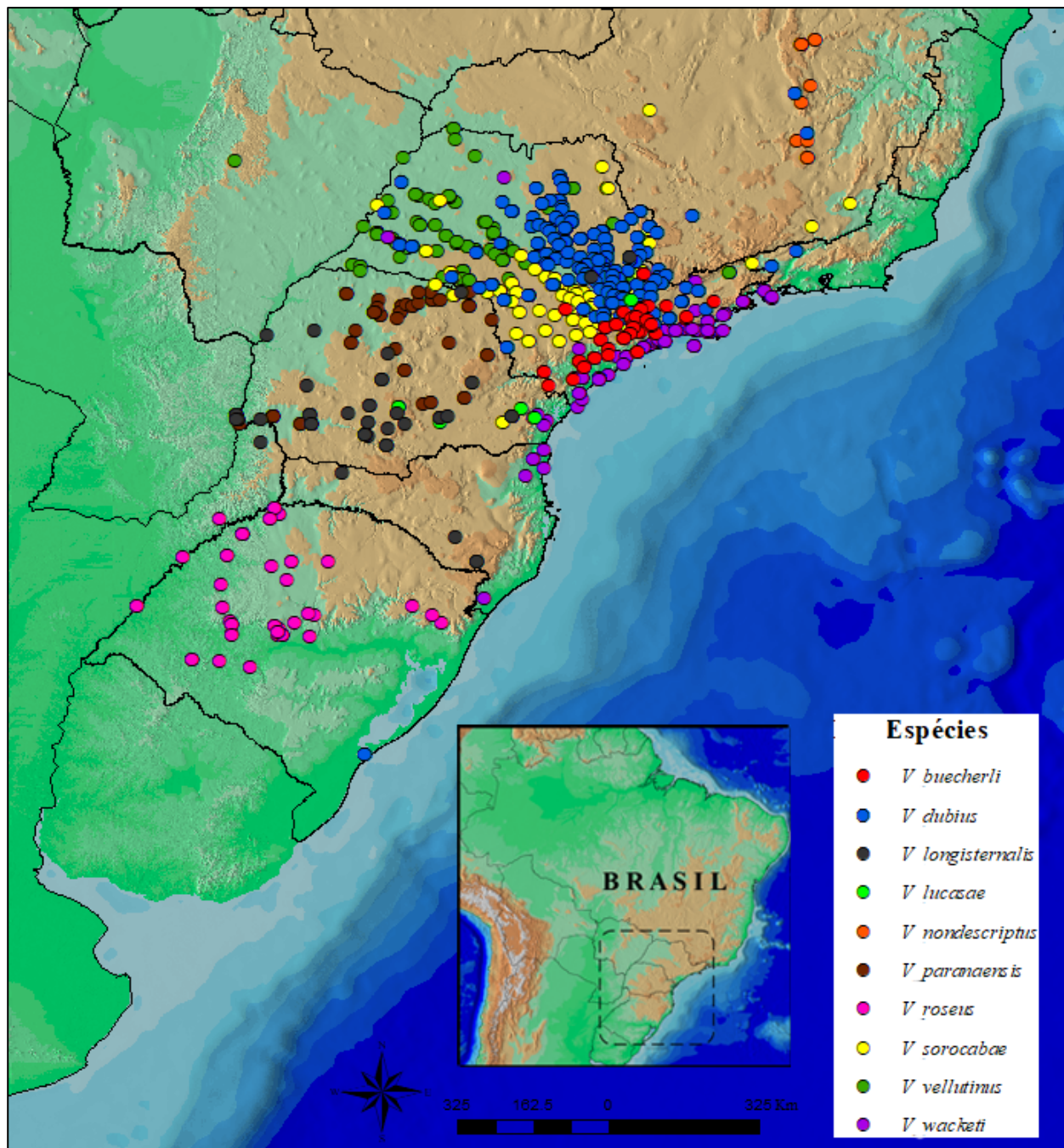


Figura 1. Mapa de ocorrência das espécies do gênero *Vitalius* de acordo com Bertani (2001), Bertani et al. (2012), Ferretti et al. (2014; 2015).

### 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 (KUHL & 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 (KUHL & 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; SCHIAPELLI, 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.

## Capítulo I

### **Além da morfologia descritiva: diferenciação morfométrica do esterno de duas espécies de *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani, 1993.**

#### **Resumo**

Aranhas Theraphosidae são animais que apresentam grande homogeneidade morfológica, onde muitas espécies possuem seus caracteres diagnósticos tratados de maneira descritiva, sem levar em conta as diferentes variações de forma de seus indivíduos. Isso acontece com as espécies do gênero *Vitalius*, *V. longisternalis* Bertani, 2001 e *V. roseus* Mello-Leitão, 1923, que se distribuem pela região sul do Brasil e também na província de Misiones, na Argentina. Neste trabalho objetivamos diferenciar morfometricamente indivíduos de *V. roseus*, através de análises morfométricas de seus esternos. As diferenciações foram alcançadas através de Análises de Componentes Principais (ACP) e Análises de Variáveis Canônicas (AVC). Os resultados obtidos possibilitaram a identificação de um novo morfótipo de *V. roseus*, com esterno semelhantes a *V. longisternalis*, destacando possíveis casos de áreas de hibridização. Além disso, evidenciamos que determinados caracteres morfológicos não devem ser tratados de maneira descritiva, já que existem mais de uma variação de forma para uma mesma estruturas morfológica.

Palavras chave: Mygalomorphae, Theraphosidae, Taxonomia, Morfometria Geométrica, espécies crípticas

## 1. Introdução

As aranhas da família Theraphosidae possuem representantes com morfologia altamente homogênea, onde muitas espécies são baseadas em caracteres diagnósticos descritivos, que não levam em conta as diferentes variações de seus indivíduos. Esse caso pode ser observado em algumas espécies pertencentes ao gênero *Vitalius*, aranhas que se distribuem pela região Sudeste e Sul do Brasil e também pela província de Misiones, na Argentina (BERTANI, 2001; FERRETTI et al., 2014; FERRETTI et al., 2015).

Dentre suas dez espécies, *V. longisternalis*, que ocorre no estado do Paraná e Santa Catarina, Brasil e também em Misiones, Argentina, é caracterizada por se diferenciar de todas as outras espécies do gênero por apresentar esternos mais longos do que largos. Entretanto não é raro se deparar com indivíduos de outras espécies com variações de esternos semelhantes à *V. longisternalis*, caso de espécimes pertencentes à *V. roseus*, que se distribui pelo estado do Rio Grande do Sul, Brasil e também em Misiones, Argentina.

A dificuldade na maneira que um caráter morfológico é tratado pode ser solucionado através da utilização de técnicas de morfometria geométrica, que utiliza o princípio de recuperação da forma geométrica de determinada estrutura taxonômica (ROHLF & MARCUS, 1993), compreendidas em suas formas dimensionais (duas ou três dimensões), através de coordenadas obtidas por pontos anatômicos homólogos (*landmarks*) e que podem ser analisadas através de estatísticas multivariadas (ROHLF & MARCUS, 1993).

Em algumas estruturas morfológicas os pontos anatômicos homólogos não exibem fácil localização, gerando diversos problemas para suas inserções. Nesses casos uma alternativa favorável é a realização de análises por contornos fechados (ROHLF, 1990). Dentre vários métodos que utilizam contornos fechados, a Análise Elíptica de Fourier tem sido constantemente abordada em estruturas de contornos complexos, como de crustáceos e insetos (KUHL & GIARDINA, 1982; ROHLF & ARCHIE, 1984; FERSON et al. 1985; TORT, 2003; ZAHN & WANG, 2012; WEN et al. 2015). Esta análise busca manter as informações da forma da estrutura, independentemente do tamanho, posição e rotação do contorno, utilizando os chamados

coeficientes da primeira harmônica (CRAMPTON, 1995).

Com base nisso, objetivamos diferenciar indivíduos de *V. roseus*, que compartilham esternos semelhantes aos de *V. longisternalis*, através de estudos morfometria geométrica.

## 2. Material e métodos

Material: O material analisado neste trabalho é proveniente das coleções aracnológicas das seguintes instituições: **CAD**, Coleção Aracnológica de Diamantina, Rio Claro, São Paulo – J. P. L. Guadanucci; **IBSP**, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil – A. D. Brescovit; **MCN**, Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil – R. Ott; **MCTP**, Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil – R. A. Teixeira; **MZSP**, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil – R. Pinto da Rocha.

Seleção dos táxons: As pré-identificações foram realizadas seguindo as diagnoses de Bertani (2001). A lista com os espécimes analisados está indicada em Anexo I.

Aquisição das imagens: As imagens dos caracteres foram obtidas através de câmera Leica MC 170 *hd* embutida em um estereomicroscópio Leica M205C e *software* Leica *Application Suite* LAS V4.12. Todos os espécimes analisados sempre eram posicionados da mesma forma e fotografados com mesma objetiva e aumento. Foram descartados das análises os indivíduos sub-adultos e com estruturas danificadas.

Classificação de indivíduos de *V. roseus* com esternos modificados: Seleccionamos determinados indivíduos de *V. roseus*, que embora apresentassem caracteres sexuais (bulbo copulador, apófise tibial e espermateca) de acordo com a diagnose da espécie, possuíam variações de esternos mais semelhantes ao padrão morfológico de *V. longisternalis*. Após identificados (fêmeas: MCN 17797, MCN 42460, MCN 3045, MCN 4524 e MCN 8987; machos: MCN 21028, MCN 21075, MCN 21076 e MCN 21197), definimos uma nova classificação para estes indivíduos (esterno mais longo).

Análise dos bulbos copuladores e espermateca: Para confirmar que os indivíduos classificados como uma variação com o esterno mais longo se tratavam de *V. roseus*, de fato,

selecionamos os bulbos copuladores masculinos e espermatecas femininas para uma análise de contornos fechados.

Morfometria geométrica: As imagens das estruturas foram agrupadas em pastas únicas e convertidas em formato TPS pelo *software* tps-Util 1.28 (ROHLF, 2004). Para a inserção dos marcos anatômicos, foi utilizado o *software* TPSDIG32 v. 1.31 (ROHLF, 2001). Foram utilizados dez *landmarks* para as análises dos esternos (Figura 1, A). As descrições e os tipos de *landmarks* utilizados estão expressos nas tabelas 1.

Tabela 1. Tipo e descrição dos *landmarks* utilizados na análise de morfometria geométrica dos esternos de fêmeas e machos das espécies.

<i>Landmarks</i>	Tipo	Descrição do <i>landmark</i>
1	I	Área de inserção do endito esquerdo/extremo basal esquerdo do lábio.
2	I	Área de inserção da coxa I esquerda.
3	I	Área de inserção da coxa II esquerda.
4	I	Área de inserção da coxa III esquerda.
5	I	Área de inserção da coxa IV esquerda e direita.
6	I	Área de inserção da coxa III direita.
7	I	Área de inserção da coxa II direita.
8	I	Área de inserção da coxa I direita.
9	I	Área de inserção do endito direito/extremo basal direito do lábio.
10	II	Máxima curvatura basal média do lábio.

Contornos fechados: Para a aquisição dos contornos das estruturas, realizou-se inicialmente a edição das imagens através do *software* Adobe Photoshop CS6, de onde se extraíram as silhuetas pretas e posteriormente a alteração da escala de cor para cinza, para então serem compactadas em fundo branco e reagrupadas em pasta única. Os contornos fechados foram extraídos dos bulbos copuladores (com exceção do subtégulo) e espermatecas (a partir da altura da região média entre os lóbulos) (Figura 1, B-C).

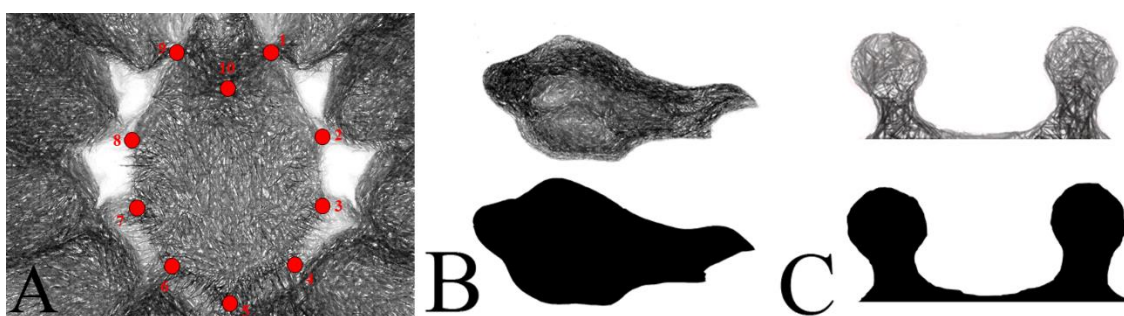


Figura 1, A-C. Ilustrações das estruturas morfológicas utilizadas para as análises morfogeométricas de *V. longisternalis* e *V. roseus*. A. Esterno (vista ventral) e os pontos anatômicos utilizados para a análise de

morfometria geométrica (pontos vermelhos). B. Vista prolateral do bulbo copulador masculino (acima) e sua silhueta preta utilizada para as análises de contorno fechado (abaixo). B. Vista ventral da espermateca feminina (acima) e sua silhueta preta utilizada para as análises de contorno fechado (abaixo).

Análises estatísticas: Os dados de morfometria geométrica dos esternos inicialmente passaram por Análise Generalizada de Procrustes (GPA), para a eliminação dos efeitos de tamanho, posição e orientação. Após esse processo, foram extraídas matrizes de covariância e posteriormente realizadas as análises de componentes principais (ACP), a fim de se explorar as variações totais de configurações anatômicas e as possíveis formações de grupos crípticos em cada uma das espécies. Para a classificação dos indivíduos, foram realizadas análises de variáveis canônicas (AVC), com testes de permutação com 10.000 interações, a fim maximizar as variações dos grupos. Valores de distâncias de Mahalanobis e Procrustes foram utilizados para avaliar se existiam diferenças significativas entre os grupos formados. As diferenças entre as formas dos caracteres dos grupos formados foram testadas através de ANOVA de procrustes. Para avaliar se as diferenças eram resultantes de efeito de alometria, foram realizadas análises de regressões lineares, utilizando a configuração de procrustes de cada estrutura como variáveis dependentes e o tamanho do centroide como variável independente, além de testes de permutação contra hipótese nula de independência (10.000 interações). As ACP e AVC foram recalculadas a partir dos resíduos da alometria. Todas estas etapas foram desenvolvidas pelo *software* MorphoJ v.1.05f (KLINGENBERG, 2011). Os contornos fechados das genitálias foram submetidos ao *software* R *environment* (R CORE TEAM, 2016), com a utilização do pacote ‘Momocs’ (BONHOMME et al., 2014), que possibilita análises de contornos em programação R. A partir daí foram executadas as Análises Elípticas de Fourier, onde uma série de harmônicos foi gerada, buscando o valor necessário para recuperar o contorno máximo de cada estrutura (potência máxima de Fourier). Para as análises das espermatecas foram utilizados seis harmônicos ( $h = 6$ ). Esse valor foi selecionado com intuito de abranger formas menos rebuscadas das espermatecas para conter a dispersão dos pontos no morfoespaço, já que essas estruturas podem apresentar altas variações

entre indivíduos de uma mesma espécie. Já para os bulbos foram utilizados cinco harmônicos ( $h = 5$ ), pois visamos excluir a quilha subapical, já que esta pode apresentar diferentes variações em indivíduos de uma mesma espécie. Após a definição dos harmônicos, foram eliminadas as influências de rotação, tamanho e orientação das imagens. A partir dos coeficientes gerados pela AEF, foram realizadas ACP a fim de observar as variações dos contornos das espécies e possíveis formações de grupos crípticos.

### 3. Resultados

Diferenciação morfogeométrica entre as espécies: Os valores das análises de ANOVA Procrustes, Análises de regressão e Análise de Componentes Principais podem ser observados em Anexo II. Nenhum dos caracteres selecionados apresentou variação de tamanho significativo e os grupos formados tiveram diferenças na forma de cada um destes caracteres. A figura 2 indica as variações de esternos dos grupos analisados.

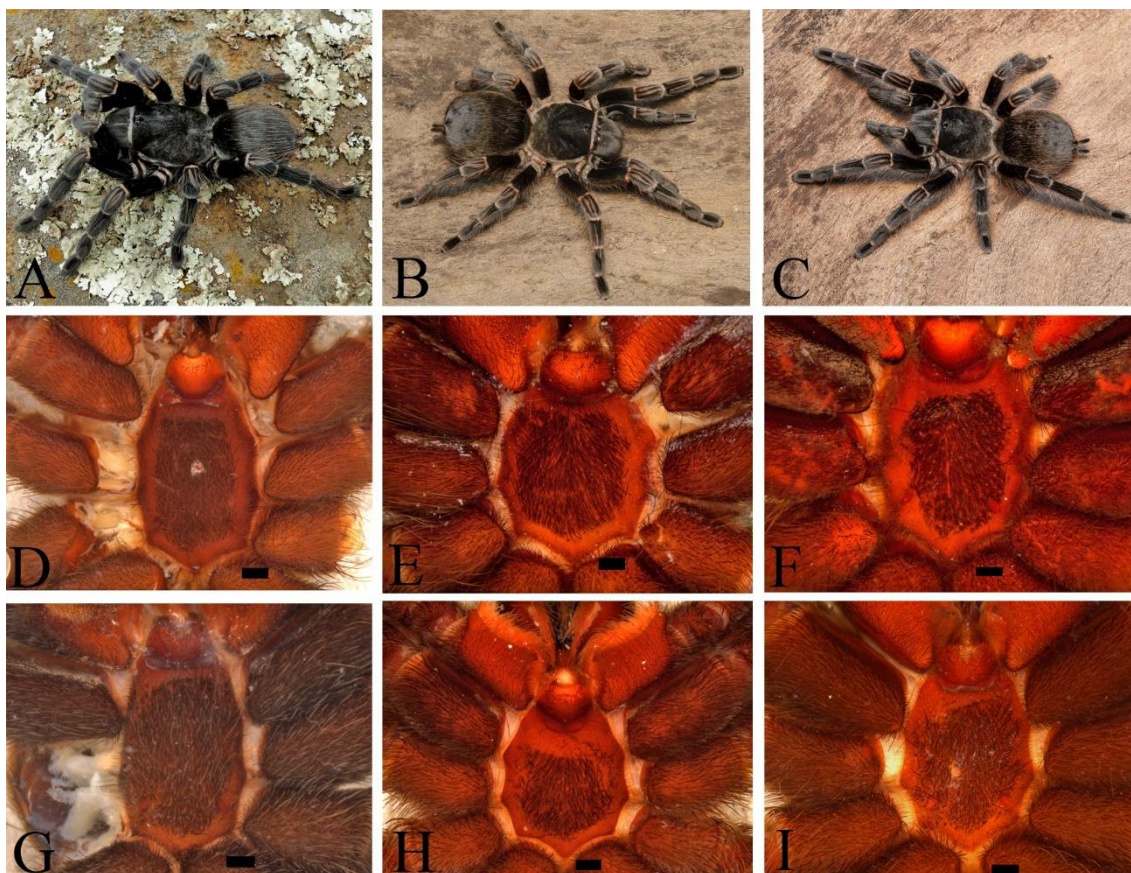


Figura 2. Espécies de *V. longisternalis* e dois morfótipos de *V. roseus*. A. Fêmea de *V. longisternalis*. B. Fêmea de *V. roseus*. C. Fêmea de *V. roseus* com esterno modificado. D. Vista

ventral do esterno feminino de *V. longisternalis* (IBSP 210343). E. Vista ventral do esterno feminino de *V. roseus* (MCTP 9939). F. Vista ventral do esterno feminino de *V. roseus* com esterno modificado (MCN 3045). G. Vista ventral do esterno masculino de *V. longisternalis* (LAB 032). H. Vista ventral do esterno masculino de *V. roseus* (MCTP 11202). I. Vista ventral do esterno masculino de *V. roseus* com esterno modificado (MCN 21076). Escala = 1mm. Fotos: R. P. Indicatti (A); L. M. Borges (B e C).

A figura 3-A indica a ACP dos esternos femininos, onde os CP 1 e CP 2 apresentaram contribuições de 69% e 6,9% do total da variância, respectivamente. O CP 1 se relaciona às variações em relação ao comprimento e largura dos esternos, enquanto o CP 2 indicam as variações em relação a região posterior desta estrutura (figura 3-B). No gráfico é possível observar que os dois morfótipos de *V. roseus* se separam entre si, bem como de *V. longisternalis*. A figura 4 corresponde ao morfoespaço da AVC, onde é possível observar visualmente uma alta separação entre as duas espécies, bem como a separação entre os dois morfótipos de *V. roseus*. Os valores de distâncias de Procrustes e Mahalanobis resultantes da AVC estão indicados na tabela 2.

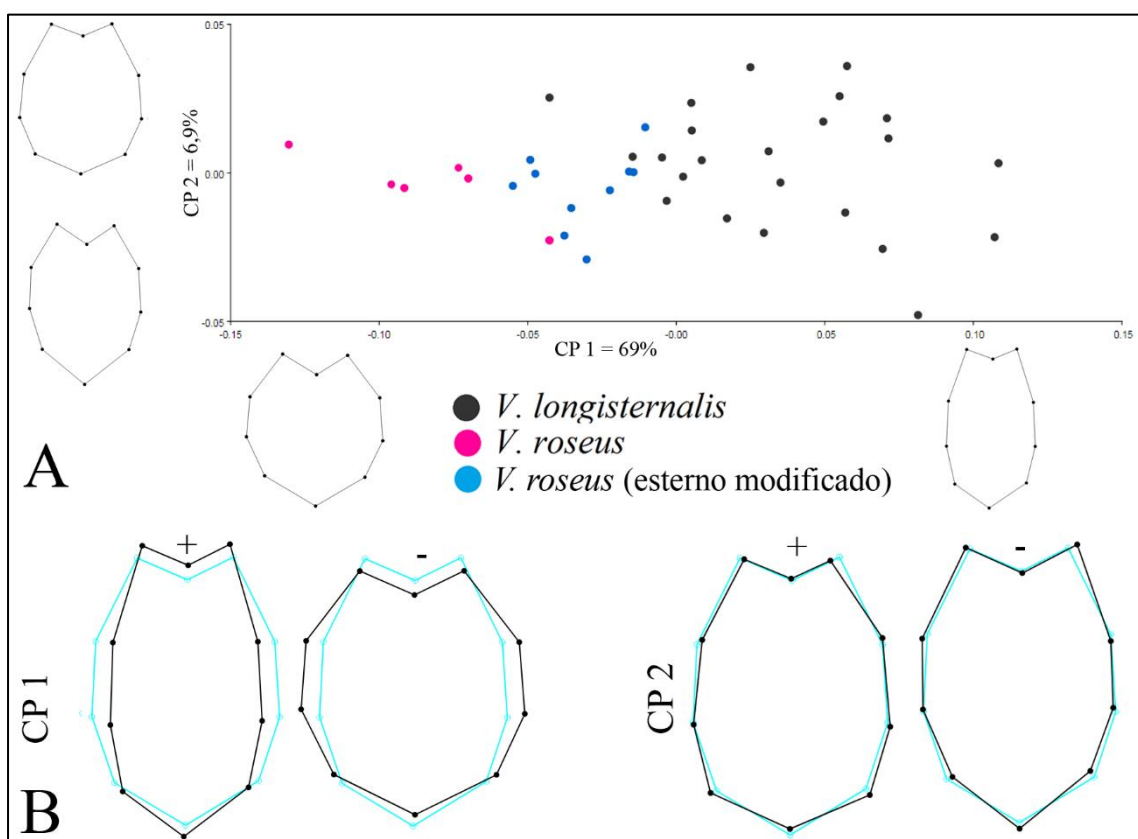


Figura 3, A-B. Estudo da forma do esterno das fêmeas de *V. longisternalis* e dois morfotipos de *V. roseus*. A. Espaço tangencial resultante da análise de componentes principais (ACP). B. Transformações dos extremos positivo e negativo do CP 1 e CP 2. Linhas pretas correspondem às variações extremas e linha azul à forma média.

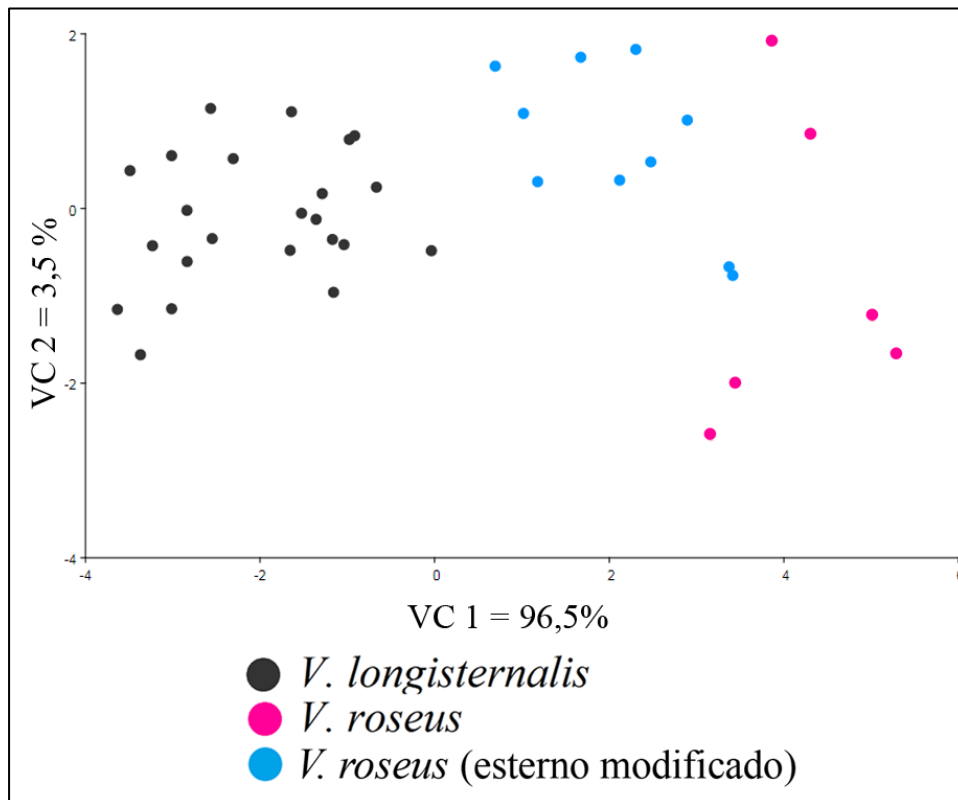


Figura 4. Espaço tangencial resultante da análise de variáveis canônicas (AVC) do esterno das fêmeas de *V. longisternalis* e dois morfotipos de *V. roseus*.

Tabela 2. Distâncias de Mahalanobis e Procrustes referente à AVC dos esternos das fêmeas de *V. longisternalis* e dois morfotipos de *V. roseus*. *P*-valores dos testes de permutação (10000 permutações) entre parêntesis.

	Distância de Mahalanobis		Distância de Procrustes	
	<i>V. roseus</i>	<i>V. roseus</i> (esterno modificado)	<i>V. roseus</i>	<i>V. roseus</i> (esterno modificado)
<i>V. longisternalis</i>	6,24 (p<0,0001)	4,2 (p<0,0001)	0,12 (p<0,0001)	0,07 (p<0,0001)
<i>V. roseus</i> (esterno modificado)	2,55 (p=0,06)		0,05 (p=0,0005)	

A figura 5-A corresponde a ACP dos esternos masculinos, que apresentou uma variância nos dois primeiros CPs de 75,3%, onde o CP 1 contribui com 67,9% da variância e o CP 2 com 7,4%. No gráfico também é possível constatar a separação de três grupos distintos. As transformações estruturais dos extremos correspondentes à cada CP em relação à forma média são

apresentadas na figura 5-B. Essa alta diferenciação entre os grupos é observada na AVC da figura 6, além dos valores significativos de distâncias de Mahalanobis e Procrustes da tabela 3.

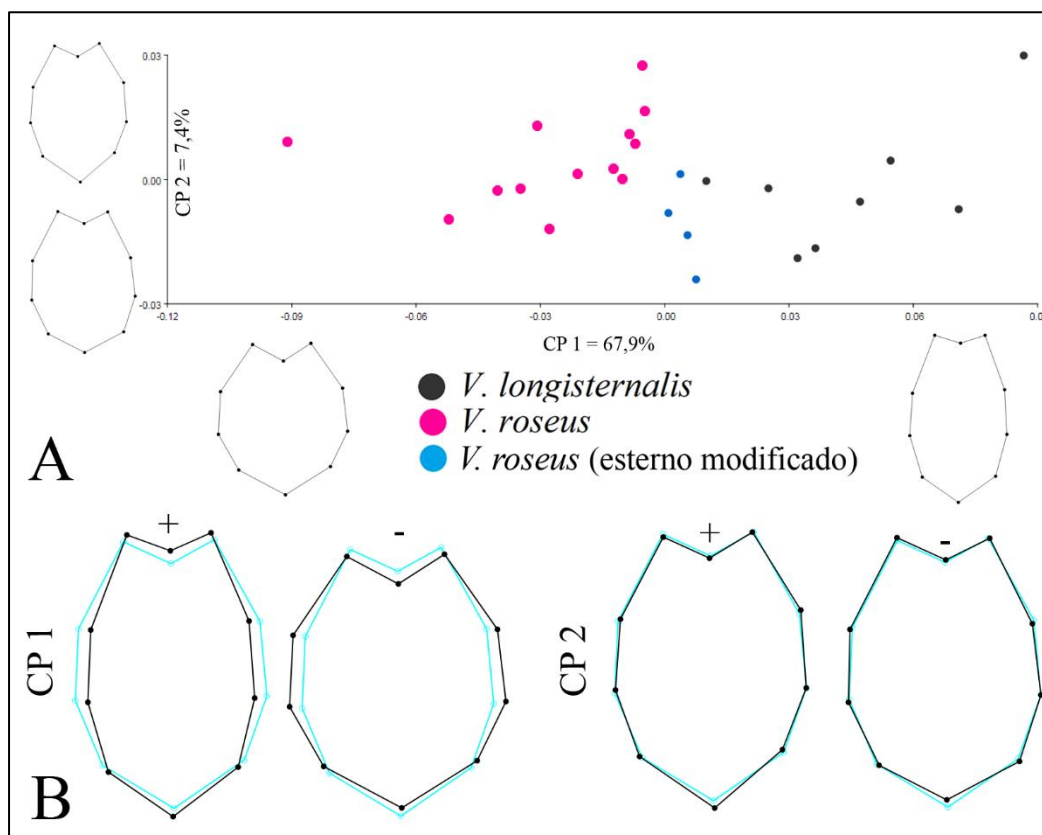


Figura 5, A-B. Estudo da forma do esterno dos machos de *V. longisternalis* e dois morfotipos de *V. roseus*. A. Espaço tangencial resultante da análise de componentes principais (ACP). B. Transformações dos extremos positivo e negativo do CP 1 e CP 2. Linhas pretas correspondem às variações extremas e linha azul à forma média.

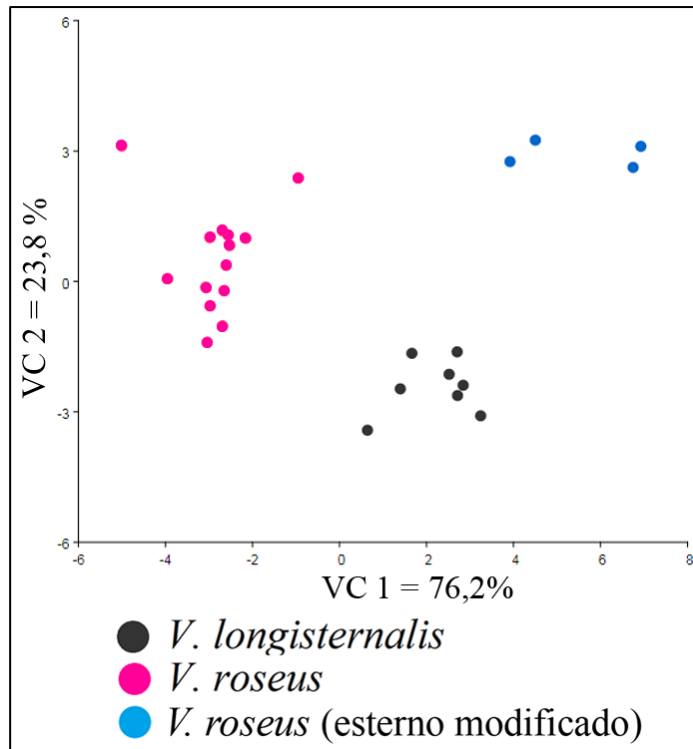


Figura 6. Espaço tangencial resultante da análise de variáveis canônicas (AVC) do esterno dos machos de *V. longisternalis* e dois morfotipos de *V. roseus*.

Tabela 3. Distâncias de Mahalanobis e Procrustes referente à AVC dos esternos dos machos de *V. longisternalis* e dois morfotipos de *V. roseus*. *P*-valores dos testes de permutação (10000 permutações) entre parêntesis.

	Distância de Mahalanobis		Distância de Procrustes	
	<i>V. roseus</i>	<i>V. roseus</i> (esterno modificado)	<i>V. roseus</i>	<i>V. roseus</i> (esterno modificado)
<i>V. longisternalis</i>	5,87 (p<0,0001)	6,30 (p=0,0007)	0,07 (p<0,0001)	0,04 (p=0,02)
<i>V. roseus</i> (esterno modificado)	8,70 (p=0,0002)		0,04 (p=0,009)	

Como é possível observar nas ACP das espermatecas e dos bulbos (figura 7, A-B), ambos morfótipos de *V. roseus* possuem forma das genitálias femininas e masculinas semelhantes, porém que se diferem de *V. longisternalis*.

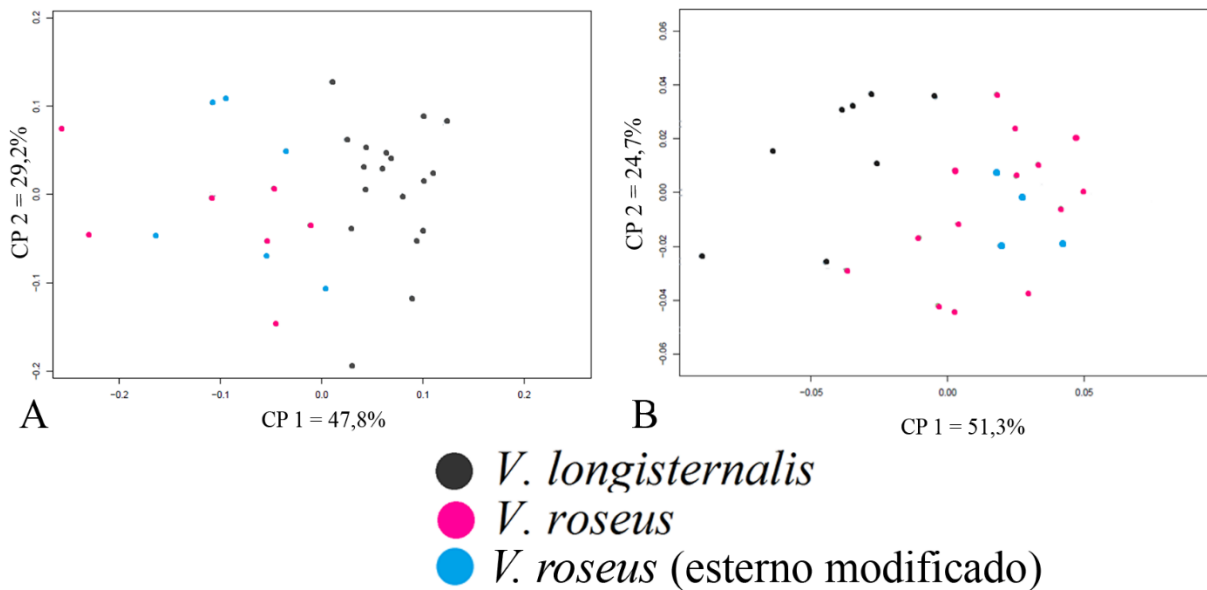


Figura 7. Análise de Componentes Principais (ACP) das genitálias de *V. longisternalis* e de dois morfotipos de *V. roseus*. A. ACP da forma da espermateca. B. ACP da forma do bulbo.

Outro destaque envolvendo estes indivíduos é de que esta estruturação morfológica do externo possa estar relacionada à algum fator biogeográfico. O mapa da figura 8 indica a distribuição destes três grupos sob a perspectiva dos biomas Mata Atlântica e Pampa. Nota-se que as populações de *V. roseus* com externo modificados encontram-se exclusivamente em bioma de Mata Atlântica, enquanto algumas populações do outro morfótipo de *V. roseus* ocorrem tanto em Mata Atlântica, quanto em Pampa. Destaca-se que ambas as populações de *V. roseus* da região noroestes do Rio Grande do Sul ocorrem em simpatria.

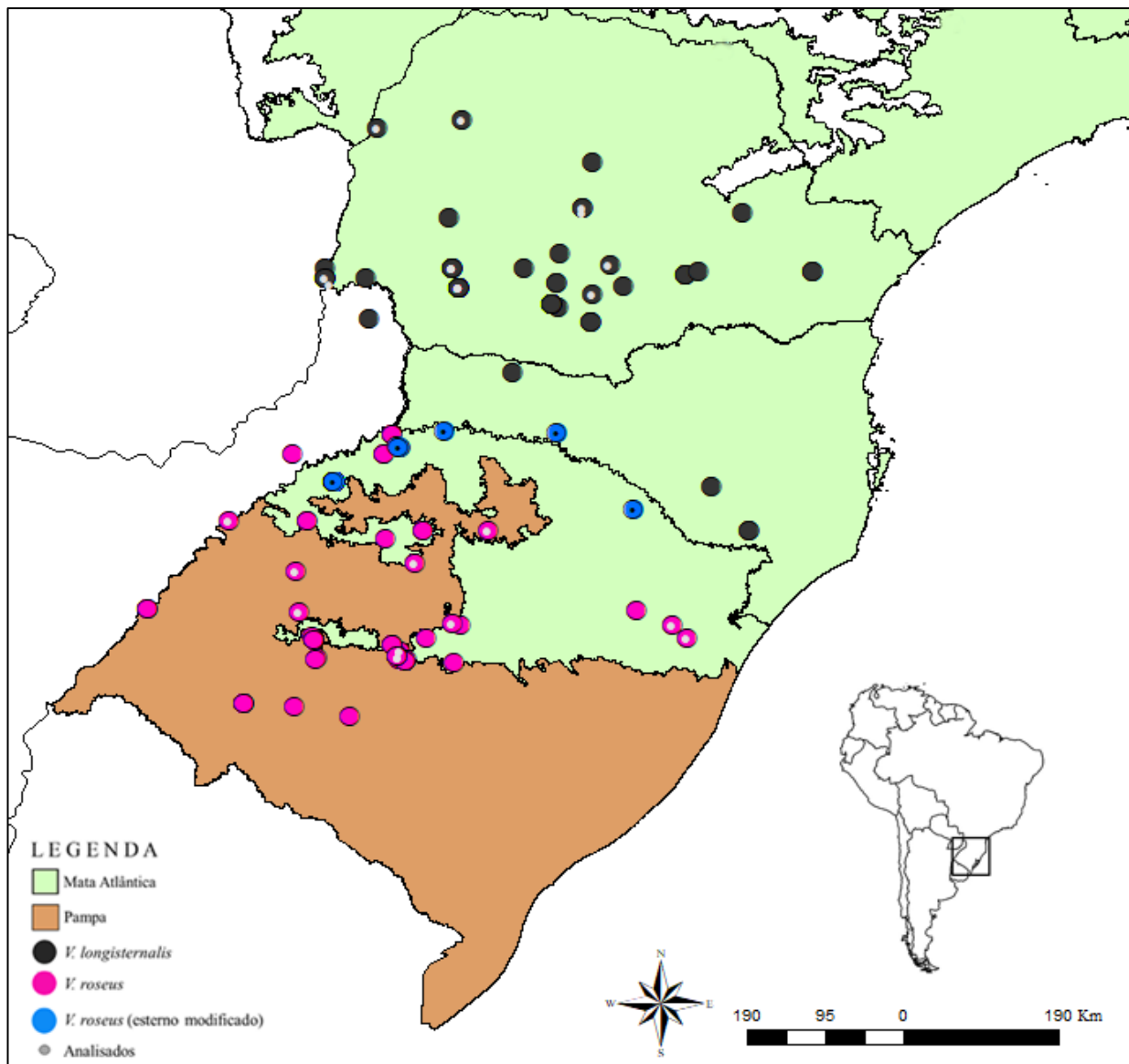


Figura 8. Mapa de ocorrência das espécies *V. longisternalis* e dois morfótipos de *V. roseus*.

#### 4. Discussão

O estudo da forma dos esternos de *V. roseus* possibilitou a descoberta de variação de forma em indivíduos de determinadas populações, onde tal estrutura apresentou uma maior semelhança aos esternos de *V. longisternalis* do que ao de outros indivíduos de *V. roseus*. Assumimos aqui que estes espécimes constituem um novo morfótipo de *V. roseus*, já que não houve agrupamento destes indivíduos nas análises das genitálias. Além disso, nota-se que a distribuição deste morfótipo de *V. roseus* com esterno modificado mantém-se ao norte e noroeste do estado do Rio Grande do Sul, em uma área de transição entre a ocorrência de *V. longisternalis* e indivíduos do outro morfótipo de *V. roseus*. Estas populações com esterno modificados podem constituir um caso de hibridização, porém devem ser investigadas mais a fundo se existem casos

de simpatria entre as duas espécies, além de estudos envolvendo métodos moleculares.

## 5. Conclusões

Este trabalho obteve êxito na identificação e delimitação de um novo morfótipo para a espécie *V. roseus*, através de um caráter morfológico usualmente utilizado na diagnose de espécies de *Vitalius*, o esterno. Entretanto, esta diferenciação aqui é apresentada sob uma perspectiva morfométrica, podendo ser útil no entendimento de como o levantamento de caracteres morfológicos deve ser realizado, onde nem toda estrutura deve ser tratada de forma descritiva.

O fato de a metodologia de morfometria geométrica ter se mostrado eficiente no reconhecimento de populações morfometricamente diferentes, faz com que exista possibilidades desta ferramenta metodológica ser eficiente para a caracterização de espécies crípticas. Espera-se que estas propostas apresentadas aqui possam ser aplicadas em outros grupos de aranhas Theraphosidae e auxiliar na interpretação de técnicas morfométricas para a delimitação de espécies, e assim contribuir com uma nova visão para futuras revisões taxonômicas de grupos zoológicos de alta complexidade morfológica.

## Referências bibliográficas

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.

BONHOMME, V. et al. Momocs: outline analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 56, n. 13, p. 24 p., 2014.

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

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.

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.

FERSON, S.; ROHLF, F. J.; KOEHN, R. K. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. **Systematic Biology**, v. 34, n. 1, p. 59-68, 1985.

KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 2, p. 353-357, 2011.

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.

ROHLF, F. J. ‘tpsDig.’. Available online at: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. 2001.

ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annual Review of Ecology and systematics**, p. 299–316, 1990.

ROHLF, F. J. tpsUtil, file utility program, version 1.26. **Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook**, 2004.

ROHLF, F. J.; ARCHIE, W. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Systematic Zoology**, v. 33, n. 3, p. 302-317, 1984.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in ecology & evolution**, v. 8, n. 4, p. 129–132, 1993.

TEAM, R. C. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

TORT, A. Morphological plasticity of the outline and the internal structures of the shell of the recent *Terebratella tenuis* sp. nov. (Brachiopoda, Terebratulida). **Zoomorphology**, v. 122, n. 1, p. 47-54, 2003.

WEN, H.; YANG, H.; WANG, X. A quantitative analysis of the wing outlines of owlflies (Insecta: Neuroptera: Ascalaphidae). **Animal Cells and Systems**, v. 19, n. 2, p. 149-155, 2015.

ZHAN, Q. B. & WANG, X. L. Elliptic Fourier analysis of the wing outline shape of five species of antlion (Neuroptera: Myrmeleontidae: Myrmeleontini). **Zoological Studies**, v. 51, n. 3, p. 399-405, 2012.

## ANEXO I

Lista de material examinado (coordenadas geográficas das ocorrências dos indivíduos foram obtidas pelos registros das coleções zoológicas ou capturadas através do *Google Earth*).

Espécies	Sexo	Coleção	Número	Município	Estado	País	Latitude	Longitude
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8143	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	LAB	20	Pitanga	PR	Brasil	-24.754796	-51.764821
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8141		PR	Brasil		
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8161	Três Barras do Paraná	PR	Brasil	-25.421588	-53.184705
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8162	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8134	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8139	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8144	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8146	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8149	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8150	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8155	Três Barras do Paraná	PR	Brasil	-25.618447	-53.184705
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8156	Três Barras do Paraná	PR	Brasil	-25.618447	-53.184705
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8159		PR	Brasil	-25.618447	-53.184705
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	106702	Foz do Iguaçu	PR	Brasil	-25.516643	-54.586105
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	108133	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8153	Três Barras do Paraná	PR	Brasil	-25.618447	-53.184705
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	151210	Pinhão	PR	Brasil	-25.618447	-51.654321
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	210343	Altônia	PR	Brasil	-25.618447	-54.006836
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8152	Três Barras do Paraná	PR	Brasil	-25.618447	-53.184705
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	8160	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	IBSP	106661	Andirá	PR	Brasil	-25.618447	-50.231502
<i>V. longisternalis</i>	F	MCN	17797	Concórdia	SC	Brasil	-25.618447	-52.035568
<i>V. longisternalis</i>	F	MCN	23409	Cruzeiro do Oeste	PR	Brasil	-25.618447	-53.076551
<i>V. longisternalis</i>	F	MCN	42445			Brasil		
<i>V. longisternalis</i>	F	MZUSP	74375	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	F	MCTP	17442			Brasil		
<i>V. longisternalis</i>	M	IBSP	8364	Cruzeiro do Iguaçu	PR	Brasil	-25.618447	-53.129949
<i>V. longisternalis</i>	M	LAB	32	Laranjeiras do Sul	PR	Brasil	-25.618447	-52.413566
<i>V. longisternalis</i>	M	LAB	33	Guarapuava	PR	Brasil	-25.618447	-51.315701
<i>V. longisternalis</i>	M	LAB	34	Pitanga	PR	Brasil	-24.754796	-51.764821
<i>V. longisternalis</i>	M	LAB	35	Guarapuava	PR	Brasil	-25.618447	-51.315701
<i>V. longisternalis</i>	M	MCN	11344	São Domingos	SC	Brasil	-26.552800	-52.532115
<i>V. longisternalis</i>	M	MZUSP	74055	Foz do Iguaçu	PR	Brasil	-25.516644	-54.588852
<i>V. longisternalis</i>	M	PNI_2018_The	5	Foz do Iguaçu	PR	Brasil	-25.455185	-53.872651
<i>V. longisternalis</i>	M	PR_2020_The	9	Pitanga	PR	Brasil	-24.754796	-51.764821
<i>V. roseus</i>	F	MZSP	143	Itaqui	RS	Brasil	-29.142104	-56.532829
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	4524	Tenente Portela	RS	Brasil	-27.357951	-53.778327
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	5509	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	5996	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	7M/3F	IBSP	6706	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	J	IBSP	6707	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	6M/J	IBSP	6708	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752

<i>V. roseus</i>	6M/J	IBSP	6709	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6710	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6711	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	2M/3F	IBSP	6712	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6713	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	2M/3F	IBSP	6714	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	J	IBSP	6715	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6716	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	4N	IBSP	6717	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	3M	IBSP	6718	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6719	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6720	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6721	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6722	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6723	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6724	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6725	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6726	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6727	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6728	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6729	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6730	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6731	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6732	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6733	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6734	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6735	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6736	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6737	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6738	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6739	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	2F/2J	IBSP	6740	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	2F/1J	IBSP	6741	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	5M	IBSP	6742	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	5M	IBSP	6743	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	5M	IBSP	6744	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	5M	IBSP	6745	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	5M	IBSP	6746	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	3M	IBSP	6747	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6900	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6904	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	21232	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	21031	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCTP	1317	Ijuí	RS	Brasil	-28.387772	-53.92955
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	1741	Bossoroca	RS	Brasil	-28.731131	-54.902374
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	2937	Itaqui	RS	Brasil	-29.142104	-56.532829
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6883	Itaqui	RS	Brasil	-29.142104	-56.532829
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	17732	Itaúba	RS	Brasil	-29.335074	-53.094821

<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	22102	Caxias do Sul	RS	Brasil	-29.160848	-51.175501
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6887	São Vicente do Sul	RS	Brasil	-29.691593	-54.676421
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	6884	Santa Maria	RS	Brasil	-29.684945	-53.778245
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6885	Santa Maria	RS	Brasil	-29.684945	-53.778245
<i>V. roseus</i>	F	IBSP	6886	Santa Maria	RS	Brasil	-29.684945	-53.778245
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	9549	Santa Maria	RS	Brasil	-29.684945	-53.778245
<i>V. roseus</i>	M	IBSP	1963	São Gabriel	RS	Brasil	-30.331342	-54.323287
<i>V. roseus</i>	M	MCTP	11202	Santiago	RS	Brasil	-29,190,713.00	-54,866,099
<i>V. roseus</i>	M	MCTP	10072	Tenente Portela	RS	Brasil	-27,370,817.00	-53,758,107
<i>V. roseus</i>	F	MCTP	4850	São Francisco de Paula	RS	Brasil	-29,468,202.00	-50,611,643
<i>V. roseus</i>	M	MCTP	39401	Itaara	RS	Brasil	-29,609,857.00	-53,763,310
<i>V. roseus</i>	F	MCTP	9939	Canela	RS	Brasil	-29,335,741.00	-50,783,410
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21075	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21197	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21074	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	9550	Santa Maria	RS	Brasil	-29.684945	-53.778245
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21200	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21199	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21198	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21027	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21025	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21026	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21209	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21028	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	4011	Carazinho	RS	Brasil	-28,290,291	-52.798065
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21076	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	3045	Irai	RS	Brasil	-27,191,873	-53.262140
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	8987	Tenente Portela	RS	Brasil	-27,370,589	-53.757850
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	42460	Esmeralda	RS	Brasil	-28,052,084	-51.193911
<i>V. roseus</i>	MJ	MCN-RS	8376	Tenente Portela	RS	Brasil	-27,370,741	-53.757764
<i>V. roseus</i>	M	MCN-RS	21024	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	4357	Cruz Alta	RS	Brasil	-28,643,445	-53.607783
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	17731	Itauba	RS	Brasil	-29,300,754	-53.193960
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	21030	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	9998	São Borja	RS	Brasil	-28,188,765	-55.637996
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	21210	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752
<i>V. roseus</i>	F	MCN-RS	21029	Tuparendí	RS	Brasil	-27.759414	-54.477752

## ANEXO II – Material suplementar: resultados da morfometria geométrica (em inglês)

### Dataset - sternum females:

New Procrustes fit:

10 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 39 observations, of which 39 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	0.1282981	0.3329789
2	0.2409252	0.1041853
3	0.2541627	-0.1001081
4	0.1972553	-0.2728916
5	-0.0007766	-0.3936569
6	-0.1934582	-0.2781356
7	-0.254602	-0.099551
8	-0.2444504	0.104856
9	-0.1318011	0.3306764
10	0.004447	0.2716467

Procrustes sums of squares: 0.18635942307476652  
Tangent sums of squares: 0.1848334120718341

Procrustes ANOVA: Procrustes ANOVA ...  
Classifiers used for the Procrustes ANOVA:  
Individuals: Morpho

Centroid size:

Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	553755.915951	276877.957975	2	3.00	0.0624
Residual	3323006.893252	92305.747035	36		

Shape, Procrustes ANOVA:

Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0.08236472	0.0025738976	32	14.47	<.0001	1.10	0.0550
Residual	0.10246869	0.0001778970	576				

Regression Analysis: Regression

Total sample size: 39

Sums of squares

Total SS:	0.18483341
Predicted SS:	0.00823647
Residual SS:	0.17659695
% predicted:	4.4562%

Permutation test against the null hypothesis of independence

Number of randomization rounds: 10000

P-value: 0.1587

Principal Component Analysis: PCA: CovMatrix, Regression, results, Regression residuals

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1	0.0032077	69.023	69.023
2	0.0003229	6.948	75.971
3	0.0002617	5.63	81.602
4	0.0001862	4.007	85.608
5	0.0001573	3.385	88.993
6	0.0001254	2.697	91.69
7	9.427E-05	2.029	93.718
8	6.531E-05	1.405	95.124
9	4.737E-05	1.019	96.143
10	4.395E-05	0.946	97.089
11	3.816E-05	0.821	97.91
12	3.022E-05	0.65	98.56
13	2.917E-05	0.628	99.188
14	0.0000201	0.432	99.62
15	1.268E-05	0.273	99.893
16	4.96E-06	0.107	100
Total variance:	0.00464729		

Variance of the eigenvalues: 0.0000005755371

Eigenvalue variance scaled by total variance: 0.02665

Eigenvalue variance scaled by total variance and number of variables: 0.45480

Note: throughout all calculations of eigenvalue variances, the dimensionality used was 16.

Please double-check because this dimensionality may not be appropriate for all situations.

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: Regression, results

Classification criterion: Morpho

Groups	Observations	
1	V. longisternalis	23
2	V.roseus (sternum modified)	10
3	V.roseus	6

Variation among groups, scaled by the inverse of the within-group variation

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1	6.75042582	96.506	96.506
2	0.24437298	3.494	100

Dataset - sternum males:

New Procrustes fit:

10 landmarks in 2 dimensions.

The dataset contains 26 observations, of which 26 are included for analyses.

Average shape:

Lmk.	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	0.11786801	0.3341126
2	0.24165372	0.1119658
3	0.26081469	-0.090815
4	0.1992005	-0.264962
5	0.00820383	-0.396582
6	-0.18599943	-0.279566
7	-0.26039948	-0.103515
8	-0.25163265	0.0918605
9	-0.12949697	0.3281934
10	-0.00021222	0.2693082

Procrustes sums of squares: 0.06756710146435309

Tangent sums of squares: 0.06725634651803916

Procrustes ANOVA: Procrustes ANOVA ...

Classifiers used for the Procrustes ANOVA:

Individuals: Morpho

Centroid size:

Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	159920.543539	79960.271769	2	1.55	0.2332
Residual	1185101.819438	51526.166063	23		

Shape, Procrustes ANOVA:

Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0.04024068	0.0012575213	32	17.13	<.0001	1.83	0.0001
Residual	0.02701567	0.0000734121	368				

Regression Analysis: Regression

Total sample size: 26

Sums of squares

Total SS: 0.06725635

Predicted SS: 0.01053862

Residual SS: 0.05671773

% predicted: 15.6693%

Permutation test against the null hypothesis of independence

Number of randomization rounds: 10000

P-value: 0.0177

Principal Component Analysis: PCA: CovMatrix, Regression, results, Regression residuals

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1	0.00154125	67.935	67.935
2	0.00016736	7.377	75.312
3	0.00014305	6.305	81.617
4	0.00009554	4.211	85.828
5	0.00007785	3.431	89.26
6	0.00005984	2.638	91.897
7	0.00004943	2.179	94.076
8	0.00003848	1.696	95.772
9	0.00002694	1.187	96.959
10	0.00002006	0.884	97.843
11	0.00001806	0.796	98.64
12	0.00001203	0.53	99.17
13	0.00000768	0.339	99.508
14	0.00000661	0.291	99.8
15	0.00000301	0.133	99.932
16	0.00000154	0.068	100
Total variance: 0.00226871			

Variance of the eigenvalues: 0.0000001329142

Eigenvalue variance scaled by total variance: 0.02582

Eigenvalue variance scaled by total variance and number of variables: 0.44072

Note: throughout all calculations of eigenvalue variances, the dimensionality used was 16.

Please double-check because this dimensionality may not be appropriate for all situations.

Canonical Variate Analysis: CVA ...

Dataset: Regression, results

Classification criterion: Morpho

Groups	Observations	
1	V. longisternalis	8
2	V. roseus (sternum modified)	4
3	V.roseus	14

Variation among groups, scaled by the inverse of the within-group variation

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1	11.94200874	76.205	76.205
2	3.72880411	23.795	100

Dataset - spermathecae:

N° of harmonics = 6

PC's proportions

proportion cumulative

PC1 47.819969 47.81997

PC2	29.227812	77.04778
PC3	11.286991	88.33477
PC4	3.776751	92.11152
PC5	2.158034	94.26956

Dataset – palpal bulbs:

	N° of harmonics = 5	
	PC's proportions	
	proportion cummulative	
PC1	51.268213	51.26821
PC2	24.662576	75.93079
PC3	8.051580	83.98237
PC4	4.918283	88.90065
PC5	4.391117	93.29177

## Capítulo II

### A busca por limites morfológicos: a delimitação de duas espécies de aranhas

#### Theraphosinae usando Análise Elíptica de Fourier

##### Resumo

A espécie *Pterinopelma sazimai* Bertani, Nagahama & Fukushima, 2011 sempre gerou dúvidas acerca de sua morfologia, sendo semelhante aos demais gêneros que possuem quilhas retrolateral e subapical. Sua posição filogenética, relaciona a espécie com os gêneros *Vitalius* Lucas, Silva e Bertani, 1993 e *Nhandu* Lucas, 1983, com base nestas quilhas dos bulbos masculinos. A ocorrência da espécie se mantém pela região central de Minas Gerais, Brasil, que acaba apresentando em alguns pontos, a mesma distribuição que a espécie *V. nondescriptus* (Mello-Leitão, 1926). A alta homogeneidade no bulbo copulador e a mesma área de ocorrência pode gerar diversos erros de identificação entre essas duas espécies, sendo questionado se existe alguma diferença na forma deste caráter. O objetivo deste estudo foi testar e quantificar as diferenças na forma do bulbo copulador dos machos de *P. sazimai* e *V. nondescriptus*. Para isso, foi realizado um estudo de contorno fechado deste caráter através de Análise Elíptica de Fourier. Os resultados indicaram diferenças na forma destes bulbos copuladores, sem levar em conta a quilha subapical. Além disso, foram realizados alguns levantamentos de caracteres morfológicos que também auxiliam na diferenciação destas duas espécies, como os padrões de coloração, proporções e posições de suas apófises tibiais. As análises de contorno fechado se mostraram aqui uma ferramenta eficiente para o auxílio na identificação destas duas espécies com alta similaridade morfológica, apontando de forma gráfica as principais diferenças de suas estruturas morfológicas.

Palavras chave: Tarântulas, morfometria, contornos, morfologia

## 1. Introdução

O gênero *Pterinopelma* Pocock 1901 foi revalidado por Bertani et al. (2011), onde ainda descreveram a espécie *P. sazimai* e incluíram o gênero em uma matriz filogenética morfológica, sugerindo seu relacionamento à *Lasiodora* C. L. Koch, 1850, *Vitalius* e *Nhandu*.

Em seguida, Bertani et al. (2012), propuseram uma combinação nova para a espécie *V. nondescriptus*, que possui ocorrência para mesma área que *P. sazimai* (região central do estado de Minas Gerais, Brasil).

Em 2016, Bertani & Leal descreveram uma nova espécie de *Pterinopelma*, esta nomeada de *P. felipeleitei* Bertani & Leal, 2016. Ainda neste trabalho, os autores discutiram que o macho de *P. felipeleitei* havia sido descrito erroneamente sob o nome de *P. sazimai*, e propuseram uma nova descrição para o verdadeiro macho desta espécie. Entretanto, Bertani & Leal (2016) não apresentaram uma nova hipótese filogenética para entender o posicionamento de *Pterinopelma* após essas correções taxonômicas.

Com o intuito de testar o relacionamento evolutivo de aranhas Theraphosinae, baseado na presença de cerdas estridulatórias, Galleti-Lima & Guadanucci (2018) incluíram as espécies de *Pterinopelma*, (agora com as correções das espécies realizadas por Bertani & Leal, 2016) em uma matriz morfológica e notaram que *P. sazimai* se apresentou relacionada aos gêneros *Nhandu* e *Vitalius* e distante das outras espécies de *Pterinopelma*, devido à semelhança no bulbo copulador.

O posicionamento taxonômico com base em caracteres morfológicos de *P. sazimai* ainda é complexo e pode gerar erros de identificação quando comparada com espécies de *Vitalius*, como *V. nondescriptus*, que além de possuir semelhança morfológica do bulbo, compartilha uma mesma área de ocorrência. Acreditamos que a forma dos bulbos copuladores destas duas espécies apresentem de fato alguma diferença, porém imperceptível sob uma investigação taxonômica superficial, devendo ser investigado sob uma perspectiva de forma morfogeométrica.

A Análise Elíptica de Fourier vem se mostrando eficiente para estudos que buscam recuperar formas estruturais. Nela são excluídos efeitos de rotação, orientação e posição, através das chamadas coeficientes da primeira harmônica (CRAMPTON, 1995).

Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma delimitação e um estudo da forma do bulbo copulador de *P. sazimai* e *V. nondescriptus*, usando uma metodologia de contorno fechado conhecida como Análise Elíptica de Fourier (KUHL & GIARDINA, 1982). Ainda destacamos caracteres diagnósticos que auxiliam na diferenciação destas duas espécies.

## 2. Material e métodos

O material analisado é proveniente da Coleção Aracnológica de Diamantina (CAD), Rio Claro, São Paulo – J. P. L. Guadanucci. A lista com as informações dos *vouchers* utilizados neste trabalho podem ser encontrados no Anexo I. Os bulbos foram fotografados na face prolatral utilizando câmera Leica MC 170 *hd* embutida em um estereomicroscópio Leica M205C e *software* Leica *Application Suite* LAS V4.12. A pré-identificação das espécies seguiu as descrições de Bertani et al. (2012) e Bertani & Leal (2016). Os contornos dos bulbos copuladores (excluindo o subtégulo) foram realizados com o uso *software* Adobe Photoshop CS6, de onde se extraíram as silhuetas pretas e posteriormente a alteração da escala de cor para cinza, para então serem compactadas em fundo branco e reagrupadas em pasta única. A Análise Elíptica de Fourier foi realizada através do *software* R *environment* (R Core Team, 2016), com a utilização do pacote de linguagem R para análises de contornos ‘Momocs’ (BONHOMME et al., 2014). O número de harmônicos utilizado foi estipulado através de um comando específico que visa recuperar a forma máxima do contorno da estrutura. Como não queríamos incluir a quilha subapical na análise, optamos por utilizar um total de cinco harmônicos ( $h = 5$ ), recuperando uma forma menos rebuscada e mais generalizada do bulbo copulador. Após a definição do número de harmônicos, as variações dos contornos dos grupos foram analisadas através de uma Análise de Componentes Principais (ACP), com o intuito de se observar as variações de forma e posteriormente sofreram uma Análise Discriminante Linear (ADL), para verificar a porcentagem de classificação correta de cada indivíduo com sua respectiva espécie.

## 3. Resultados

A ACP resultou em um espaço tangencial (figura 1-A) onde as duas espécies se mostraram isoladas. Nesta ACP, os dois primeiros CP's contribuíram em 68,1% do total da variância, onde o CP 1 apresentou 48,4% e o CP 2 19,7%. Os CPs 3, 4 e 5 contribuíram apenas em 9,61%, 9,22% e

5,39%, respectivamente. As transformações entre os extremos positivos e negativos em cada um dos CP's estão indicadas na figura 1-B. A análise discriminante resultou em 100% dos indivíduos de cada espécie recuperados de forma correta. Esta análise discriminante linear (ADL) que amplifica essa separação entre as espécies pode ser observada na figura 2.

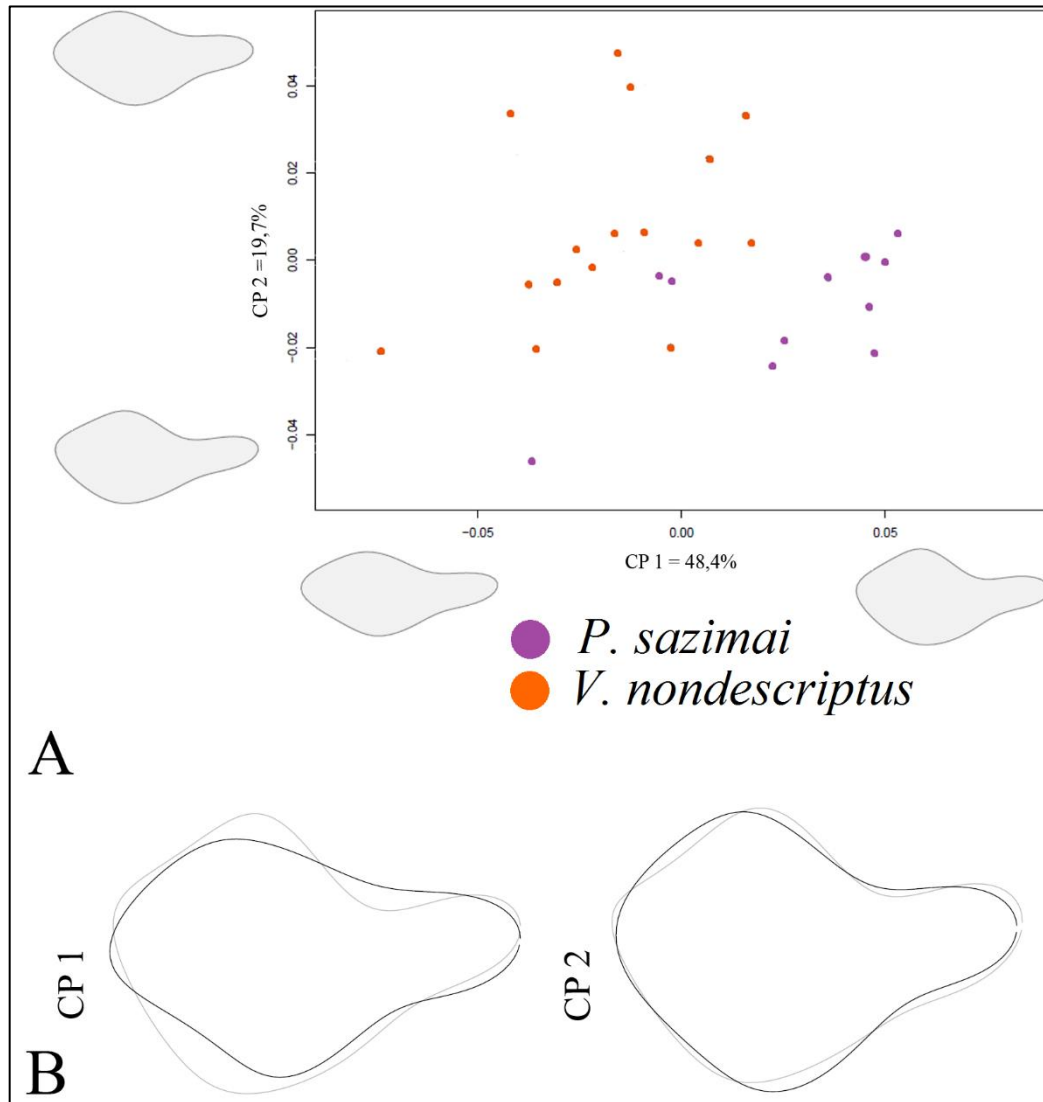


Figura 1, A-B. Estudo da forma dos bulbos dos machos de *P. sazimai* e *V. nondescriptus*. A. Espaço tangencial resultante da análise de componentes principais (ACP). B. Transformações entre os extremos positivo e negativo do CP 1 e CP 2. Linhas cinzas correspondem às formas pertencentes aos extremos positivos e as pretas aos extremos negativos.

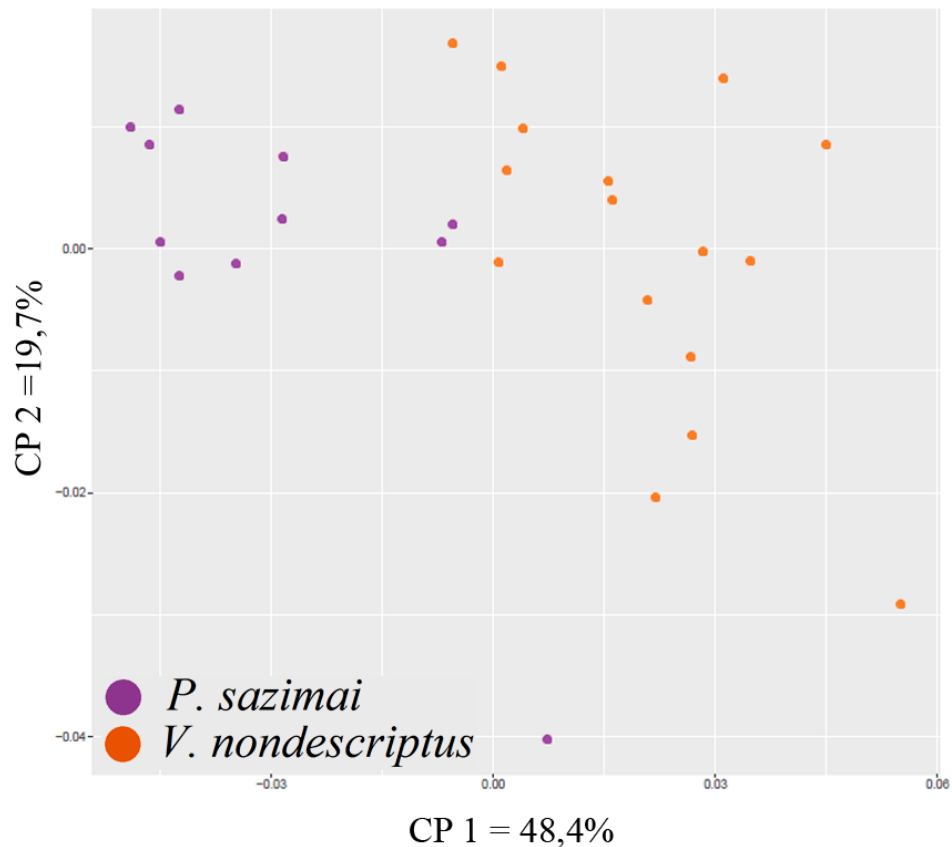


Figura 2. Espaço tangencial resultante da análise discriminante linear (ADL) dos bulbos dos machos de *P. sazimai* e *V. nondescriptus*.

Outras diferenças taxonômicas entre as duas espécies podem ser observadas na figura 3. Aqui é possível notar que *P. sazimai* possui um padrão de coloração azulada e mais contrastante, quando comparada com *V. nondescriptus*, que mantém um padrão acinzentado e revestidos por cerdas marrons. Além disso, *V. nondescriptus* possui tufo de cerdas no metatarso das pernas IV, o que não é observado em *P. sazimai*. A apófise tibial destas espécies também apresenta variações em relação a espessura de seus ramos e posicionamento na tíbia, com *P. sazimai* possuindo apófise com ramos mais engrossados e posicionada mais centralizada na tíbia I, enquanto *V. nondescriptus* apresenta sua apófise com ramos mais delgados e posicionada na face prolatral da tíbia.

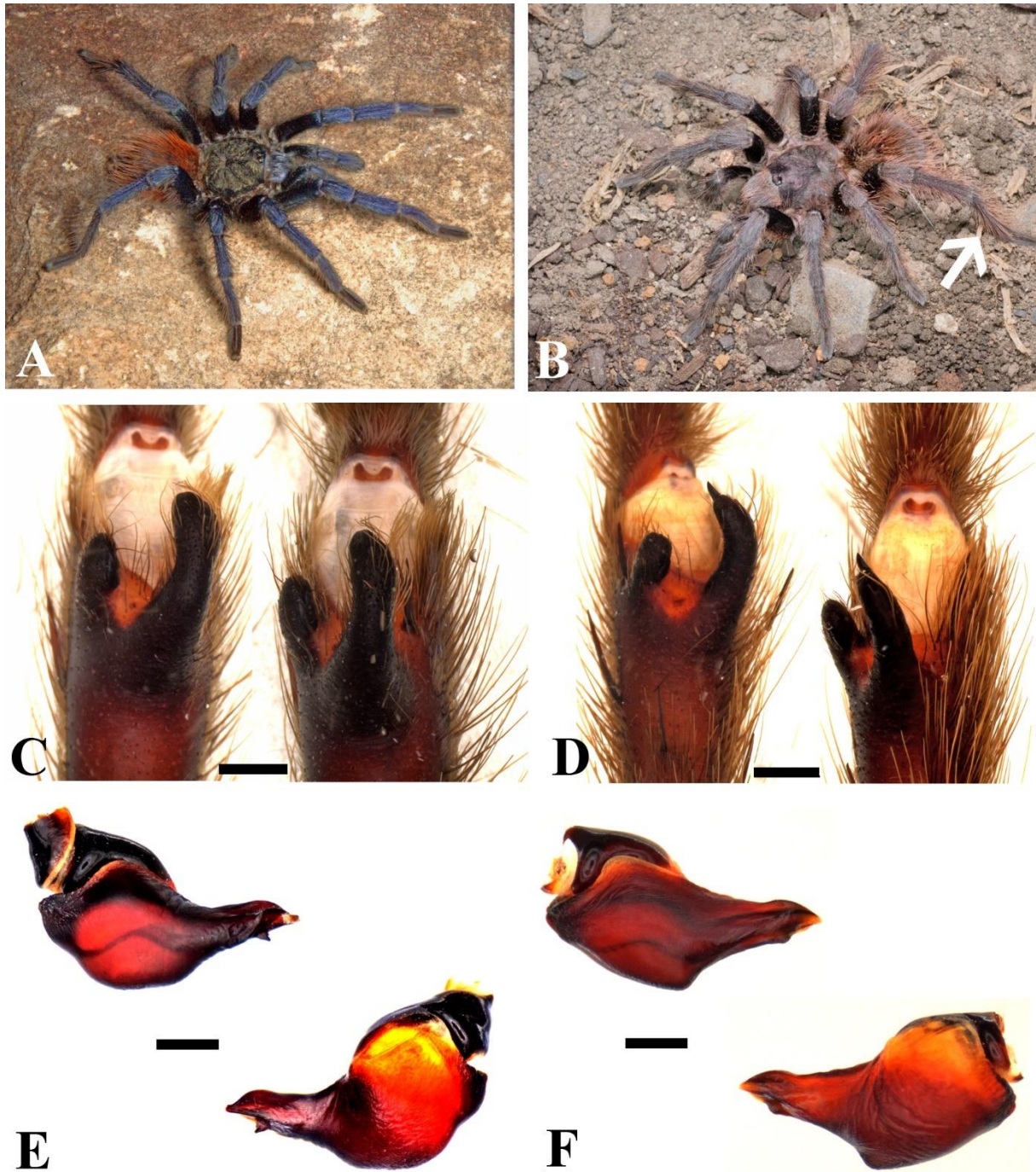


Figura 3. Machos das espécies *P. sazimai* e *V. nondescriptus*. A. Macho em vida de *P. sazimai*. B. Macho em vida de *V. nondescriptus*. Seta indicando tufos de cerdas nos metartasos da pernas IV. C. Apófise tibial masculino de *P. sazimai*. D. Apófise tibial masculino de *V. nondescriptus*. E. Bulbo copulador masculino de *P. sazimai*. F. Bulbo copulador masculino de *V. nondescriptus*. Escala = 1 mm. Fotos: P. H. Martins (A); W. Moeller (B).

#### 4. Discussões

Apesar de as fêmeas destas espécies não gerarem dúvidas em suas diferenciações, devido *P. sazimai* possuir a presença de cerdas urticantes tipo I e III e *V. nondescriptus* possuir apenas

cerdas urticantes tipo I modificadas, a presença de quilha subapical no bulbo masculino pode causar confusões em suas identificações. Nos resultados da ACP dos contornos dos bulbos, a diferenciação das espécies foi eficiente. Um destaque importante são as transformações referentes ao CP 1, que indicam que a região inferior do bulbo de *V. nondescriptus* é mais pronunciada do que em *P. sazimai* e a quilha prolateral superior (que é fundida ao êmbulo) é mais pronunciada em *P. sazimai*, do que em *V. nondescriptus*. Por outro lado, as transformações do CP 2, apontam que as principais diferenças se encontram na região de contato do subtégulo com o tégulo, onde alguns indivíduos de ambas as espécies possuem uma maior curvatura desta região.

Outra notável diferença entre *P. sazimai* e *V. nondescriptus* é o padrão de cor, com a primeira apresentando tons azulados, variando para mais claros e escuros, enquanto *V. nondescriptus* apresenta uma coloração acinzentada (figura 3 A e B). Além disso, a flexão do metatarso I em relação ao ramo retrolateral da apófise tibial é um importante caráter, que foi discutido por Bertani et al. (2012) e Bertani & Leal (2016). Em *P. sazimai*, o metatarso I se flexiona sobre o ramo retrolateral da apófise tibial (Figura 3 C e D), enquanto em *V. nondescriptus*, o metatarso I se fecha retrolateralmente à apófise (Figura 3 E e F).

## 5. Conclusões

A metodologia de Análise Elíptica de Fourier se mostrou satisfatória para a diferenciação do bulbo copulador de *P. sazimai* e *V. nondescriptus*. As diferenças verificadas corroboram as discussões propostas por Bertani & Leal (2016) e Galleti-Lima & Guadanucci (2018), que diziam que a forma do bulbo destas espécies era diferente. A alta semelhança morfológica de outros caracteres ainda mantém dúvidas sobre o posicionamento de *P. sazimai* em Theraphosinae, bem como *V. nondescriptus*, visto que esta espécie de *Vitalius* nunca foi incluída em nenhuma matriz filogenética. Essas questões poderão ser melhor compreendidas com novas análises filogenéticas morfológicas e também moleculares.

## Referências bibliográficas

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, n. 5, p. 467-473, 2012.

BERTANI, R.; LEAL, F. A new species of *Pterinopelma* (Araneae: Theraphosidae) from the highlands of the state of Minas Gerais, Brazil and description of the male of *P. sazimai*. **Zoologia (Curitiba)**, v. 33, n. 2, 2016.

BERTANI, R.; NAGAHAMA, R. H.; FUKUSHIMA, C. S. Revalidation of *Pterinopelma* Pocock 1901 with description of a new species and the female of *Pterinopelma vitiosum* (Keyserling 1891) (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae). **Zootaxa**, v. 2814, n. 1, p. 1-18, 2011.

BONHOMME, V. et al. Momocs: outline analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 56, n. 13, p. 24 p., 2014.

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.

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.

TEAM, R. C. R: A language and environment for statistical computing [Computer software manual]. **Vienna, Austria**, 2016.

## ANEXO I

Lista de material examinado (coordenadas geográficas das ocorrências dos indivíduos foram obtidas pelos registros das coleções zoológicas ou capturadas através do *Google Earth*).

Espécies	Sexo	Coleção	Número	Município	Estado	País	Latitude	Longitude
<i>V.nondescriptus</i>	M	CMD	1	Conceição do Mato Dentro	MG	Brasil	-19.035336	-43.424901
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	1	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	83	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	85	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	92	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	461	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	463	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	464	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	465	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	468	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	498	São Gonçalo do Rio Preto	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	589	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	273	São Gonçalo do Rio Preto	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	345	São Gonçalo do Rio Preto	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	CAD	607	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>V.nondescriptus</i>	M	SE_2018_The	9	Serra do Cipó	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	CAD	4	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	CAD	84	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	CAD	95	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	CAD	96	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	CAD	466	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649

<i>P. sazimai</i>	M	CAD	479	Diamantina	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	SE_2018_The	2	Serra do Cipó	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	SE_2018_The	8	Serra do Cipó	MG	Brasil	-18.224288	-43.609649
<i>P. sazimai</i>	M	MZUSP	74056		GO	Brasil		

## Capítulo III

Biogeography and morphometrics to delimitate two species of *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani (Mygalomorphae: Theraphosidae)

Arthur Galleti-Lima<sup>1</sup> & José Paulo Leite Guadanucci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Biodiversidade, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil;*

### ABSTRACT

The genus *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani, 1993, comprises a case of the so-called “taxonomic nightmare” in the Mygalomorphae spiders, in which diagnosis of many species is based in discrete characters of subjective delimitation. The close related species *Vitalius paranaensis* Bertani, 2001 and *Vitalius vellutinus* (Mello-Leitão, 1923) are examples of this problem, since females are morphologically indistinguishable and are differentiated only by the geographical distribution. Using both traditional and geometric morphometric analyses, along with Elliptical Fourier Analysis, we aimed to provide evidence to warrant species recognition between females of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. Species Distribution Modelling was performed to verify the occurrence suitability areas for each species. Our results show that these females can be distinguished by the thickness of legs, leg length proportion and shape of spermatheca. Moreover, the analyses confirmed conspicuous differences between the shape of male palpal bulbs. Species Distribution Modelling indicated that *V. vellutinus* has an area of suitability for occurrence in the north of Paraná, as well as *V. paranaensis* in the south of São Paulo. Since there are no records of these species in these locations, we questioned, using detailed maps, possible geographic barriers that may have influenced their current distributions. Finally, we highlight the importance precise morphological analyses to making decisions in Theraphosidae taxonomy.

## INTRODUCTION

*Vitalius* Lucas, Silva & Bertani, 1993 is a genus of theraphosids spiders belonging to the subfamily Theraphosinae Thorell, 1870. Currently, the genus comprises ten species, that are distributed in south and southeast regions of Brazil, some of them also occurring in Misiones, Argentina (Bertani, 2001; Ferretti et al., 2014; 2015). Due to the morphological homogeneity, a precise delimitation and identification of *Vitalius* species can be difficult, which is the case of the species *V. parananensis* and *V. vellutinus* (Fig. 1). According to the morphology-based phylogenetic hypothesis of Bertani (2001), Galleti-Lima & Guadanucci (2018) and Perafán & Valencia-Cuellar (2018), these two species are sister-grouped and are constituted by morphologically identical females. The only difference between these female individuals is their geographical distribution, since *V. paranaensis* occurs in the state of Paraná and Misiones and *V. vellutinus* occurs in the west of the state of São Paulo (Fig. 2). Recent methodologies, in turn, have shown to be effective in the application in spider taxonomy, such as morphometrics (Lapinski et al., 2015; Spasojevic et al., 2016; Fernández-Montraveta & Marugan-Lobon, 2017; Wilson et al., 2021).

Morphometrics can be classified as classical or geometric, and both techniques can be expressed by several statistical multivariate analyses (Rohlf & Marcus, 1993; Marcus, 1990). While the classical morphometry consists in the capture of measurements such as lengths, widths, angles and ratios (Rohlf & Marcus, 1993; Mutanen & Pretorius, 2007; Schwarzfeld & Sperling, 2014), the geometric morphometry seeks to recover the dimensional shape (2D or 3D) of a taxonomic structure (Rohlf & Marcus, 1993) and can be performed by the insertion of homologous landmarks (Rohlf & Marcus, 1993). However, the contours of the structures can be used when it is not possible to recover these homologous landmarks (Rohlf, 1990). Among methodologies that use closed contours, Elliptical Fourier Analysis (EFA) has been constantly addressed in complex structures, such as crustaceans and insects (Kuhl & Giardina, 1982; Rohlf & Archie, 1984; Ferson et al. 1985; Tort, 2003; Zahn & Wang, 2011; Wen et al. 2015; Cruz et al. 2020). The EFA seeks to maintain information on the shape of the structure, regardless of the

size, position and rotation of the contour, using the so-called coefficients of the first harmonic (Crampton, 1995).

The lack of morphological characters to distinguish females motivated the development of this study, with the main objective is to delimitate females of *V. paranaensis* and *V. vellutinus* using both morphometrics and EFA. We also provide a distinction of shape between males palpal bulbs of these species. In addition, we seek to infer whether *V. vellutinus* and *V. paranaensis* have a suitability of occurrence in the states of Paraná and São Paulo, respectively, and reconstruct in detail their distribution areas, to verify if there is any geographic barrier that is limiting the current distribution of these species.

## **MATERIAL AND METHODS**

Specimens are deposited at the arachnological collections of the following institutions and curators: **CAD**, Coleção Aracnológica de Diamantina, UNESP Rio Claro, São Paulo, Brazil – J.P.L. Guadanucci; **IBSP**, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil – A.D. Brescovit; **MZSP**, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil – R. Pinto da Rocha. The voucher list is assembled in File S1.

The images were obtained with a Leica MC 170HD digital camera mounted on a Leica M205C stereomicroscope, and edited with Leica Application Suite LAS V4.12 software. All specimens were examined at the same position and photographed with the same objective and magnification.

*Leg morphometric analysis* - Length and width of leg articles (femur, patella, tibiae, metatarsus and tarsus) were measured in dorsal view with calipers and are expressed in millimeters. Length/width ratios (L/W) were calculated to express thickness of leg articles. The sum of these articles (femur + patella + tibiae + metatarsus + tarsus) were divided by the total length of the carapace, to express to proportional length of legs (L/C).

The analysis of the linear data was based on the methodology proposed by Lapinski et al (2015). Ratios had applied normality tests and subsequently applied to a Principal Component Analysis (PCA), where were extracted the ratios that most contributed to variability between

species on each PC. Boxplots were extracted from the ratios that most contributed in the PCA and significant differences between medians ( $p < 0.05$ ) was tested with Mann-Whitney test (non-parametric data). All of these tests were performed with the software PAST (Hammer et al. 2001).

*Shape analyses of spermathecae and palpal bulb* - The female genitalia (spermathecae) were dissected, cleaned with Ultrazime and photographed in dorsal view. The male palpal bulbs were dissected from the cymbium and photographed in prolateral view. The software Adobe Photoshop CS6 was used to draw the outlines of spermathecae and palpal bulbs (magnetic lasso tool), to extract the black silhouettes from the gray-scale edited photographs, and to fill a contrasting white background (Fig. 3). The edited images were saved as jpeg format and assembled in a single folder. EFA was performed using the software R environment (R Core Team, 2016), and the 'Momocs' package was applied (BONHOMME et al., 2014). We used a function from the 'Momocs' package that calculates the number of harmonics to cover the total proportion of the analyzed structure. Six harmonics were used for spermathecae analysis, while five were used for palpal bulbs.

After the calculation of elliptical Fourier descriptors, PCAs were performed to explore the total variations of shape configurations. Discriminant analysis (DA) was performed to classify the species. Both PCA and DA were performed by the software R environment (R Core Team, 2016).

*Biogeographic analysis* - The geographical distribution of both species corresponds to the analyzed specimens (File S1) and records from Bertani (2001). The area used in the biogeographic study corresponds to the occurrence area of these two species. In this area, a buffer of 100 kilometers was created. All the nineteen environmental data were obtained in WorldClim (Global Climate Data, <http://www.worldclim.org/>), using a resolution of 2.5 arc/minutes and edited according to the study area. Then, the data underwent a correlation test and the non-correlated variables were selected (Pearson's correlation, with maximum correlation allowed of 0.7): mean diurnal range (Mean of monthly (max temp - min temp)) (Bio2); temperature seasonality (standard deviation  $\times 100$ ) (Bio4); max temperature of warmest month (Bio5); annual

precipitation (Bio12); and precipitation of wettest month (Bio13). All these analyses were performed with the software ArcMap 10.8 (ESRI). In the Species Distribution Modelling (SDM), the MAXENT algorithm (software Maxent 3.3.3 k) was used, which, according to Phillips et al. (2006), estimates the probability of occurrence using the maximum entropy of the species. The bootstrapping method was performed with ten random partitions using 70% of the data for training models and 30% for test models. The SDM generated for these two species were evaluated by the values of Area Under the Curve (AUC). A minimum training presence threshold was chosen for both species SDM. The detailed maps used to find possible geographic barriers were created by the software ArcMap 10.8 (ESRI) using shapefiles referring to the phytophysionomy, geomorphology and hydrography of the states of São Paulo and Paraná. These shapefiles were obtained from the website of the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (<https://bdiaweb.ibge.gov.br/#/home>).

## RESULTS

*Leg morphometric ratios* - All measurement values and the calculated ratios for each specimen are listed in File S2. The PCA of ratios and the graphic with the variables that most contributed are expressed in Figure 4. The PCA values and the contribution of each ratio for PCs 1 and 2 are expressed in File S3. The sum of the first two PCs contributed in 50.3% of total of variance and the two species are apart from each other (Fig. 4A). All statistical results are expressed in File S3. All L/C ratios, metatarsi and tarsi L/W ratios of all legs were the ones that most contributed to the distribution of samples in PC 1, while L/W ratios of femur IV and tibia IV were the ones that most contributed to the distribution of samples in PC 2 (Fig. 4B). All L/C ratios showed significant differences between medians ( $p < 0.001$ ), *V. paranaensis* with higher values than *V. vellutinus* (Fig. 5). All metatarsi L/W ratios showed significant differences between medians ( $p < 0.01$ ), except for metatarsus IV ( $p = 0.7$ ). In this case, *V. vellutinus* showed higher values than *V. paranaensis* (Fig. 6). All tarsi L/W ratios showed significant differences ( $p < 0.001$ ), with *V. vellutinus* showing higher values than *V. paranaensis* again (Fig. 7). Femur IV

L/W ratios of showed significant differences between medians ( $p = 0.03$ ), while tibia IV did not ( $p = 0.06$ ) (Fig. 8).

*Shape analyses of spermathecae and palpal bulb* - All PCs contributions from EFA can be seen in File S3. The first two principal components contributed in 72.5% of total variance in the PCA of spermatheca (Fig. 9), while the first two PC's summed 74.1% of the total variance in the PCA of palpal bulb (Fig. 10). The correct classification values for each species resulting from the AD for spermatheca and palpal bulbs were 100%. The *a priori* probabilities that each specimen has belonging to each species can be seen in File S3.

*Biogeographical data* - The models for *V. paranaensis* and *V. vellutinus* can be seem in Figure 14. In *V. paranaensis* model (AUC = 0.88), the variable that most contributed was the temperature seasonality (58.1%), followed by max temperature of warmest month (15.3%), mean diurnal range (13.2%), precipitation of wettest month (12%) and annual precipitation (1.4%), while in the *V. vellutinus* model (AUC = 0.91) the annual precipitation was the variable that most contributed (34.1%), followed by max temperature of warmest month (33.4%), temperature seasonality (26.6%), precipitation of wettest month (5.2%) and mean diurnal range (0.7%). According to the maps, *V. vellutinus* has occurrence suitability in state of Paraná and *V. paranaensis* has occurrence suitability in state of São Paulo. In the geomorphology map (Fig. 12A), both species occur basically on Paraná river plateau and eastern plateau of Paraná basin (only *V. paranaensis*), being limited by the Paranapanema river and this plateau. In phytophysionomies map (Fig. 12B), most points of *V. vellutinus* occur on the Atlantic Forest biome (semideciduous seasonal forest); however, it is abruptly interrupted with the appearance of a small portion of Araucaria Forest in the south of São Paulo. It is evident that there is no record of *V. paranaensis* in Araucaria Forest in São Paulo, different from that in Paraná, where most of the records are.

## DISCUSSION

According to morphological cladistic hypothesis proposed by Bertani (2001), Galletti-

Lima & Guadanucci (2018) and Perafán & Valencia-Cuellar (2018), *V. paranaensis*, *V. vellutinus* and *Vitalius roseus* (Mello-Leitão, 1923) constitute a clade supported by the color pattern, being differentiated by both the geographical distribution and the morphological differences of the genitalia, except for the females of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*, which differ only by their area of occurrence. The use of geographical distribution as a species delimiter should not be considered as a taxonomic character, since a hypothetical new record in an area different from the pre-established in the species diagnosis invalidates this differentiation. Besides, the high similarity of spermathecae and the low presence of female sexual characters are common problems in the taxonomy of *Vitalius* as well as in eventual cryptic species from other genera of Theraphosinae (e.g. *Eupalaestrus* Pocock, 1901, *Lasiadora* C. L. Koch, 1850, *Nhandu* Lucas, 1983, *Proshapalopus* Mello-Leitão, 1923, *Pterinopelma* Pocock, 1901). This study indicates that structures like spermatheca (and also palpal bulbs) should be treated morphometrically, as a continuous and not as a discrete character. However, we emphasize the importance of the qualitative sexual characters proposed by Bertani (2001), such as the tibial apophyses and bulb keels. Finally, this study also points that morphometrics could be used as a methodology to find characters that were not previously presented as delimiters between *V. paranaensis* and *V. vellutinus*, as proportions of the legs in relation to the cephalothorax of these species, becoming an alternative to be applied in other groups of Theraphosidae.

Currently, the lack of records of *V. vellutinus* in state of Paraná and *V. paranaensis* in state of São Paulo, added to the areas of suitability of occurrence generated in the models, raise questions that the geomorphology and emergence of forests and rivers have acted by limiting the distribution of these two species. Based on the maps in Figure 12, we question whether the coastal mountains, the eastern plateau of the Paraná basin, the araucaria forest and the Paranapanema river have been acting in the distribution of *V. vellutinus* in the west of the state of São Paulo, while the coastal mountains and the Paranapanema River maintains *V. paranaensis* distributed along the Araucaria Forest and the Paraná semideciduous seasonal forest.

This study presents the use of alternative methodologies to help in problems of

Theraphosidae taxonomy, besides highlighting the importance of classical taxonomy, and also generates biogeographic hypotheses to be tested in future studies about speciation of these taxa.

## Figures



Figure 1. *V. paranaensis* and *V. vellutinus* in life. A. female of *V. paranaensis* (brown variation) B. Male of *V. paranaensis* (brown variation). C. Juvenile of *V. paranaensis* (brown variation). D. female of *V. paranaensis* (black variation). E. Male of *V. paranaensis* (black variation). F. Juvenile of *V. paranaensis* (black variation). G. Female of *V. vellutinus*. H. Male of *V. vellutinus*. I. Juvenile of *V. vellutinus*. Photos: R.P. Indicatti (A, C, D, E, G, H and I); A. Galleti-Lima (B and F)

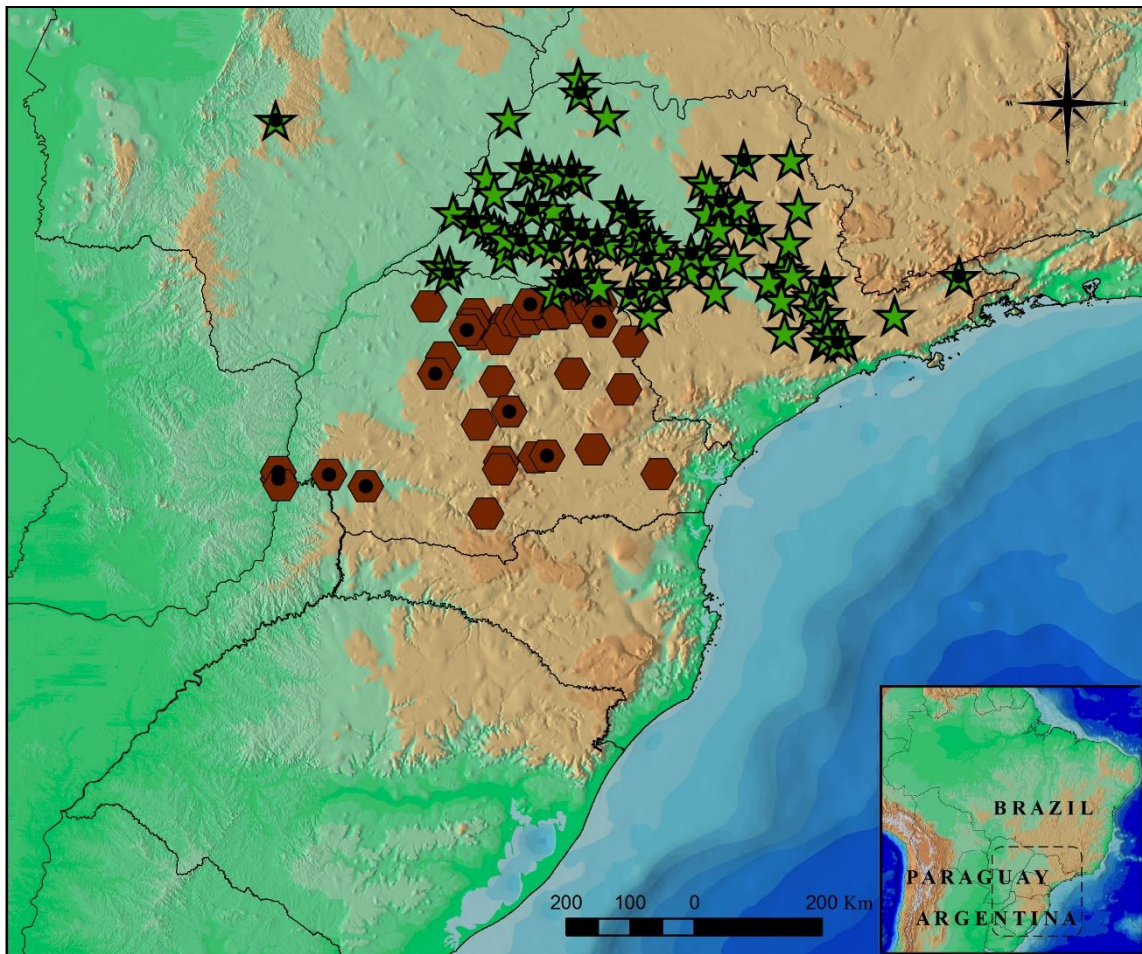


Figure 2. Geographical distribution of *V. paranaensis* and *V. vellutinus* from Bertani (2001) and new records. Brown hexagons corresponds to *V. paranaensis* and green stars corresponds to *V. vellutinus*. The black spots indicate the specimens analyzed in this study.

**A**



**B**

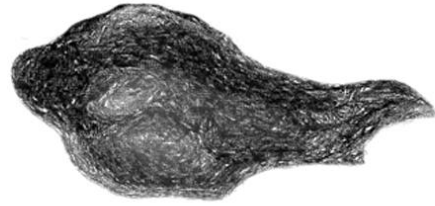


Figure 3. Outlines of the genitalia used in the Elliptic Fourier Analysis. A. Outline of spermathecae. B. Outline of palpal bulb.

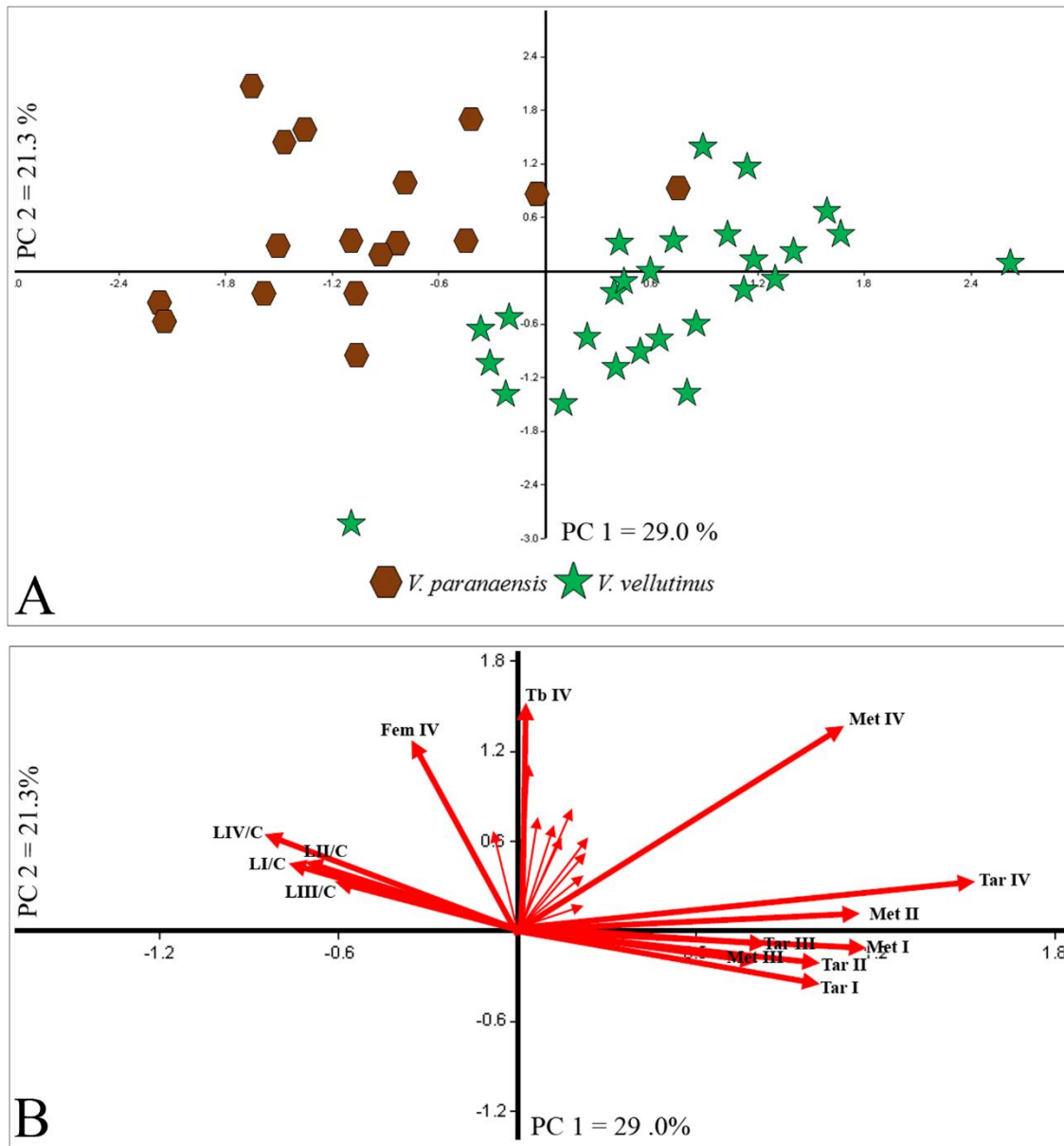


Figure 4. PCA of ratios of linear measures of females of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. A. PCA indicating the separation between species. B. Relationship between variables and PCs.

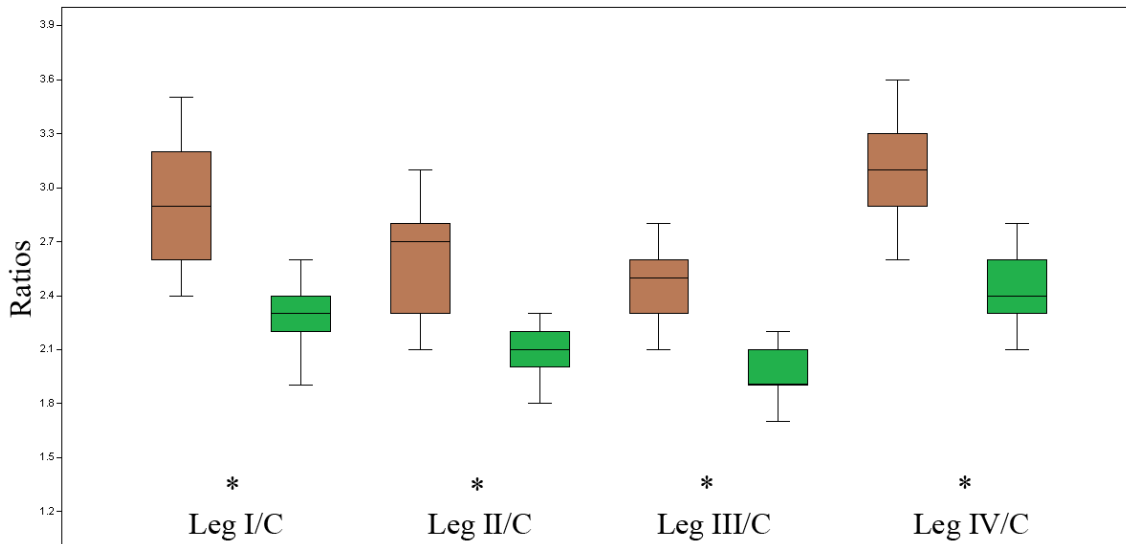


Figure. 5. Boxplot of ratio of length of legs/ length of carapace of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. (\*) corresponds to significant differences between medians, brown boxplots (left) refer to *V. paranaensis* and green boxplots (right) refer to *V. vellutinus*.

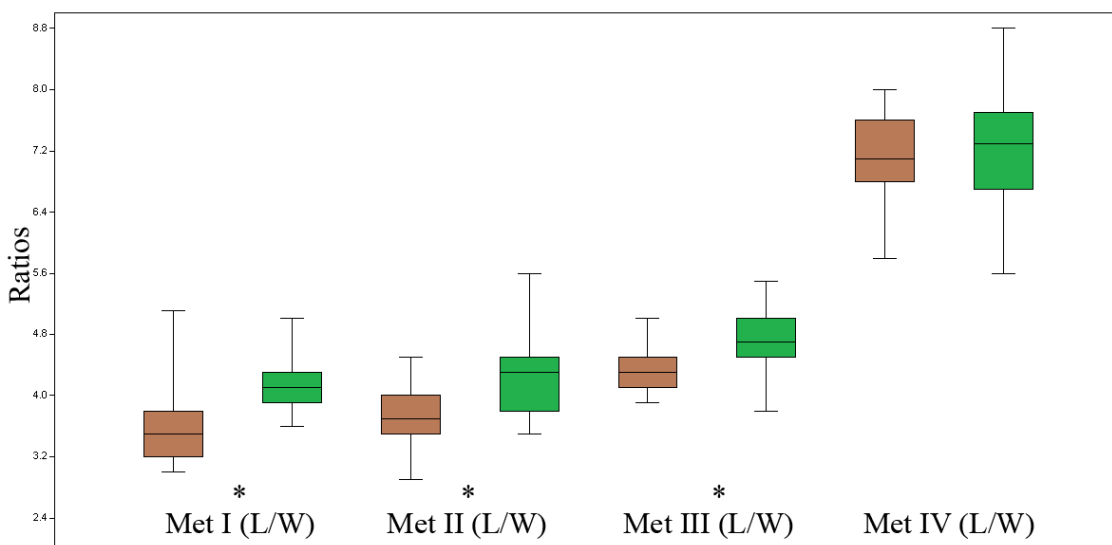


Figure. 6. Boxplot of ratio of length/ width of metatarsi of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. (\*) corresponds to significant differences between medians, brown boxplots (left) refer to *V. paranaensis* and green boxplots (right) refer to *V. vellutinus*.

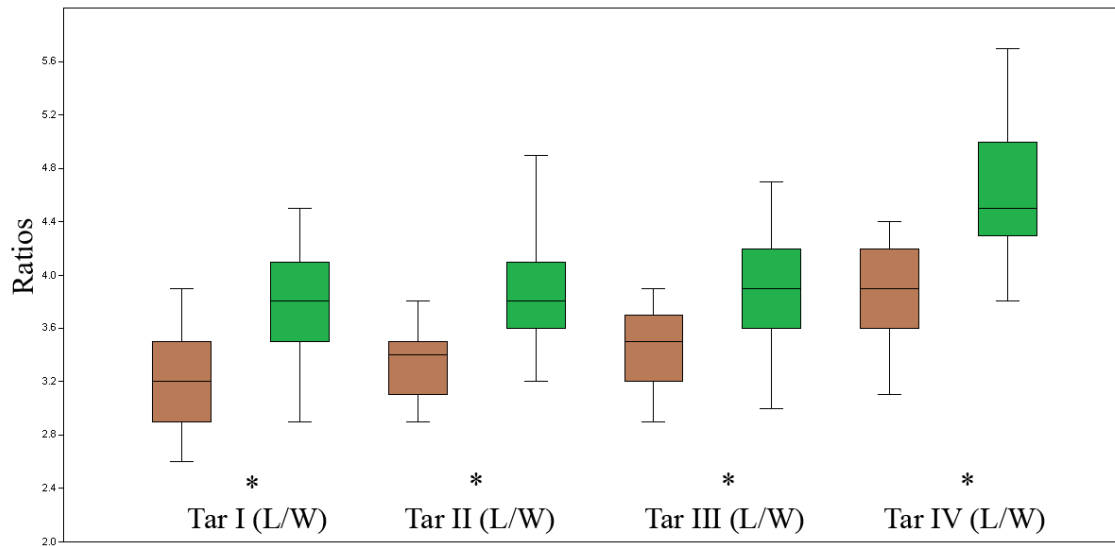


Figure. 7. Boxplot of ratio of length/ width of tarsi of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. (\*) corresponds to significant differences between medians, brown boxplots (left) refer to *V. paranaensis* and green boxplots (right) refer to *V. vellutinus*.

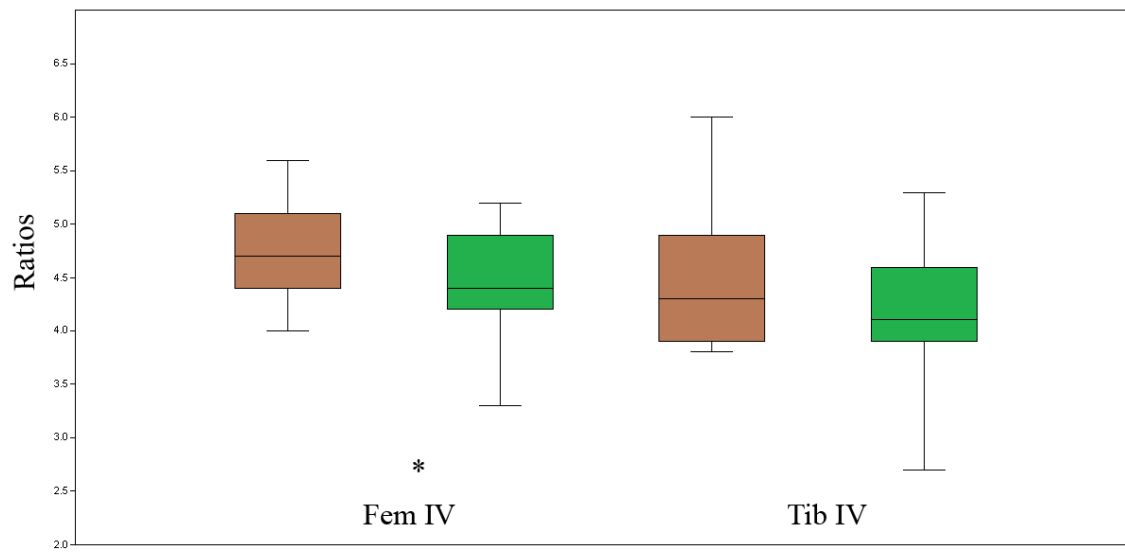


Figure. 8. Boxplot of ratio of length/ width of femur IV and tibia IV of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. (\*) corresponds to significant differences between medians, brown boxplots (left) refer to *V. paranaensis* and green boxplots (right) refer to *V. vellutinus*.

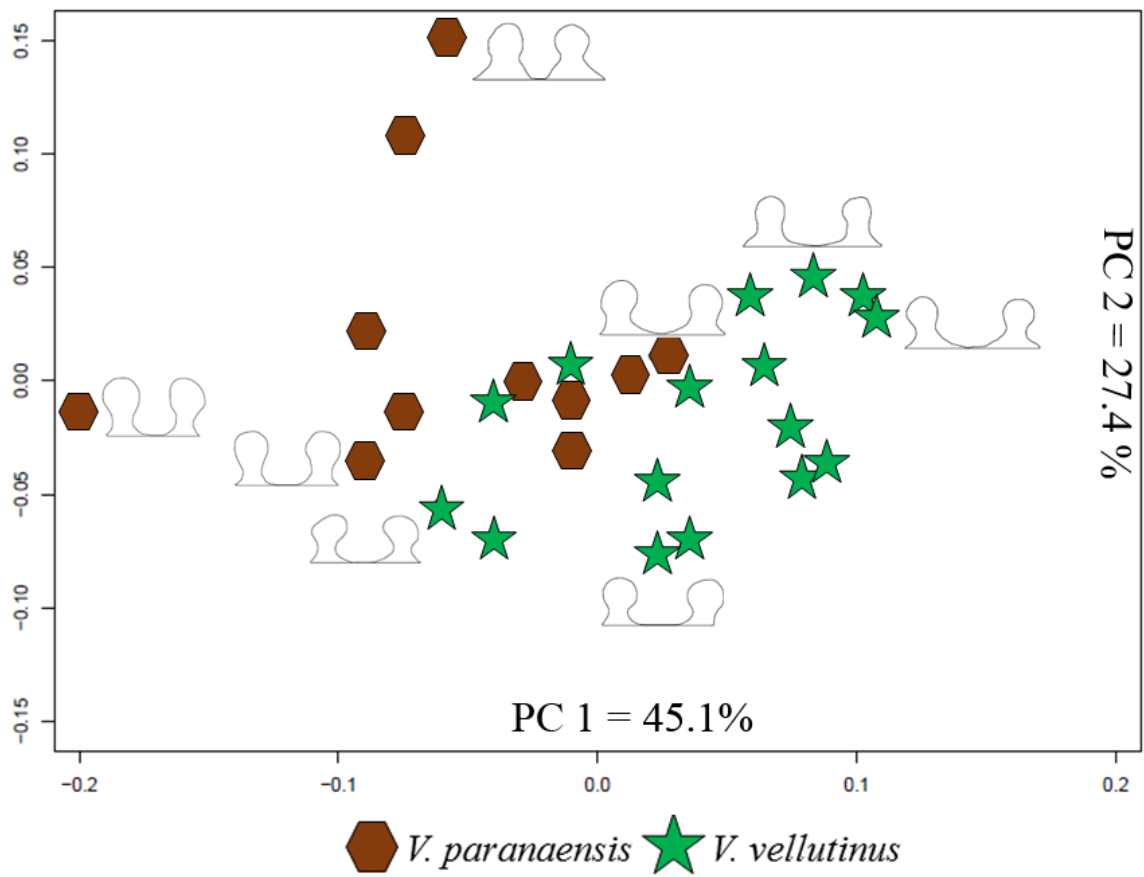


Figure 9. PCA of outlines of spermathecae of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*, resulting from Elliptic Fourier Analysis. Outlines corresponds to extreme specimens of PC 1 and PC 2 for each species.

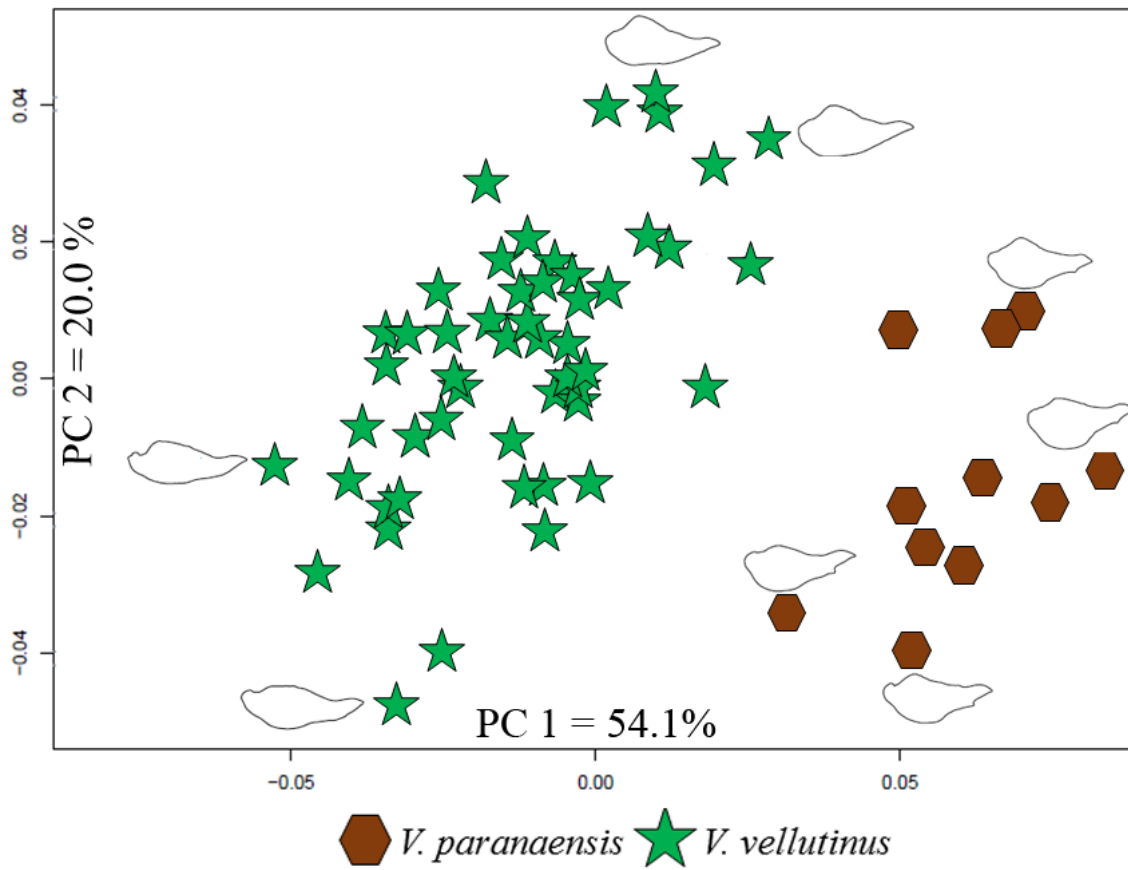


Figure 10. PCA of outlines of palpal bulbs of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*, resulting from Elliptic Fourier Analysis. Outlines corresponds to extreme specimens of PC 1 and PC 2 for each species.

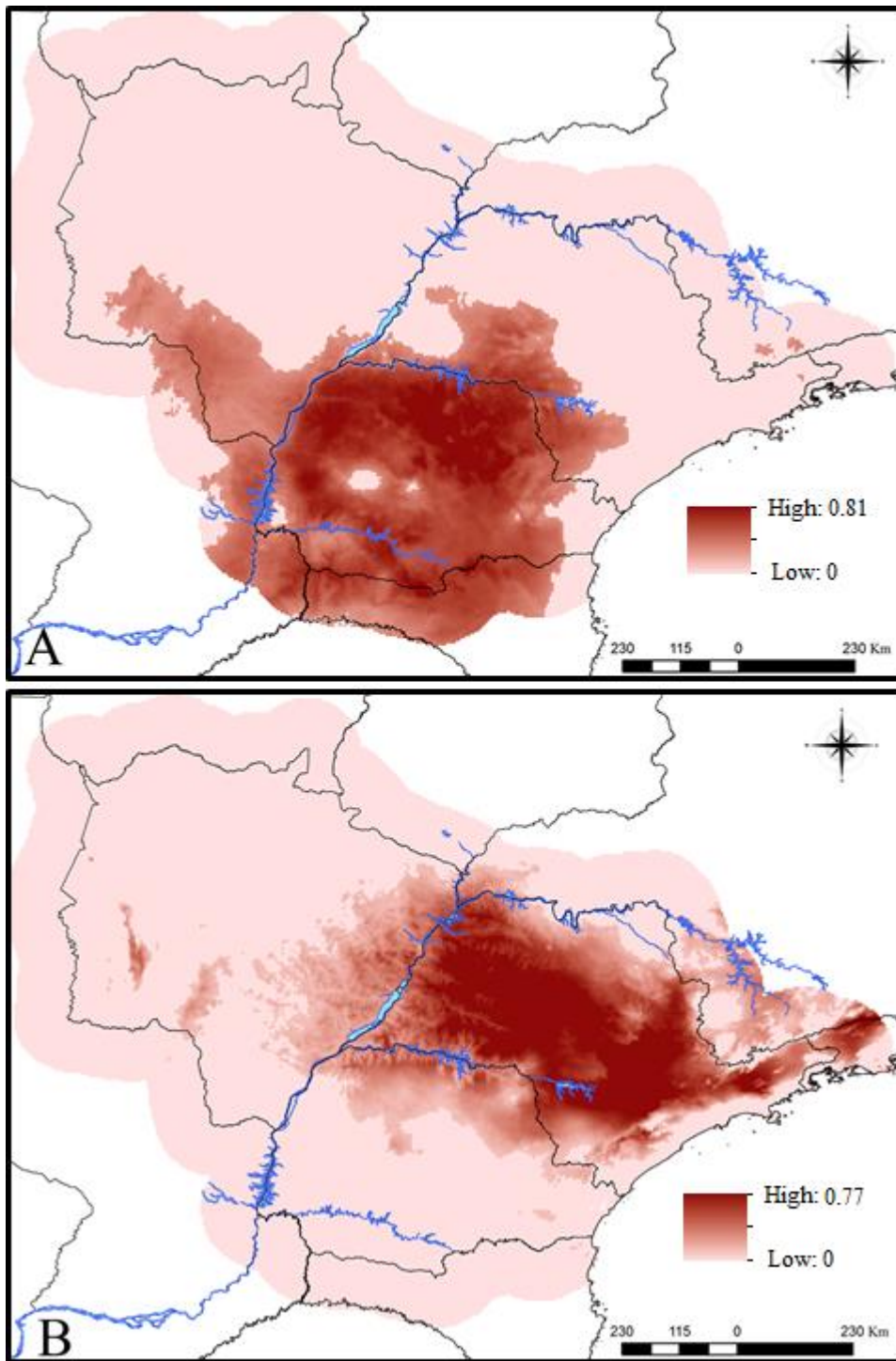


Figure. 11. Species Distribution Modelling (SDM). A. Occurrence suitability area of *V. paranaensis*. B. Occurrence suitability area of *V. vellutinus*.

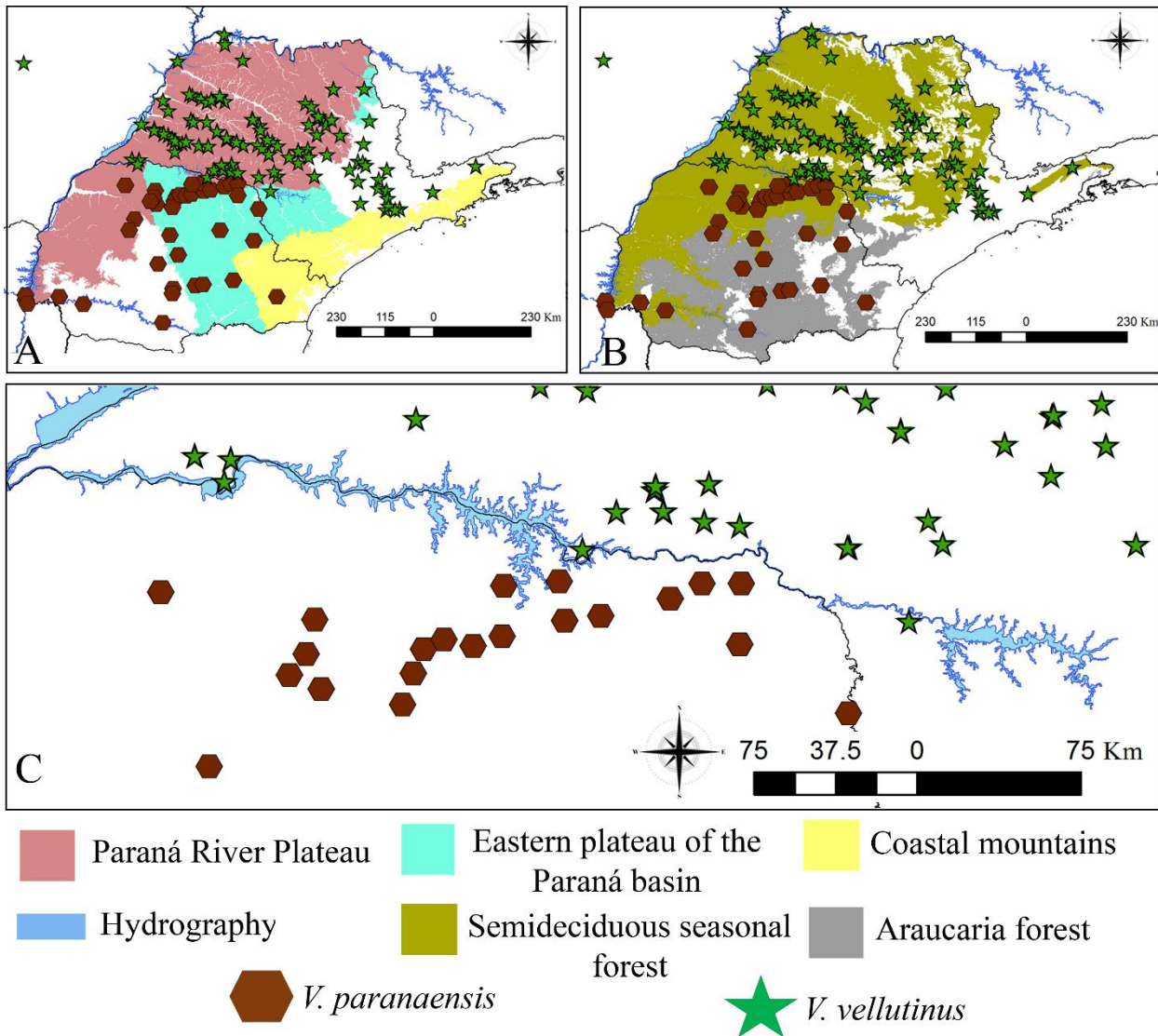


Figure. 12. Geomorphology, phytophysiology and hydrography of São Paulo and Paraná states, with geographical distribution of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*. A. Geomorphology. B. Phytophysiology. C. Paranapanema river.

## References

- Bertani, R. Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). *Arquivos de Zoologia* 36: 265-356. 2001.
- Bonhomme, V., Picq, S., Claude, J., & Gaucherel, C. 2014. Momocs: outline analysis using R. *Journal of Statistical Software*, v. 56, n. 13, p. 24 p.
- Crampton, J. S. 1995. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia*, v. 28, n. 2, p. 179-186.
- Cruz, D. D., Arellano, E., Ávila, D. D., & Ibarra-Cerdeña, C. N. 2020. Identifying Chagas disease vectors using elliptic Fourier descriptors of body contour: a case for the cryptic dimidiata

complex. *Parasites & vectors*, 13(1), 1-12.

Fernández-Montraveta, C., & Marugan-Lobon, J. (2017). Geometric morphometrics reveals sex-differential shape allometry in a spider. *PeerJ*, 5, e3617.

Ferretti, N., Copperi, S., Schwerdt, L., & Pompozzi, G. First record of *Vitalius roseus* (Mello-Leitão, 1923) (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae) in Argentina: distribution map, natural history, and sexual behaviour. *Arachnology*, 16(7), 241-243. 2014.

Ferretti, N. E., Copperi, M. S., Schwerdt, L. V., & Pompozzi, G. A. First record of *Vitalius longisternalis* Bertani, 2001 (Araneae, Theraphosidae) in Argentina and notes on its natural history in Misiones province. 2015.

Ferson, S.; Rohlf, F. J.; Koehn, R. K. 1985. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic Biology*, v. 34, n. 1, p. 59-68.

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.

Hammer, Ø.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

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

Lapinski, W., Walther, P., & Tschapka, M. (2015). Morphology reflects microhabitat preferences in an assemblage of neotropical wandering spiders. *Zoomorphology*, 134(2), 219-236.

Marcus, L.F. Traditional morphometrics. In: Rohlf FJ, Bookstein FL (Eds) Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. Special Publication Number 2, University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, 77–122. 1990.

Mutanen, M., Pretorius, E. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology* 32: 371–386. 2007.

Perafán, C. & Valencia-Cuéllar, D. *Proshapalopus marimbai*, a new tarantula species (Mygalomorphae, Theraphosidae) and first genus record from Colombia. *Tropical*

Zoology 31(4): 200-213. 2018.

Rohlf, F. J. 1990. Fitting curves to outlines. In: Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Ann Arbor e Michigan Michigan: The University of Michigan Museum of Zoology, p. 167-177.

Rohlf, F. J.; Archie, J. W. 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology*, v. 33, n. 3, p. 302-317.

Rohlf, F. J.; Marcus, L. F. A revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

Rohlf, F.J. 'tpsDig.'. Available online at: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. 2001.

Schwarzfeld, M.D.; Sperling, F.A.H. Species delimitation using morphology, morphometrics, and molecules: definition of the *Ophion scutellaris* Thomson species group, with descriptions of six new species (Hymenoptera, Ichneumonidae). *ZooKeys*, n. 462, p. 59, 2014.

Spasojevic, T., Kropf, C., Nentwig, W., & Lasut, L. (2016). Combining morphology, DNA sequences, and morphometrics: revising closely related species in the orb-weaving spider genus *Araniella* (Araneae, Araneidae). *Zootaxa*, 4111(4), 448-470.

Team, R. Core. 2016. R: A language and environment for statistical computing [Computer software manual]. Vienna, Austria.

Tort, A. 2003. Morphological plasticity of the outline and the internal structures of the shell of the recent *Terebratella tenuis* sp. nov. (Brachiopoda, Terebratulida). *Zoomorphology*, v. 122, n. 1, p. 47-54.

Wen, H.; Yang, H.; Wang, X. 2015. A quantitative analysis of the wing outlines of owlflies (Insecta: Neuroptera: Ascalaphidae). *Animal Cells and Systems*, v. 19, n. 2, p. 149-155.

Wilson, J. D., Zapata, L. V., Barone, M. L., Cotoras, D. D., Poy, D., & Ramírez, M. J. 2021. Geometric morphometrics reveal sister species in sympatry and a cline in genital morphology in a ghost spider genus. *Zoologica Scripta*.

Zhan, Q., Wang, X. 2012. Elliptic Fourier analysis of the wing outline shape of five species of antlion (Neuroptera: Myrmeleontidae: Myrmeleontini). *Zoological Studies*, v. 51, n. 3, p. 399-405.

File S1. List of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus* analyzed.

Species	Sex	Collection	Number	Municipality	State	Country	Locality	Latitude	Longitude	Date	Collector
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74057	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	IX/1998	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	32336	Foz do Areia	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	06/III/1985	F. Cominese
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74067	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	23/VIII/1988	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74062	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	16/III/1989	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74066	Santo Antônio da Platina	PR	Brazil		-23.297958	-50.073057	14/XII/1988	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74070	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	21/IV/1989	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74076	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	21/IV/1989	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74070-2	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	21/IV/1989	
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74054	Santo Antônio da Platina	PR	Brazil		-23.297958	-50.073057	14/XII/1988	J. Shwizer
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	74069								
<i>V. paranaensis</i>	♀	MZUSP	32318								
<i>V. paranaensis</i>	♀	IBSP	106677		PR	Brazil					
<i>V. paranaensis</i>	♀	IBSP	106689	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Usina Hidrelétrica de Itaipú	-25.516643	-54.586105	11/VII/1986	
<i>V. paranaensis</i>	♀	IBSP	6663	Rodolândia	PR	Brazil				IV/1995	P.M.R.
<i>V. paranaensis</i>	♀	PNI_2018_The	6	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII/2018	J.P.L.Guadanucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♀	PNI_2018_The	8	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII/2018	J.P.L.Guadanucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♀	PNI_2018_The	4	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII/2018	J.P.L.Guadanucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♀	PNI_2018_The	2	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII/2018	J.P.L.Guadanucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♀	PNI_2018_The	7	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII/2018	J.P.L.Guadanucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♂	IBSP	8521	Sertanópolis	PR	Brazil		-23.055343	-51.045902	06/III/98	S.E.S Rosa
<i>V. paranaensis</i>	♂	IBSP	8729	Campo Mourão	PR	Brazil		-24.034315	-52.378819	02.III.01	J.C.L. Fomento Mercantil LTDA
<i>V. paranaensis</i>	♂	IBSP	106689	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Usina Hidrelétrica de Itaipú	-25.421052	-54.588168		
<i>V. paranaensis</i>	♂	IBSP	6908	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Usina Hidrelétrica de Itaipú	-25.421052	-54.588168		
<i>V. paranaensis</i>	♂	LAB	36	Guamiranga	PR	Brazil		-25.192750	-50.809320		W. Moeller

<i>V. paranaensis</i>	♂	LAB	37	Cândido Abreu	PR	Brazil		-24.565063	-51.337922		W. Moeller
<i>V. paranaensis</i>	♂	LAB	40	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	2019	W. Moeller
<i>V. paranaensis</i>	♂	PNI_2018_The	15	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII.2018	J.P.L.Guadalucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♂	PNI_2018_The	1	Foz do Iguaçu	PR	Brazil	Parque Nacional do Iguaçu	-25.455185	-53.872651	XII.2018	J.P.L.Guadalucci & R.P.Indicatti
<i>V. paranaensis</i>	♂	MZUSP	74063	Nova Prata do Iguaçu	PR	Brazil		-25.616807	-53.358585	06/V/1989	
<i>V. paranaensis</i>	♂	MZUSP	74066	Santo Antônio da Platina	PR	Brazil		-23.297958	-50.073057	14/XII/1988	
<i>V. paranaensis</i>	♂	MZUSP	74073	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	12/III/1990	
<i>V. paranaensis</i>	♂	MZUSP	74073-B	Maringá	PR	Brazil		-23.423419	-51.932298	12/III/1990	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104132-A	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	25/VII/1969	J.G. Bongiovani
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104132-B	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	25/VII/1969	J.G. Bongiovani
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101255	Pontal	SP	Brazil		-21.026874	-48.0354304		
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100843	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	1945	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	106984	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104456-B	Águas de Santa Bárbara	SP	Brazil		-22.782901	-49.29571162		
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101049	Presidente Alves	SP	Brazil		-22.100335	-49.43870017	22/XI/1947	J.C.Coimbra
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	106973	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100281	Lins	SP	Brazil		-21.6721	-49.74764736	22/IV/1947	Agente da Estação
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101475	Tupã	SP	Brazil		-21.927063	-50.51619041	1/VII/1947	C.E.Talma
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	106947	Guarani d'oeste	SP	Brazil	Usina Hidrelétrica de Água Vermelha	-20.076019	-50.34117585		G.Puerto
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101204	Araçatuba	SP	Brazil		-21.179549	-50.45570784	2/II/1948	Farmácia Lauzada
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	103993	Lucélia	SP	Brazil		-21.725645	-51.01601042	16/X/1969	H. Stefano
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100419	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	3/VII/1947	E. Stokler
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	105687	Cândido Mota	SP	Brazil		-22.745853	-50.3880262		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100279	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	22/IV/1947	E. Stokler
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101317		SP	Brazil	Highway Fernão Dias			6/III/1948	J.M. Souza
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	9871		SP	Brazil	Highway Fernão Dias			05/III/2002	G. Brisolla
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101001	Marília	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	20/X/1947	H. Takahashi
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	102195		SP	Brazil				18.II.1950	

<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104662	São Paulo	SP	Brazil	Morumbi	-23.597758	-46.71919491	V/1981	C.F. Pelucio
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101397	Presidente Venceslau	SP	Brazil		-21.903985	-51.84637036	2/IV/1948	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	105678	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101424	Presidente Venceslau	SP	Brazil		-21.903985	-51.84637036	12/IV/1948	Sociedade Aimoré Ltda
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101402	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	5/IV/1948	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101362		SP	Brazil				23/III/1948	J. Martins
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104053	Lucélia	SP	Brazil		-21.725645	-51.01601042	25/III/1970	H. Stefano
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100064	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	21/IX/1964	G. Brisolla
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100445		SP	Brazil				1946	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	11643	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	04.V.2001	M. M. Bastos
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104119	Cafelândia	SP	Brazil		-21.802721	-49.61021	5/V/1975	A. F. Marques
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	212965	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	102458	Duartina	SP	Brazil		-22.414517	-49.40920715	1/II/1951	T.R. Souza
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104656	Araçatuba	SP	Brazil		-21.179549	-50.45570784	V/1981	M.J. Brigatte
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	102416	Guaratã	SP	Brazil		-21.894351	-49.5919202	15/I/1951	J.B. Silva
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	102458	Duartina	SP	Brazil		-22.414517	-49.40920715	1/II/1951	T.R. Souza
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	100947	Cândido Mota	SP	Brazil		-22.745853	-50.3880262	23/IX/1947	A. Boehme
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101275	Quintana	SP	Brazil		-22.06376	-50.30580389	12/IX/1947	R. Padua
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	102456	Duartina	SP	Brazil		-22.414517	-49.40920715	1/II/1951	T.R. Souza
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101452	Cachoeira Paulista	SP	Brazil		-22.66459	-45.01224833	23/IV/1948	S. Soltys
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101274	Quintana	SP	Brazil		-22.06376	-50.30580389	23/XI/1948	R. Padua
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101463	São José dos Campos	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	5/V/1948	Fábrica Louças Santo Eugênio
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	106977	Oriente	SP	Brazil		-22.155284	-50.09781454		Usina Açucareira Paredão S/A
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104141-A	Duartina	SP	Brazil		-22.414517	-49.40920715	18/VI/1975	B. Franco
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101074	Lins	SP	Brazil		-21.6721	-49.74764736	11/XI/1947	A.L. Carvalho
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101080	Quatá	SP	Brazil	Campinho	-22.245575	-50.70303696	12/XII/1947	J. Agigant
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104141-B	Duartina	SP	Brazil		-22.414517	-49.40920715	18/VI/1975	B. Franco
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	104504								

<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101155	Cândido Mota	SP	Brazil		-22.745853	-50.3880262	5/I/1948	A. Focerra
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101218	Quintana	SP	Brazil		-22.06376	-50.30580389	23/XI/1948	R. Padua
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101243	Presidente Venceslau	SP	Brazil		-21.903985	-51.84637036	18/XI/1948	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101321	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	8/III/1948	V. Audes
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	106988	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♀	MZUSP	74069	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	21/IV/1989	
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	101081	Marília	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	20/X/1947	H. Takahashi
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	102408	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	12/I/1951	F. Mayor
<i>V. vellutinus</i>	♀	IBSP	5656	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		H.A.R. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106324	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101329	Monlevade	SP	Brazil				10/03/1948	Cia C. Almeida
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101277		SP	Brazil	Highway Fernão Dias			27/XI/1948	J.M. Souza
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101519	Presidente Venceslau	SP	Brazil	Highway Fernão Dias	-21.903985	-51.84637036	15/VI/1948	Aimoré Serraria
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	102553	Pederneiras	SP	Brazil		-22.348897	-48.77852007	6/IV/1951	A. Zelini
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	103223	São Carlos	SP	Brazil		-22.006414	-47.89331651	17/III/1954	5 divisão
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106338	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	104638	Santa Cruz do Rio Pardo	SP	Brazil		-22.894751	-49.62807077	IV/1981	I.K.F. Barbosa
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106307	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		A.G. Turman
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106325	Teodoro Sampaio	SP	Brazil		-22.624043	-52.20104729		C.R. Motta
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	6349	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		J.A. Carvalho
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106367		SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	100196	Bueno de Andrada	SP	Brazil	Estação Ferroviária Sorocabana	-22.640736	-50.42102654	12/XI/1952	
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	100571	São José dos Campos	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	1946	
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101173		SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101314	Toriba	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	6/III/1948	Companhia Agrícola Fazenda Paulista
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101326	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	8/III/1948	V. Audes
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101360	Martinópolis	SP	Brazil		-22.150662	-51.17298803	23/III/1948	Figueira
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101350	Cardoso de Almeida	SP	Brazil				19/III/1948	Mendonça
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101372	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	23/III/1948	E. Stokler

<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	102457	Duartina	SP	Brazil		-22.414517	-49.40920715	1/II/1951	T.R. Souza
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	102877	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	31/III/1952	J.C. Coimbra
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	103234	Pedreira	SP	Brazil		-22.741366	-46.89602117	22/III/1954	H.H. Filho
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	104622	Campo Grande	MS	Brazil		-20.46747	-54.62524488	X/1970	
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106351	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101378	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	23/III/1948	E. Stokler
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106324_B	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	1011364		SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101374	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	23/III/1948	E. Stokler
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106336	Carapicuíba	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		A. Oliveira
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106344	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	100042	Pederneiras	SP	Brazil		-22.348897	-48.77852007	27/II/1947	N. Ferro
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101269	Matão	SP	Brazil	Estação Ferroviária Toriba	-21.601231	-48.36211606	25/XI/1948	Fazendas
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101323	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	8/III/1948	V. Audes
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101371	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	23/III/1948	E. Stokler
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101376	Santo Anastácio	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	23/III/1948	E. Stokler
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101380	Araçatuba	SP	Brazil		-21.179549	-50.45570784	29/III/1948	
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	102571	Lins	SP	Brazil		-21.6721	-49.74764736	9/IV/1951	A. Carvalho
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106309	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		O. Mõra
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106327	Mirandópolis	SP	Brazil		-21.132681	-51.10260939		Hospital das Clínicas CIA de Refinaria de Ácool Azul
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106340	Araçatuba	SP	Brazil		-21.179549	-50.45570784		
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106352	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	211707	São Paulo	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	26/III/2015	E-Business Park
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	14108	Marília	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	II.2004	Secretaria Municipal de Saúde e Higiene
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	101325	Presidente Prudente	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	8/III/1948	V. Audes
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106315	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	103216	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654	15/III/1954	V. Audes
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106333	Assis	SP	Brazil		-22.640736	-50.42102654		G. Brisola

<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106317	Assis	SP	Brazil			-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106320	Assis	SP	Brazil			-22.640736	-50.42102654		G. Brisola
<i>V. vellutinus</i>	♂	IBSP	106339	São Paulo	SP	Brazil			-22.640736	-50.42102654		Estação Ferroviária Federal
<i>V. vellutinus</i>	♂	MZUSP	74075	Tarumã	SP	Brazil			-22.748918	-50.583137	05/IX/1990	
<i>V. vellutinus</i>	♂	MZUSP	74060	Tarumã	SP	Brazil			-22.748918	-50.583137	25/VIII/1990	

File S2. Measurements.

Table 1. Length of total legs and carapace of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur I length	Patella I length	Tibiae I length	Metatarsus I length	Tarsus I length	Total leg I	Carapace length	Ratio (total/carapace length)
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	14.9	9.5	10.0	8.7	6.8	50.0	15.8	3.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	12.5	5.9	8.6	6.0	4.6	37.5	12.5	3.0
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	15.9	8.3	11.4	9.6	7.0	52.2	16.1	3.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	14.00	8.3	11.40	7.2	6.2	47.1	17.0	2.8
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	14.5	7.7	9.3	6.9	6.0	44.4	15.2	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	14.7	9.4	10.8	7.7	7.8	50.4	17.3	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	13.5	7.3	9.0	6.6	6.0	42.3	16.7	2.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	14.1	7.1	9.8	6.9	5.6	43.6	13.8	3.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	15.2	8.5	11.7	8.4	6.7	50.4	14.3	3.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74054	15.5	8.7	11.2	8.0	7.3	50.7	16.6	3.0
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	13.00	8.3	11.30	7.5	5.6	45.7	16.2	2.8
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	13.30	8.3	11.00	7.5	5.5	45.6	15.6	2.9
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	13	8	10	7.0	6.1	44.1	17.6	2.5
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	14	8.8	10.8	8.7	5.9	48.2	18.6	2.6
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	15	8.9	11.2	9.5	6.7	51.3	20.0	2.6
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	14	8	10.3	8.0	6.6	46.9	18.0	2.6
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	15.3	9.1	10.8	10.1	5.8	51.1	21.4	2.4

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	19.0	7.4	12.9	10.9	8.1	58.4	25.4	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	15.7	7.1	12.8	8.9	7.5	52.0	26.7	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	13.6	8.7	9.4	8.0	6.0	45.7	19.2	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	15.5	9.1	11.2	9.6	7.7	53.1	24.7	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	16.8	9.7	10.0	10.0	6.7	53.1	21.9	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	16.6	9.4	12.6	9.0	7.3	54.9	21.4	2.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	13.6	8.1	11.3	8.5	6.0	47.5	20.2	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	12.30	7.10	9.50	6.9	5.9	41.7	17.9	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	18.0	10.9	12.0	10.7	7.7	59.3	24.8	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	19.0	7.4	12.9	10.5	8.3	58.2	25.7	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	16.4	9.2	11.4	9.2	6.9	53.1	23.4	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	18.2	10.6	12.6	9.7	6.9	58.0	23.0	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	19.1	10.7	9.5	12.0	8.0	59.3	26.8	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	14.2	9.3	9.1	8.4	6.0	47.0	19.0	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	14.5	10.3	12.60	8.8	6.5	52.7	24.1	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	16.9	9.9	10.4	9.5	7.4	54.1	24.2	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	17.1	9.5	11.9	10.4	7.6	56.4	27.8	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	13.2	7.9	9.8	7.3	6.8	45.0	20.0	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	15.7	8.4	12.6	9.2	6.8	52.8	23.0	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	13.8	6.6	8.2	9.5	6.9	44.9	19.3	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	17.8	9.3	12.5	9.5	7.2	56.3	24.2	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	16.9	9.4	12.2	9.0	7.9	55.4	22.9	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	16.9	9.7	9.6	10.5	7.0	53.6	21.1	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	12.5	6.0	8.7	7.4	5.0	39.6	17.5	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	16.5	9.8	10.1	8.6	6.9	51.9	23.3	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	17.1	10.0	11.1	8.9	6.8	53.8	23.4	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	16.2	9.0	9.9	8.5	6.2	49.9	20.2	2.5

Table 2. Measurements of leg II of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur II length	Patella II length	Tibiae II length	Metatarsus II length	Tarsus II length	Total leg II	Carapace length	Ratio (total/carapace length)
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	12.9	8.2	9.0	8.6	5.8	44.5	15.8	2.8
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	9.8	6.3	6.5	6.0	5.0	33.6	12.5	2.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	13.2	8.3	9.2	8.1	6.9	45.8	16.1	2.8
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	13.50	7.5	10.80	7.5	6.0	45.3	17.0	2.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	12.4	7.0	8.4	6.9	6.0	40.6	15.2	2.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	14.1	6.7	9.4	8.3	7.0	45.5	17.3	2.6
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	12.4	6.5	8.9	7.3	6.0	41.1	16.7	2.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	13.2	6.7	9.6	5.6	5.0	40.1	13.8	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	12.7	7.9	8.8	8.4	6.9	44.7	14.3	3.1
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	11.8	7.5	10.00	7.2	5.7	42.2	16.2	2.6
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	12.7	7.5	10.10	7.0	5.9	43.2	15.6	2.8
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	19.0	7	8.4	7.4	5.4	47.2	17.6	2.7
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	12.6	7.6	9.3	8.5	5.5	43.5	18.6	2.3
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	13.0	8	9	8.0	6.4	44.4	20.0	2.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	12.0	6.9	8.8	7.3	6.1	41.1	18.0	2.3
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	14.0	7.6	9.9	8.5	6.0	46.0	21.4	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	14.2	9.2	9.0	10.0	7.4	49.9	25.4	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	14.0	10.9	11.7	9.9	7.9	54.4	26.7	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	14.6	7.6	8.1	8.1	5.6	44.0	19.2	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	14.5	8.5	9.9	9.0	6.9	48.8	24.7	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	14.1	8.3	10.6	9.0	6.6	48.6	21.9	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	14.6	9.1	9.9	8.6	8.0	50.1	21.4	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	13.30	7.30	10.70	9.1	6.1	46.5	20.2	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	10.90	6.40	8.00	6.9	5.5	37.7	17.9	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	15.5	10.2	10.9	10.3	6.8	53.7	24.8	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	16.1	10.2	10.1	9.8	7.2	53.4	25.7	2.1

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	13.60	8.40	11.10	8.1	6.8	48.0	23.4	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	15.8	9.6	10.2	8.9	6.8	51.2	23.0	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	17.3	8.6	10.0	10.2	7.7	53.8	26.8	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	12.7	7.2	9.0	8.3	5.9	43.1	19.0	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	12.9	9.4	8.7	8.9	6.7	46.6	24.1	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	12.4	10.1	9.7	9.6	6.9	48.6	24.2	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	15.4	8.8	9.5	8.5	6.8	49.1	27.8	1.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	10.8	6.2	8.8	7.2	5.9	38.9	20.0	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	13.3	8.4	8.9	8.3	6.9	45.7	23.0	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	11.1	5.7	11.00	8.1	6.8	42.7	19.3	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	15.0	9.4	10.4	8.7	7.1	50.6	24.2	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	15.3	8.9	9.9	9.0	7.3	50.4	22.9	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	16.3	8.8	8.8	9.3	6.2	49.3	21.1	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	10.5	6.2	7.2	5.9	5.3	35.1	17.5	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	15.4	8.8	9.2	8.6	6.5	48.5	23.3	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	15.1	9.1	10.5	8.6	6.6	49.8	23.4	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	13.9	8.5	8.2	7.2	5.9	43.8	20.2	2.2

Table 3. Measurements of leg III of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur III length	Patella III length	Tibiae III length	Metatarsus III length	Tarsus III length	Total leg III	Carapace length	Ratio (total/carapace length)
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	11.6	7.6	7.7	8.9	6.4	42.2	15.8	2.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	8.6	5.1	7.0	6.6	5.1	32.4	12.5	2.6
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	12.8	6.5	9.0	8.4	6.6	43.3	16.1	2.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	11.80	6.6	9.70	8.3	6.0	42.4	17.0	2.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	10.2	6.4	7.3	7.6	5.1	36.5	15.2	2.4
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	11.7	7.0	7.9	8.6	6.8	42.0	17.3	2.4
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	10.9	5.8	8.3	8.4	6.5	39.9	16.7	2.4

<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	10.2	5.2	7.9	7.0	5.0	35.2	13.8	2.6
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	11.3	7.4	7.3	8.5	6.0	40.5	14.3	2.8
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	10.80	6.6	8.9	8.6	5.9	40.8	16.2	2.5
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	11.00	6.6	9.0	8.0	6.2	40.8	15.6	2.6
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	11.7	5.9	7.9	8.5	6.3	40.3	17.6	2.3
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	11.9	6.5	8.9	8.4	6.0	41.7	18.6	2.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	12	6.8	8.4	9.5	6.1	42.8	20.0	2.1
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	11	6.7	7.9	9.0	6.3	40.9	18.0	2.3
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	13	7.4	8.9	10.0	6.8	46.1	21.4	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	12.8	7.9	9.5	10.0	7.9	48.1	25.4	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	13.3	9.6	10.1	11.0	6.9	50.9	26.7	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	10.4	7.6	6.9	9.4	5.6	39.9	19.2	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	13.1	8.3	8.8	10.5	7.1	47.7	24.7	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	14.2	6.1	10.0	10.0	6.9	47.2	21.9	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	12.1	7.8	9.5	10.0	6.9	46.2	21.4	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	10.00	7.20	9.40	9.7	6.4	42.7	20.2	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	8.90	5.00	7.40	7.5	5.2	34.0	17.9	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	12.8	9.2	8.3	11.0	7.0	48.3	24.8	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	13.9	8.7	10.2	10.7	7.2	50.7	25.7	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	10.90	6.80	8.80	8.9	5.4	40.8	23.4	1.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	14.0	8.3	8.5	9.9	6.0	46.6	23.0	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	14.1	8.9	8.8	10.3	7.0	49.0	26.8	1.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	11.9	6.0	7.5	8.1	5.9	39.4	19.0	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	12.4	7.5	8.5	8.9	6.8	44.2	24.1	1.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	11.6	7.2	9.0	10.0	7.0	44.8	24.2	1.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	13.1	8.5	9.3	9.5	7.0	47.4	27.8	1.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	9.5	7.0	7.5	8.5	6.4	38.9	20.0	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	11.6	7.4	7.9	9.4	6.6	42.9	23.0	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	10.8	6.90	9.50	9.9	6.1	43.2	19.3	2.2

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	13.5	8.2	9.3	8.0	6.8	45.8	24.2	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	12.8	7.6	9.1	10.0	7.0	46.5	22.9	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	13.9	8.3	8.5	9.9	6.2	46.7	21.1	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	8.7	5.4	5.7	7.2	5.8	32.8	17.5	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	14.0	7.8	7.5	9.5	6.6	45.4	23.3	1.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	13.4	7.3	9.3	9.4	7.2	46.6	23.4	2.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	12.3	7.2	7.4	9.0	6.0	41.9	20.2	2.1

Table 4. Measurements of leg IV of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur IV length	Patella IV length	Tibiae IV length	Metatarsus IV length	Tarsus IV length	Total leg IV	Carapace length	Ratio (total/carapace length)
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	14.6	8.2	10.2	12.9	5.6	51.5	15.8	3.3
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	11.2	5.7	9.8	10.7	5.6	43.0	12.5	3.4
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	15.7	8.6	11.1	14.2	7.4	57.0	16.1	3.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	14.00	7.3	11.40	11.0	6.8	50.5	17.0	3.0
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	13.1	6.4	10.6	10.8	5.5	46.5	15.2	3.1
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	14.2	8.2	10.9	13.0	6.6	52.9	17.3	3.1
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	12.6	6.3	9.4	11.5	6.0	45.8	16.7	2.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	12.5	6.1	10.3	10.6	5.5	44.9	13.8	3.3
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	14.7	6.10	11.40	12.3	6.8	51.3	14.3	3.6
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	12.90	7.3	11.40	12.7	6.2	50.5	16.2	3.1
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	13.30	7.3	11.90	12.6	6.9	52.0	15.6	3.3
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	13.7	7.1	11	12.0	6.6	50.4	17.6	2.9
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	14.7	7.4	11.1	13.9	6.9	54.0	18.6	2.9
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	15.1	8.1	12	13.8	6.6	55.6	20.0	2.8
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	13.6	7	11	13.6	6.7	51.9	18.0	2.9
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	15.1	8.3	11	14.4	6.9	55.7	21.4	2.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	15.4	8.5	12.6	15.9	8.3	60.7	25.4	2.4

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	17.3	9.8	13.6	14.0	7.9	62.7	26.7	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	13.6	7.3	10.1	13.4	6.2	50.6	19.2	2.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	16.4	9.5	12.2	14.5	7.9	60.4	24.7	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	15.4	8.9	11.9	16.0	8.0	60.1	21.9	2.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	17.9	7.9	11.6	14.0	6.9	58.3	21.4	2.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	13.9	7.4	12.0	12.1	6.9	52.3	20.2	2.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	11.2	6.0	9.0	11.0	5.7	42.9	17.9	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	15.5	10.2	11.3	15.9	7.9	60.8	24.8	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	15.5	9.0	12.2	15.1	8.1	59.9	25.7	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	15.6	9.0	12.3	15.0	7.2	59.1	23.4	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	15.6	8.6	11.2	14.5	7.4	57.2	23.0	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	18.1	8.5	13.2	16.6	8.0	64.3	26.8	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	13.7	7.6	10.7	13.1	6.0	51.2	19.0	2.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	13.7	8.4	10.5	12.0	6.9	51.5	24.1	2.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	14.2	8.0	11.9	15.2	7.3	56.6	24.2	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	16.6	9.5	12.7	14.7	7.4	61.0	27.8	2.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	12.3	7.2	8.3	12.8	5.9	46.5	20.0	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	14.7	7.0	10.0	13.5	7.2	52.4	23.0	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	13.5	7.10	12.70	14.1	6.8	54.2	19.3	2.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	16.4	8.1	12.0	15.1	7.0	58.6	24.2	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	16.2	8.5	11.8	14.7	7.3	58.4	22.9	2.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	17.3	9.9	10.8	13.1	7.4	58.4	21.1	2.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	11.7	6.3	8.6	10.3	6.0	42.9	17.5	2.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	15.8	7.9	10.1	13.9	6.9	54.6	23.3	2.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	15.5	7.7	13.0	13.9	7.4	57.5	23.4	2.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	14.3	8.1	10.3	13.0	6.8	52.5	20.2	2.6

Table 5. Measurements of leg I of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur I length	Patella I length	Tibiae I length	Metatarsus I length	Tarsus I length	Femur I width	Patella I width	Tibiae I width	Metatarsus I width	Tarsus I width	Ratio Femur	Ratio Patela	Ratio Tfbia	Ratio Metatarso	Ratio Tarso
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	14.9	9.5	10.0	8.7	6.8	3.9	3.9	3.5	2.8	2.6	3.8	2.4	2.9	3.1	2.6
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	12.5	5.9	8.6	6.0	4.6	2.5	2.5	2.0	1.7	1.6	5.0	2.3	4.3	3.5	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	15.9	8.3	11.4	9.6	7.0	3.8	3.8	3.5	2.7	2.1	4.2	2.2	3.2	3.6	3.3
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	14.0	8.3	11.4	7.2	6.2	3.6	3.6	3.5	2.4	2.1	3.9	2.3	3.3	3.0	3.0
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	14.5	7.7	9.3	6.9	6.0	3.0	3.0	2.9	2.0	1.7	4.8	2.6	3.2	3.5	3.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	14.7	9.4	10.8	7.7	7.8	3.8	3.8	3.3	2.4	2.0	3.9	2.5	3.3	3.2	3.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	13.5	7.3	9.0	6.6	6.0	3.0	3.0	2.8	2.0	1.8	4.5	2.4	3.2	3.3	3.3
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	14.1	7.1	9.8	6.9	5.6	2.9	2.9	2.2	2.0	1.9	4.9	2.5	4.5	3.5	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	15.2	8.5	11.7	8.4	6.7	3.3	3.3	3.0	2.2	2.0	4.6	2.6	3.9	3.8	3.4
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74054	15.5	8.7	11.2	8.0	7.3	3.8	3.8	3.3	2.5	2.0	4.1	2.3	3.4	3.2	3.7
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	13.0	8.3	11.3	7.5	5.6	3.0	3.0	3.0	2.3	1.9	4.3	2.8	3.8	3.3	2.9
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	13.3	8.3	11.0	7.5	5.5	3.0	3.0	2.9	2.3	2.0	4.4	2.8	3.8	3.3	2.8
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	13	8	10	7.0	6.1	3.0	3.0	2.7	2.0	1.9	4.3	2.7	3.7	3.5	3.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	14	8.8	10.8	8.7	5.9	3.1	3.1	3.0	2.7	2.0	4.5	2.8	3.6	3.2	3.0
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	15	8.9	11.2	9.5	6.7	3.1	3.1	3.1	2.3	2.1	4.8	2.9	3.6	4.1	3.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	14	8	10.3	8.0	6.6	3.0	3.0	3.0	2.0	1.9	4.7	2.7	3.4	4.0	3.5
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	15.3	9.1	10.8	10.1	5.8	3.3	3.3	3.0	2.0	1.8	4.6	2.8	3.6	5.1	3.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	19.0	7.4	12.9	10.9	8.1	4.1	4.0	3.7	2.8	2.3	4.6	1.9	3.5	3.9	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	15.7	7.1	12.8	8.9	7.5	4.5	3.9	3.1	2.2	1.9	3.5	1.8	4.1	4.0	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	13.6	8.7	9.4	8.0	6.0	2.9	2.9	2.2	1.8	1.5	4.7	3.0	4.3	4.4	4.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	15.5	9.1	11.2	9.6	7.7	4.0	4.2	3.6	2.7	2.0	3.9	2.2	3.1	3.6	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	16.8	9.7	10.0	10.0	6.7	4.0	3.8	3.3	2.5	1.9	4.2	2.5	3.0	4.0	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	16.6	9.4	12.6	9.0	7.3	4.0	3.6	3.3	2.1	1.9	4.2	2.6	3.8	4.3	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	13.6	8.1	11.3	8.5	6.0	3.1	3.3	2.9	2.0	1.6	4.4	2.4	3.9	4.3	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	12.30	7.10	9.50	6.9	5.9	2.7	2.7	2.4	1.8	1.5	4.6	2.6	4.0	3.8	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	18.0	10.9	12.0	10.7	7.7	3.9	3.9	3.3	2.5	1.9	4.6	2.8	3.6	4.3	4.1

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	19.0	7.4	12.9	10.5	8.3	4.9	4.9	4.0	2.9	2.5	3.9	1.5	3.2	3.6	3.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	16.4	9.2	11.4	9.2	6.9	3.9	4.0	3.6	2.3	2.0	4.2	2.3	3.2	4.0	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	18.2	10.6	12.6	9.7	6.9	3.9	3.9	3.4	2.2	1.8	4.7	2.7	3.7	4.4	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	19.1	10.7	9.5	12.0	8.0	4.9	4.5	3.9	2.8	2.2	3.9	2.4	2.4	4.3	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	14.2	9.3	9.1	8.4	6.0	3.1	3.1	2.8	2.1	1.6	4.6	3.0	3.3	4.0	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	14.5	10.3	12.6	8.8	6.5	4.1	3.1	3.4	2.0	1.9	3.5	3.3	3.7	4.4	3.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	16.9	9.9	10.4	9.5	7.4	3.8	3.3	3.3	2.2	1.9	4.5	3.0	3.1	4.3	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	17.1	9.5	11.9	10.4	7.6	4.3	4.0	3.5	2.3	1.8	4.0	2.4	3.4	4.5	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	13.2	7.9	9.8	7.3	6.8	2.5	3.3	2.7	1.8	1.5	5.3	2.4	3.6	4.1	4.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	15.7	8.4	12.6	9.2	6.8	3.8	3.8	3.0	2.2	1.9	4.1	2.2	4.2	4.2	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	13.8	6.6	8.2	9.5	6.9	3.4	3.4	2.9	2.2	1.6	4.1	1.9	2.8	4.3	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	17.8	9.3	12.5	9.5	7.2	4.0	3.8	3.6	2.2	1.7	4.5	2.5	3.5	4.3	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	16.9	9.4	12.2	9.0	7.9	4.3	3.9	3.6	2.3	1.9	3.9	2.4	3.4	3.9	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	16.9	9.7	9.6	10.5	7.0	3.6	3.5	3.3	2.1	1.7	4.7	2.8	2.9	5.0	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	12.5	6.0	8.7	7.4	5.0	2.9	2.9	2.6	1.9	1.7	4.3	2.1	3.4	3.9	2.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	16.5	9.8	10.1	8.6	6.9	3.7	3.7	3.2	2.4	1.9	4.5	2.7	3.2	3.6	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	17.1	10.0	11.1	8.9	6.8	3.9	3.7	3.2	2.4	2.0	4.4	2.7	3.5	3.7	3.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	16.2	9.0	9.9	8.5	6.2	3.2	3.1	2.9	2.2	1.4	5.1	2.9	3.4	3.9	4.4

Table 6. Measurements of leg II of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur II length	Patella II length	Tibiae II length	Metatarsus II length	Tarsus II length	Femur II width	Patella II width	Tibiae II width	Metatarsus II width	Tarsus II width	Ratio Femur	Ratio Patela	Ratio Tíbia	Ratio Metatarso	Ratio Tarso
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	12.9	8.2	9.0	8.6	5.8	3.2	3.5	3.0	2.4	1.9	4.0	2.3	3.0	3.6	3.1
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	9.8	6.3	6.5	6.0	5.0	2.1	2.4	2.0	1.6	1.7	4.6	2.6	3.3	3.8	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	13.2	8.3	9.2	8.1	6.9	3.0	3.7	3.0	2.1	1.9	4.4	2.2	3.1	3.9	3.6
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	13.5	7.5	10.8	7.5	6.0	3.5	3.5	3.0	2.1	2.1	3.9	2.1	3.6	3.6	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	12.4	7.0	8.4	6.9	6.0	3.0	2.8	2.3	2.0	1.9	4.1	2.5	3.7	3.5	3.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	14.1	6.7	9.4	8.3	7.0	3.8	3.3	3.0	2.1	2.0	3.7	2.0	3.1	4.0	3.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	12.4	6.5	8.9	7.3	6.0	2.6	2.9	2.2	2.4	1.7	4.8	2.2	4.0	3.0	3.5

<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	13.2	6.7	9.6	5.6	5.0	3.1	2.5	2.0	1.9	1.6	4.2	2.7	4.8	2.9	3.1
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	12.7	7.9	8.8	8.4	6.9	3.0	3.0	2.7	2.0	1.9	4.2	2.6	3.3	4.2	3.6
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	11.8	7.5	10.0	7.2	5.7	3.5	3.1	2.5	2.3	1.7	3.4	2.4	4.0	3.1	3.4
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	12.7	7.5	10.1	7.0	5.9	3.0	2.8	2.5	2.0	1.7	4.2	2.7	4.0	3.5	3.5
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	19.0	7	8.4	7.4	5.4	3.0	2.6	2.8	1.9	1.7	6.3	2.7	3.0	3.9	3.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	12.6	7.6	9.3	8.5	5.5	3.2	3.1	3.0	2.0	1.9	3.9	2.5	3.1	4.3	2.9
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	13.0	8	9	8.0	6.4	3.2	3.1	2.7	2.1	1.9	4.1	2.6	3.3	3.8	3.4
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	12.0	6.9	8.8	7.3	6.1	3.0	2.9	2.3	2.0	1.8	4.0	2.4	3.8	3.7	3.4
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	14.0	7.6	9.9	8.5	6.0	3.1	3.2	2.6	1.9	1.6	4.5	2.4	3.8	4.5	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	14.2	9.2	9.0	10.0	7.4	4.0	3.9	3.4	2.4	1.9	3.6	2.4	2.7	4.2	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	14.0	10.9	11.7	9.9	7.9	4.5	3.9	3.3	2.3	2.0	3.1	2.8	3.5	4.3	4.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	14.6	7.6	8.1	8.1	5.6	2.9	2.8	2.0	1.7	1.4	5.0	2.7	4.1	4.8	4.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	14.5	8.5	9.9	9.0	6.9	4.0	4.2	3.2	2.4	2.0	3.6	2.0	3.1	3.8	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	14.1	8.3	10.6	9.0	6.6	3.4	3.7	3.0	2.1	1.9	4.2	2.3	3.5	4.3	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	14.6	9.1	9.9	8.6	8.0	3.9	3.4	2.9	2.0	1.9	3.7	2.7	3.4	4.3	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	13.3	7.30	10.7	9.1	6.1	3.5	3.6	2.8	2.0	1.9	3.8	2.0	3.8	4.6	3.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	10.9	6.40	8.0	6.9	5.5	2.3	2.5	2.0	1.7	1.5	4.7	2.6	4.0	4.1	3.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	15.5	10.2	10.9	10.3	6.8	3.9	3.9	3.0	2.2	1.9	4.0	2.6	3.6	4.7	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	16.1	10.2	10.1	9.8	7.2	4.5	4.4	3.5	2.8	2.1	3.6	2.3	2.9	3.5	3.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	13.6	8.4	11.1	8.1	6.8	3.8	4.1	3.3	2.2	1.9	3.6	2.0	3.4	3.7	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	15.8	9.6	10.2	8.9	6.8	3.4	3.5	2.6	2.0	1.9	4.6	2.7	3.9	4.5	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	17.3	8.6	10.0	10.2	7.7	4.5	4.2	3.4	2.7	1.9	3.8	2.1	2.9	3.8	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	12.7	7.2	9.0	8.3	5.9	3.0	3.0	2.5	1.9	1.7	4.2	2.4	3.6	4.4	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	12.9	9.4	8.7	8.9	6.7	3.4	3.4	2.7	2.0	1.7	3.8	2.8	3.2	4.5	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	12.4	10.1	9.7	9.6	6.9	3.4	3.2	2.5	1.7	1.5	3.6	3.2	3.9	5.6	4.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	15.4	8.8	9.5	8.5	6.8	3.8	3.9	3.0	2.4	1.8	4.1	2.3	3.2	3.5	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	10.8	6.2	8.8	7.2	5.9	2.4	2.9	2.3	1.9	1.5	4.5	2.2	3.8	3.8	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	13.3	8.4	8.9	8.3	6.9	3.5	3.5	2.7	2.0	1.9	3.8	2.4	3.3	4.2	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	11.1	5.7	11.0	8.1	6.8	3.3	3.0	2.7	1.8	1.7	3.4	1.9	4.1	4.5	4.0

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	15.0	9.4	10.4	8.7	7.1	3.9	3.5	3.0	2.1	1.6	3.8	2.7	3.5	4.1	4.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	15.3	8.9	9.9	9.0	7.3	3.9	3.8	3.0	2.3	1.9	3.9	2.3	3.3	3.9	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	16.3	8.8	8.8	9.3	6.2	3.3	3.4	2.9	2.0	1.4	4.9	2.6	3.0	4.7	4.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	10.5	6.2	7.2	5.9	5.3	2.6	2.5	2.0	1.7	1.6	4.0	2.5	3.6	3.5	3.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	15.4	8.8	9.2	8.6	6.5	3.8	3.7	2.7	2.0	1.8	4.1	2.4	3.4	4.3	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	15.1	9.1	10.5	8.6	6.6	3.9	3.5	2.9	2.0	1.6	3.9	2.6	3.6	4.3	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	13.9	8.5	8.2	7.2	5.9	3.0	2.9	2.5	1.9	1.2	4.6	2.9	3.3	3.8	4.9

Table 7. Measurements of leg III of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur III length	Patella III length	Tibiae III length	Metatarsus III length	Tarsus III length	Femur III width	Patella III width	Tibiae III width	Metatarsus III width	Tarsus III width	Ratio Femur	Ratio Patela	Ratio Tíbia	Ratio Metatarso	Ratio Tarso
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	11.6	7.6	7.7	8.9	6.4	3.5	3.2	2.8	2.0	1.9	3.3	2.4	2.7	4.5	3.4
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	8.6	5.1	7.0	6.6	5.1	2.4	2.4	1.9	1.6	1.3	3.6	2.1	3.7	4.1	3.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	12.8	6.5	9.0	8.4	6.6	3.8	3.4	2.9	2.0	1.9	3.4	1.9	3.1	4.2	3.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	11.8	6.6	9.7	8.3	6.0	3.4	3.0	2.9	2.0	1.9	3.5	2.2	3.3	4.2	3.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	10.2	6.4	7.3	7.6	5.1	3.0	2.8	2.4	1.9	1.6	3.4	2.3	3.0	4.0	3.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	11.7	7.0	7.9	8.6	6.8	3.7	3.4	2.9	1.9	2.0	3.2	2.1	2.7	4.5	3.4
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	10.9	5.8	8.3	8.4	6.5	3.4	2.8	3.4	2.0	1.7	3.2	2.1	2.5	4.3	3.8
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	10.2	5.2	7.9	7.0	5.0	2.7	2.6	2.2	1.8	1.7	3.8	2.0	3.6	3.9	2.9
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	11.3	7.4	7.3	8.5	6.0	3.0	3.3	2.6	2.0	1.7	3.8	2.2	2.8	4.3	3.5
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	10.8	6.6	8.9	8.6	5.9	3.1	3.4	2.8	2.0	1.7	3.5	1.9	3.2	4.3	3.5
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	11.0	6.6	9.0	8.0	6.2	3.1	3.0	2.8	2.0	1.7	3.5	2.2	3.2	4.0	3.6
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	11.7	5.9	7.9	8.5	6.3	2.9	2.9	2.2	1.9	1.6	4.0	2.0	3.6	4.5	3.9
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	11.9	6.5	8.9	8.4	6.0	3.1	3.0	2.8	2.0	1.7	3.8	2.2	3.2	4.2	3.5
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	12.0	6.8	8.4	9.5	6.1	3.5	3.0	2.7	2.0	1.9	3.4	2.3	3.1	4.8	3.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	11.0	6.7	7.9	9.0	6.3	3.0	2.7	2.3	2.0	1.7	3.7	2.5	3.4	4.5	3.7
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	13.0	7.4	8.9	10.0	6.8	3.1	3.0	2.6	2.0	1.9	4.2	2.5	3.4	5.0	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	12.8	7.9	9.5	10.0	7.9	4.0	3.7	3.2	2.2	1.9	3.2	2.1	3.0	4.5	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	13.3	9.6	10.1	11.0	6.9	4.0	3.6	3.0	2.2	1.9	3.3	2.7	3.4	5.0	3.6

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	10.4	7.6	6.9	9.4	5.6	2.9	2.8	2.1	2.0	1.4	3.6	2.7	3.3	4.7	4.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	13.1	8.3	8.8	10.5	7.1	4.0	4.0	3.3	2.5	2.0	3.3	2.1	2.7	4.2	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	14.2	6.1	10.0	10.0	6.9	3.5	3.4	3.0	2.0	1.8	4.1	1.8	3.3	5.0	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	12.1	7.8	9.5	10.0	6.9	3.8	3.3	3.0	2.0	1.9	3.2	2.4	3.2	5.0	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	10.0	7.2	9.4	9.7	6.4	3.0	3.5	2.9	2.1	1.8	3.3	2.1	3.2	4.6	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	8.9	5.0	7.4	7.5	5.2	2.5	2.4	2.0	1.7	1.4	3.6	2.1	3.7	4.4	3.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	12.8	9.2	8.3	11.0	7.0	3.5	3.8	2.9	2.1	1.8	3.7	2.4	2.9	5.2	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	13.9	8.7	10.2	10.7	7.2	4.5	4.4	3.9	2.4	2.1	3.1	2.0	2.6	4.5	3.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	10.9	6.8	8.8	8.9	5.4	3.2	3.1	2.8	2.0	1.8	3.4	2.2	3.1	4.5	3.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	14.0	8.3	8.5	9.9	6.0	3.6	3.7	3.0	2.0	1.5	3.9	2.2	2.8	5.0	4.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	14.1	8.9	8.8	10.3	7.0	4.1	4.1	3.5	2.7	2.0	3.4	2.2	2.5	3.8	3.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	11.9	6.0	7.5	8.1	5.9	3.2	3.0	2.4	2.0	1.4	3.7	2.0	3.1	4.1	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	12.4	7.5	8.5	8.9	6.8	3.3	3.7	2.6	2.0	1.6	3.8	2.0	3.3	4.5	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	11.6	7.2	9.0	10.0	7.0	3.9	3.2	2.7	2.0	1.5	3.0	2.2	3.3	5.0	4.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	13.1	8.5	9.3	9.5	7.0	4.0	3.5	3.0	2.1	1.8	3.3	2.4	3.1	4.5	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	9.5	7.0	7.5	8.5	6.4	3.0	2.9	2.3	1.7	1.5	3.2	2.4	3.2	5.0	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	11.6	7.4	7.9	9.4	6.6	3.6	3.5	2.9	2.0	1.7	3.2	2.1	2.7	4.7	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	10.8	6.9	9.5	9.9	6.1	3.2	3.0	2.6	1.8	1.7	3.4	2.3	3.7	5.5	3.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	13.5	8.2	9.3	8.0	6.8	3.7	3.5	2.9	2.0	1.6	3.7	2.4	3.2	4.0	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	12.8	7.6	9.1	10.0	7.0	4.2	3.7	3.1	2.1	1.9	3.1	2.1	2.9	4.8	3.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	13.9	8.3	8.5	9.9	6.2	3.6	3.3	2.9	2.0	1.6	3.9	2.5	2.9	5.0	3.9
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	8.7	5.4	5.7	7.2	5.8	2.8	2.7	2.3	1.6	1.4	3.1	2.0	2.5	4.5	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	14.0	7.8	7.5	9.5	6.6	3.7	3.3	2.9	2.0	1.8	3.8	2.3	2.6	4.8	3.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	13.4	7.3	9.3	9.4	7.2	3.8	3.4	3.0	2.0	1.7	3.5	2.2	3.1	4.7	4.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	12.3	7.2	7.4	9.0	6.0	3.0	2.9	2.3	1.9	1.3	4.1	2.5	3.2	4.7	4.6

Table 8. Measurements of leg IV of specimens of *V. paranaensis* and *V. vellutinus*.

Species	Collection	Number	Femur IV length	Patella IV length	Tibiae IV length	Metatarsus IV length	Tarsus IV length	Femur IV width	Patella IV width	Tibiae IV width	Metatarsus IV width	Tarsus IV width	Ratio Femur	Ratio Patela	Ratio Tíbia	Ratio Metatarso	Ratio Tarso
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74057	14.6	8.2	10.2	12.9	5.6	3.0	3.1	2.6	1.9	1.8	4.9	2.6	3.9	6.8	3.1
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	32336	11.2	5.7	9.8	10.7	5.6	2.0	2.4	2.0	1.5	1.4	5.6	2.4	4.9	7.1	4.0
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74067	15.7	8.6	11.1	14.2	7.4	3.5	3.1	2.9	1.8	1.8	4.5	2.8	3.8	7.9	4.1
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74062	14.0	7.3	11.4	11.0	6.8	3.0	3.4	2.7	1.9	1.9	4.7	2.1	4.2	5.8	3.6
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74069	13.1	6.4	10.6	10.8	5.5	3.0	2.9	2.5	1.8	1.5	4.4	2.2	4.3	6.0	3.7
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74066	14.2	8.2	10.9	13.0	6.6	3.6	3.3	2.8	1.9	1.9	4.0	2.5	3.9	6.8	3.5
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070	12.6	6.3	9.4	11.5	6.0	2.9	2.9	2.3	1.7	1.5	4.3	2.2	4.1	6.8	4.0
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74076	12.5	6.1	10.3	10.6	5.5	2.3	2.6	2.0	1.4	1.3	5.4	2.4	5.1	7.6	4.2
<i>V. paranaensis</i>	MZUSP	74070-2	14.7	6.1	11.4	12.3	6.8	2.7	3.0	2.9	1.6	1.6	5.4	2.0	3.9	7.7	4.3
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106677	12.9	7.3	11.4	12.7	6.2	3.0	3.0	2.4	1.8	1.7	4.3	2.4	4.8	7.1	3.6
<i>V. paranaensis</i>	IBSP	106689	13.3	7.3	11.9	12.6	6.9	2.7	2.9	2.0	1.8	1.8	4.9	2.5	6.0	7.0	3.8
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	6	13.7	7.1	11	12.0	6.6	2.7	2.8	2.2	1.6	1.5	5.1	2.5	5.0	7.5	4.4
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	8	14.7	7.4	11.1	13.9	6.9	3.1	3.1	2.6	1.9	1.8	4.7	2.4	4.3	7.3	3.8
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	4	15.1	8.1	12	13.8	6.6	3.3	3.0	2.6	1.9	1.8	4.6	2.7	4.6	7.3	3.7
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	2	13.6	7	11	13.6	6.7	2.9	2.9	2.3	1.7	1.6	4.7	2.4	4.8	8.0	4.2
<i>V. paranaensis</i>	PNI_2018_The	7	15.1	8.3	11	14.4	6.9	3.1	3.1	2.3	1.9	1.7	4.9	2.7	4.8	7.6	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104132-A	15.4	8.5	12.6	15.9	8.3	3.8	3.9	3.2	2.1	1.9	4.1	2.2	3.9	7.6	4.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106984	17.3	9.8	13.6	14.0	7.9	3.8	4.0	2.9	2.1	1.7	4.6	2.5	4.7	6.7	4.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104456-B	13.6	7.3	10.1	13.4	6.2	2.7	2.6	2.0	2.0	1.2	5.0	2.8	5.1	6.7	5.2
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101049	16.4	9.5	12.2	14.5	7.9	3.9	4.0	3.0	2.2	1.8	4.2	2.4	4.1	6.6	4.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106973	15.4	8.9	11.9	16.0	8.0	3.5	3.4	2.8	1.9	1.7	4.4	2.6	4.2	8.4	4.7
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	100281	17.9	7.9	11.6	14.0	6.9	3.6	3.1	2.9	1.9	1.7	5.0	2.5	4.0	7.4	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101204	13.9	7.4	12.0	12.1	6.9	3.3	3.6	2.6	1.9	1.8	4.2	2.1	4.6	6.4	3.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	103993	11.2	6.0	9.0	11.0	5.7	2.2	2.1	1.9	1.3	1.2	5.1	2.9	4.7	8.5	4.8
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105687	15.5	10.2	11.3	15.9	7.9	3.3	3.6	2.9	1.9	1.5	4.7	2.8	3.9	8.4	5.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	9871	15.5	9.0	12.2	15.1	8.1	4.6	4.7	4.5	2.7	2.1	3.4	1.9	2.7	5.6	3.9

<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102195	15.6	9.0	12.3	15.0	7.2	3.7	4.1	3.2	2.1	1.8	4.2	2.2	3.8	7.1	4.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	105678	15.6	8.6	11.2	14.5	7.4	3.7	3.5	2.8	1.8	1.7	4.2	2.4	4.0	8.1	4.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101424	18.1	8.5	13.2	16.6	8.0	4.2	4.1	3.4	2.4	1.8	4.3	2.1	3.9	6.9	4.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101362	13.7	7.6	10.7	13.1	6.0	3.0	2.7	2.6	1.7	1.4	4.6	2.8	4.1	7.7	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	11643	13.7	8.4	10.5	12.0	6.9	4.1	3.6	2.9	1.8	1.6	3.3	2.3	3.6	6.7	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104119	14.2	8.0	11.9	15.2	7.3	3.6	3.4	2.5	1.9	1.3	3.9	2.4	4.8	8.0	5.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104053	16.6	9.5	12.7	14.7	7.4	3.8	3.8	2.9	2.0	1.6	4.4	2.5	4.4	7.4	4.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	212965	12.3	7.2	8.3	12.8	5.9	2.7	2.9	2.0	2.0	1.1	4.6	2.5	4.2	6.4	5.4
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104656	14.7	7.0	10.0	13.5	7.2	3.6	3.9	2.8	1.9	1.6	4.1	1.8	3.6	7.1	4.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	102416	13.5	7.1	12.7	14.1	6.8	3.5	3.0	2.4	1.6	1.5	3.8	2.4	5.3	8.8	4.5
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101463	16.4	8.1	12.0	15.1	7.0	3.7	3.3	2.8	2.0	1.4	4.4	2.5	4.3	7.6	5.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	106977	16.2	8.5	11.8	14.7	7.3	3.7	3.5	3.0	2.0	1.8	4.4	2.4	3.9	7.4	4.1
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-A	17.3	9.9	10.8	13.1	7.4	3.3	3.6	2.8	1.9	1.6	5.2	2.7	3.8	6.9	4.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101074	11.7	6.3	8.6	10.3	6.0	2.4	2.5	2.0	1.7	1.2	4.9	2.5	4.3	6.1	5.0
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	101080	15.8	7.9	10.1	13.9	6.9	3.2	3.3	2.7	1.8	1.6	4.9	2.4	3.7	7.7	4.3
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104141-B	15.5	7.7	13.0	13.9	7.4	3.5	3.3	2.8	1.9	1.6	4.4	2.3	4.6	7.3	4.6
<i>V. vellutinus</i>	IBSP	104504	14.3	8.1	10.3	13.0	6.8	2.9	3.2	2.3	1.8	1.2	4.9	2.5	4.5	7.2	5.7

File S3. Statistical Analysis.

Legs analysis  
PCA values

PC	Eigenvalue	% variance
1	1.3	29.0
2	0.9	21.3
3	0.410199	9.3874
4	0.339402	7.7672
5	0.207878	4.7573
6	0.166265	3.805
7	0.164838	3.7723
8	0.157674	3.6084
9	0.124249	2.8434
10	0.113742	2.603
11	0.089581	2.0501
12	0.0735195	1.6825
13	0.0701198	1.6047
14	0.0582621	1.3333
15	0.0523222	1.1974
16	0.0364201	0.83347
17	0.031364	0.71776
18	0.0220953	0.52853
19	0.0183389	0.41968
20	0.0163538	0.37426
21	0.0105429	0.24127
22	0.0033315	0.07624
23	0.0019486	0.044593
24	0.0010779	0.024668

Contribution of each variable for PCs 1 and 2

	PC1	PC2
L1C	-0.2108	0.1626
LII/C	-0.1991	0.1631
LIII/C	-0.1836	0.1492
LIV/C	-0.2295	0.2068
F1	0.06193	0.253
PI	0.07763	0.1722
TI	-0.02571	0.206
MI	0.3345	-0.01713
TI	0.3153	-0.07495
FI	0.003662	0.3306
PII	0.08385	0.1227
TMI	0.01736	0.228
MII	0.3332	0.01531
TII	0.3115	-0.04622
FII	0.03702	0.18
PIII	0.06616	0.0233
TMI	0.04169	0.2116
MIII	0.2176	-0.01594
TII	0.2481	0.01263
FIV	-0.08613	0.3726
PIV	0.06367	0.1272
TIV	0.001546	0.4228
MIV	0.301	0.3777
TIV	0.4169	0.08168

Normality tests

Length of leg/carapace

<i>V. paranaensis</i>	L1/C	LII/C	LIII/C	LIV/C	<i>V. vellutinus</i>	L1/C	LII/C	LIII/C	LIV/C
N	17	17	17	17	N	27	27	27	27
Shapiro-Wilk W	0.9539	0.9477	0.9711	0.974	Shapiro-Wilk W	0.9206	0.9278	0.9192	0.9558
p(normal)	0.5218	0.4205	0.8379	0.8832	p(normal)	0.04086	0.06091	0.03767	0.2945
Jarque-Bera JB	0.6336	0.4991	0.5688	0.4603	Jarque-Bera JB	1.987	0.8248	0.8079	0.6769
p(normal)	0.7285	0.7791	0.7525	0.7944	p(normal)	0.3703	0.6621	0.6677	0.7129
p(Monte Carlo)	0.6304	0.7124	0.6752	0.7447	p(Monte Carlo)	0.1635	0.5591	0.566	0.6348
Chi²	2.0588	0.17647	1.5882	3.9412	Chi²	3.3704	2.1852	3.3704	2.1852
p(normal)	0.15133	0.67442	0.20758	0.047118	p(normal)	0.066379	0.13934	0.066379	0.13934
Chi² OK (N>20)	NO	NO	NO	NO	Chi² OK (N>20)	YES	YES	YES	YES
Anderson-Darling A	0.3308	0.4954	0.2316	0.2342	Anderson-Darling A	0.9481	0.7448	0.9127	0.5299
p(normal)	0.4779	0.1851	0.7654	0.7566	p(normal)	0.01401	0.04603	0.01723	0.1601

Length/Width of metatarsus

<i>V. paranaensis</i>	MI	MII	MIII	MIV	<i>V. vellutinus</i>	MI	MII	MIII	MIV
N	17	17	17	17	N	27	27	27	27
Shapiro-Wilk W	0.7997	0.9667	0.936	0.9293	Shapiro-Wilk W	0.9358	0.9388	0.962	0.9863
p(normal)	0.002012	0.7586	0.2742	0.2121	p(normal)	0.09573	0.1137	0.4092	0.9687
Jarque-Bera JB	18.41	0.2196	1.484	1.681	Jarque-Bera JB	0.8399	2.932	0.3052	0.2372
p(normal)	0.0001004	0.896	0.4762	0.4315	p(normal)	0.6571	0.2309	0.8585	0.8882
p(Monte Carlo)	0.0022	0.8905	0.1931	0.1544	p(Monte Carlo)	0.5466	0.0857	0.8408	0.881
Chi <sup>2</sup>	3.4706	1.1176	3	3.4706	Chi <sup>2</sup>	1.8889	1.8889	1.2963	1
p(normal)	0.062469	0.29043	0.083265	0.062469	p(normal)	0.16933	0.16933	0.25489	0.31731
Chi <sup>2</sup> OK (N>20)	NO	NO	NO	NO	Chi <sup>2</sup> OK (N>20)	YES	YES	YES	YES
Anderson-Darling A	1.116	0.2766	0.4606	0.4408	Anderson-Darling A	0.6085	0.4328	0.5195	0.1654
p(normal)	0.004588	0.6095	0.2278	0.2558	p(normal)	0.1023	0.2819	0.1704	0.9326

## Length/Width of tarsus

<i>V. paranaensis</i>	TI	TII	TIII	TIV	<i>V. vellutinus</i>	TI	TII	TIII	TIV
N	17	17	17	17	N	27	27	27	27
Shapiro-Wilk W	0.9758	0.9446	0.9496	0.967	Shapiro-Wilk W	0.9781	0.9549	0.9734	0.9476
p(normal)	0.9089	0.3775	0.4507	0.7649	p(normal)	0.816	0.2807	0.692	0.1871
Jarque-Bera JB	0.4302	0.6427	0.323	0.7575	Jarque-Bera JB	0.3554	2.283	0.008962	1.713
p(normal)	0.8065	0.7252	0.8508	0.6847	p(normal)	0.8372	0.3194	0.9955	0.4246
p(Monte Carlo)	0.7629	0.6081	0.8331	0.5383	p(Monte Carlo)	0.8148	0.1218	0.995	0.2102
Chi <sup>2</sup>	2.0588	1.5882	3	0.17647	Chi <sup>2</sup>	0.7037	1	1.5926	9.5926
p(normal)	0.15133	0.20758	0.083265	0.67442	p(normal)	0.40154	0.31731	0.20696	0.0019536
Chi <sup>2</sup> OK (N>20)	NO	NO	NO	NO	Chi <sup>2</sup> OK (N>20)	YES	YES	YES	YES
Anderson-Darling A	0.229	0.3643	0.393	0.2146	Anderson-Darling A	0.2497	0.4419	0.3469	0.5724
p(normal)	0.7738	0.3967	0.3371	0.8193	p(normal)	0.72	0.2677	0.4543	0.1239

## Length/Width of femur IV and tibiae IV

<i>V. paranaensis</i>	FIV	TbIV	<i>V. vellutinus</i>	FIV	TbIV
N	17	17	N	27	27
Shapiro-Wilk W	0.9694	0.919	Shapiro-Wilk W	0.9573	0.9639
p(normal)	0.8076	0.1418	p(normal)	0.32	0.4518
Jarque-Bera JB	0.3632	2.247	Jarque-Bera JB	0.9878	1.192
p(normal)	0.8339	0.3252	p(normal)	0.6103	0.551
p(Monte Carlo)	0.8073	0.0941	p(Monte Carlo)	0.4712	0.3778
Chi <sup>2</sup>	0.17647	0.64706	Chi <sup>2</sup>	6.3333	0.40741
p(normal)	0.67442	0.42117	p(normal)	0.011849	0.52329
Chi <sup>2</sup> OK (N>20)	NO	NO	Chi <sup>2</sup> OK (N>20)	YES	YES
Anderson-Darling A	0.2642	0.4096	Anderson-Darling A	0.3875	0.3481
p(normal)	0.6513	0.3066	p(normal)	0.3636	0.4514

## Mann-Whitney tests

Length of legs/length of carapace	LIC		LIIC		LIIIC		LIVC	
<i>V. paranaensis</i> (N=17) vs. <i>V. vellutinus</i> (N=27)								
Mean ranks:	13.58	8.92	13.3	9.205	13.68	8.818	13.65	8.852
T=Ub:	14.5		27		10		11.5	
p(same):	1.78E-07		9.06E-07		1.01E-07		1.39E-07	
Monte Carlo p:	0.0001		0.0001		0.0001		0.0001	

Length/Width of metatarsus	MI		MII		MIII		MIV	
<i>V. paranaensis</i> (N=17) vs. <i>V. vellutinus</i> (N=27)								
Mean ranks:	4.784	17.7	5.795	16.7	5.83	16.67	8.284	14.22
T=Ub:	57.5		102		103.5		211.5	
p(same):	3.31E-05		2.12E-03		2.24E-03		6.73E-01	
Monte Carlo p:	0.0001		0.0009		0.0018		0.6856	

Length/ Width of tarsus	TI		TII		TIII		TIV	
<i>V. paranaensis</i> (N=17) vs. <i>V. vellutinus</i> (N=27)								
Mean ranks:	4.602	17.9	4.693	17.81	5.261	17.24	4.432	18.07
T=Ub:	49.5		53.5		78.5		42	
p(same):	1.43E-05		2.15E-05		2.65E-04		6.26E-06	
Monte Carlo p:	0.0001		0.0001		0.0003		0.0001	

Length/ Width of Femur IV and Tibiae IV	FIV		TbIV	
<i>V. paranaensis</i> (N=17) vs. <i>V. vellutinus</i> (N=27)				
Mean ranks:	10.78	11.7	10.47	12.03
T=Ub:	137.5		151.5	
p(same):	2.68E-02		6.09E-02	
Monte Carlo p:	0.0257		0.0615	

## Elliptic Fourier Analysis

### Dataset - Spermathecae:

N° of harmonics = 6

Principal Component Coefficients

PC's proportions

proportion cumulative

PC1 45.620952 45.62095

PC2 27.827253 73.44820

PC3 15.402372 88.85058

PC4 4.372749 93.22333

PC5 2.269500 95.49283

The *a priori* probabilities that each specimen has of belonging to each species

*V. paranaensis* *V. vellutinus*

0.44 0.56

### Dataset – Palpal bulbs:

N° of harmonics = 5

PC's proportions

proportion cumulative

PC1 54.129515 54.12951

PC2 19.951219 74.08073

PC3 11.660349 85.74108

PC4 3.723758 89.46484

PC5 2.531138 91.99598

The *a priori* probabilities that each specimen has of belonging to each species

*V. paranaensis* *V. vellutinus*

0.1774194 0.8225806

## Capítulo IV

### **A evolução de uma linhagem de aranhas Theraphosinae e as relações entre espécies de *Vitalius*: uma visão filogenômica**

#### **Resumo**

Theraphosinae é a subfamília mais diversa de aranhas Theraphosidae, mas a história evolutiva de suas espécies ainda é incerta. Este problema é comum em grupos taxonômicos de morfologia homoplástica, com hipóteses cladísticas baseadas em caracteres taxonômicos discretos inconsistentes e na descrição constante de novos táxons sem a apresentação de um contexto filogenético. Além disso, são poucos os estudos que buscam recuperar as relações internas das espécies da subfamília. Durante a última década, alguns estudos têm utilizado análises moleculares para propor novas hipóteses filogenéticas para aranhas, algumas delas utilizando a captura de sequência de elementos ultraconservados (UCEs, na singla em inglês). Desse modo, este estudo propõe uma análise filogenômica utilizando UCEs para alguns gêneros Theraphosinae, testando a monofilia de *Vitalius* Lucas, Silva & Bertani, 1993. As espécies utilizadas neste estudo foram resultantes de coletas de diferentes expedições pelo Brasil, o que possibilitou a criação de um conjunto de dados formado por elementos ultraconservados. Os resultados indicam que a linhagem de aranhas Theraphosinae com quilhas retrolateral e subapical é monofilética, e que *Vitalius* não é monofilético. Este trabalho permite o reconhecimento de caracteres morfológicos importantes para os gêneros do grupo, resultando em uma nova hipótese filogenética que poderá ser utilizada para estudos futuros.

Palavras-chave: Mygalomorphae, Theraphosidae, filogenômica, NGS

## 1. Introdução

Mygalomorphae é atualmente dividida em 31 famílias (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), sendo que Theraphosidae é a mais diversa em espécies (WSC, 2021). Segundo as hipóteses filogenéticas morfológica de Guadanucci (2014) e a molecular de Foley et al. (2019), a subfamília Theraphosinae, constituída por gêneros neotropicais, apresenta o maior número de espécies (WSC, 2021). A história evolutiva dos gêneros de Theraphosinae é resumida em poucas hipóteses cladísticas, todas baseadas em caracteres morfológicos discretos (PÉREZ-MILES et al., 1996; BERTANI, 2001; BERTANI, et al., 2011; BERTANI & GUADANUCCI, 2013; PERAFÁN et al., 2015, GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018; PERAFÁN & VALENCIA-CUELLAR, 2018). O uso deste tipo de caracteres pode ser um problema, uma vez que essas aranhas possuem morfologia complexa e homogênea, resultando em alta quantidade de homoplasias (RAVEN, 1985).

Vários táxons de Theraphosinae são constantemente descritos sem um contexto filogenético, tornando as hipóteses aceitas defasadas (*e.g.* BERTANI et al., 2012; BERTANI & LEAL, 2016; GARGIULO et al., 2018). Um exemplo prático desse problema é o gênero *Vitalius*, que atualmente é constituído por dez espécies, mas sua relação filogenética foi testada em apenas nove, onde a maioria delas surgem polifiléticas e conseqüentemente sem um contexto evolutivo bem definido (BERTANI, 2001; BERTANI et al., 2011; GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018; PERAFÁN & VALENCIA-CUELLAR, 2018). Outro exemplo é *Pterinopelma sazimai* Fukushima, Nagahama & Bertani, 2011, que possui semelhança morfológica com espécies dos gêneros *Vitalius*, *Nhandu* Lucas, 1983 e *Lasiadora* C. L. Koch, 1850. Usando caracteres morfológicos discretos, Galleti-Lima & Guadanucci (2018) propuseram que *P. sazimai* está relacionado com os gêneros *Nhandu* e *Vitalius* e distantes das demais espécies de *Pterinopelma* Pocock, 1901.

Nas últimas décadas, muitos estudos têm tentado contornar a problemática taxonômica de Mygalomorphae, gerando hipóteses evolutivas baseadas em dados moleculares

(HENDRIXSON & BOND, 2005; HENDRIXSON & BOND, 2006; 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; LÜDDECKE et al., 2018; HEDIN et al., 2019; OPATOVA et al., 2020; FOYLEY et al.; 2019; 2020; 2021). Recentemente, abordagens filogenômicas vem ganhando espaço em diversos ramos da biologia evolutiva, com destaque para a metodologia filogenômica de Elementos Ultraconservados (UCEs) (FAIRCLOTH et al., 2012).

A realização de análises filogenômicas utilizando Elementos Ultraconservados (Ultraconserved Elements – UCEs, em inglês) é uma abordagem de enriquecimento de alvo que sequencia milhares de *loci* do genoma nuclear e tem sido bem-sucedida na resolução de relações evolutivas de grupos antigos e mais recentes, dentro de artrópodes e aracnídeos (FAIRCLOTH et al., 2012; BRANSTETTER et al., 2017; STARRETT et al., 2017; HEDIN et al., 2018; DERKARABETIAN et al., 2019; KULKARNI et al., 2020; XU et al., 2021). Esta técnica consiste em capturar sequências de regiões altamente conservadas de DNA que são compartilhadas entre táxons distantes filogeneticamente (BEJERANO et al., 2004; FAIRCLOTH et al., 2012; ZHANG et al., 2016). Kulkarni et al. (2019) projetou um conjunto de sondas de UCE específico de aranha, que vem funcionando bem para este tipo de estudo. Um aspecto único e importante deste tipo de metodologia é a capacidade de usar DNA de espécimes preservados em coleções de museus (YATES et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Estudos usando pele de pássaro (MCCOMARCK et al., 2016), insetos secos (BLAIMER et al. 2016) e aracnídeos (WOOD et al., 2018, DERKARABETIAN et al., 2019) produziram alguns resultados satisfatórios. O uso de UCEs tem contribuído para estudos filogenéticos, filogeográficos e populacionais em escalas de tempo mais profundas e rasas (ZHANG et al., 2019). Até agora, nenhum estudo usou essa metodologia molecular para reconstruir as posições evolutivas dos representantes de Mygalomorphae a nível de gênero e espécie. Com base nisso,

objetivamos propor uma nova hipótese filogenética para gêneros aranhas Theraphosinae, testando a monofilia da linhagem formada pelos gêneros que possuem quilhas retrolateral e subapical, por meio da captura de sequências de UCEs. Além disso, buscamos também testar a monofilia do gênero *Vitalius*, propondo mudanças taxonômicas para os grupos que forem recuperados como não-monofiléticos e estudar a evolução de caracteres morfológicos de gêneros de Theraphosinae pertencentes a esta linhagem que possuem quilhas retrolateral e subapical.

## 2. Material e métodos

### *Espécimes analisados*

Utilizamos um total de 85 terminais, sendo que dois pertencem à subfamília ‘Ischnocolinae’, utilizados para o enraizamento, e o restante à subfamília Theraphosinae, sendo que todos os gêneros descritos que possuem bulbo copulador com quilhas retrolateral e subapical foram amostrados. Os espécimes analisados foram resultantes de expedições científicas, tendo sido depositadas na Coleção Aracnológica de Diamantina - **CAD**, Unesp, Rio Claro, São Paulo – J. P. L. Guadanucci. As identificações dos espécimes foram baseadas em Bertani (2001), Bertani et al. (2011), Bertani et al. (2012) e Bertani & Leal (2016), que proporcionam descrições detalhadas para cada uma das espécies de *Vitalius* e representantes utilizados como grupo externo. A tabela com uma lista dos *vouchers* analisados neste estudo pode ser encontrada no Anexo I.

As estruturas morfológicas utilizadas para as discussões foram fotografadas através de câmera fotográfica Leica MC 170 *hd* embutida em um estereomicroscópio Leica M205C e software Leica *Application Suite* LAS V4.12. Os espécimes fotografados pertencem às seguintes coleções: **IBSP**, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil – A. D. Brescovit; **MCN**, Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil – R. Ott; **MCTP**, Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil – R. A. Teixeira; **MZSP**, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil – R. Pinto da Rocha.

### *Extração do DNA*

Para a extração de DNA dos músculos das pernas foi utilizado o *kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Valencia, CA). A quantificação se deu por de fluorômetro Qubit (Life Technologies, Inc.) e eram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a extração do DNA do espécime de *Pterinopelma felipeleitei* Bertani & Leal, 2016, a metodologia proposta por Derkarabetian et al. (2019) foi utilizada, pois este exemplar estava armazenado em álcool 70% em condições de temperatura da coleção há mais de 10 anos.

#### *Elementos Ultraconservados*

Para as montagens das bibliotecas de UCE, seguimos as metodologias de Starrett et al. (2017), Hedin et al. (2018), Derkarabetian et al. (2019) e Hedin et al. (2019). O DNA extraído passou por sonicação através de ultrassom Focalizado Covaris M220. O enriquecimento dos alvos foi realizado pelo conjunto de sonda 'específico para aranha' desenvolvido por Kulkarni et al. (2019), seguindo o protocolo proposto pelos próprios autores. Os sequenciamentos das bibliotecas foram realizados em Illumina HiSeq 2500.

A contagem dos *reads* foi realizada com o uso do *pipeline* Phyluce (FAIRCLOTH, 2016), disponível em <https://phyluce.readthedocs.io/en/latest/tutorials/index.html>. Para verificar a qualidade das bases e retirar os adaptadores foi utilizado o invólucro Illumiprocessor (FAIRCLOTH, 2013). Para a montagem dos dados (sequência consenso '*contigs*') utilizamos o SPades (BANKEVICH et al. 2012), ajustado na configuração padrão. Após esta etapa, realizamos a extração dos *loci* de UCEs e posteriormente os *contigs* foram agrupados aos pares através de sondas usando cobertura mínima e valores mínimos de identidade de 65. Os alinhamentos dos *loci* de UCEs foram realizados em dois programas. Inicialmente utilizamos o MAFFT (KATO & STANDLEY, 2013) implementado no Phyluce (FAIRCLOTH, 2016). Posteriormente, realizamos um novo alinhamento, fora do Phyluce, usando o programa MUSCLE (EDGAR, 2004). Nesta etapa, aplicamos o método de *Edge-trim*, através do Gblocks (CASTRESANA, 2000; TALAVERA & CASTRESANA, 2007), implementado no Phyluce (FAIRCLOTH, 2016). Após esse processo, os *loci* de UCEs passaram por uma limpeza para a

descoberta e remoção de sequências individuais mal alinhadas, usando o programa Spruceup (BOROWIEC, 2019), disponível em <https://github.com/marekborowiec/spruceup>. Para a montagem da matriz, utilizamos 50% da cobertura de táxon. Por fim, para rodar os dados alinhado na análise filogenética, foi criado um arquivo phylip concatenado.

### *Buscas das árvores*

A árvore foi criada a partir de análise de máxima verossimilhança, utilizando uma matriz concatenada através do *software* IQ-TREE 2 (MINH et al. 2020). Para estimar o suporte dos nós foi realizado um *ultrafast bootstrapping* com 1000 réplicas. As edições das árvores foram realizadas pelo *software* FigTree V. 1.4.4 (RAMBAUT, 2018). A topologia resultante teve seus terminais ordenados de forma crescente. Todas as etapas de extração do DNA e análises de bioinformática foram realizadas no laboratório de Sistemática e Filogenia de Artrópodes, da Universidade de Idaho, nos Estados Unidos, sob supervisão do Prof. Dr. Chris A. Hamilton.

### *Estudo dos caracteres morfológicos*

Após a resolução da topologia, caracteres morfológicos foram analisados, comparados e discutidos de acordo com os novos relacionamentos entre os grupos de Theraphosinae, os gêneros de aranhas com quilhas retrolateral e subapical e as espécies de *Vitalius*. Para o levantamento destes caracteres, nos baseamos em Pérez-Miles et al. (1996), Bertani (2000) e Bertani (2001).

## 3. Resultados

O cladograma resultante da análise de verossimilhança pode ser observado na figura 1. Analisando a posição evolutiva das subfamílias de Theraphosidae, os gêneros de Theraphosinae surgem divididos em dois grupos bem suportados, o primeiro formado por representantes dos gêneros *Grammostola* Simon, 1892, *Homoeomma* Auserrer, 1871, *Tmesiphantes* Simon, 1892, *Catanduba* Yamamoto, Lucas & Brescovit, 2012, *Plesiopelma* Pocock, 1901, *Cyriocosmus* Simon, 1903 e *Bumba* Pérez-Miles, Bonaldo & Miglio, 2014, já o segundo agrupa representantes

pertencentes aos gêneros *Sericopelma* Auserrer, 1875, *Stichoplastoris* Rudloff, 1997, *Aphonopelma* Pocock, 1901, *Cyrtopholis* Simon, 1892, *Acanthoscurria* Auserrer, 1871, *Proshapalopus* Mello-Leitão, 1923, *Eupalaestrus* Pocock, 1901, *Lasiadora* C. L. Koch, 1850, *Pterinopelma*, *Vitalius* e *Nhandu*. Neste grupo, os gêneros *Eupalaestrus*, *Vitalius*, *Pterinopelma* e *Proshapalopus* não foram recuperados como monofiléticos.

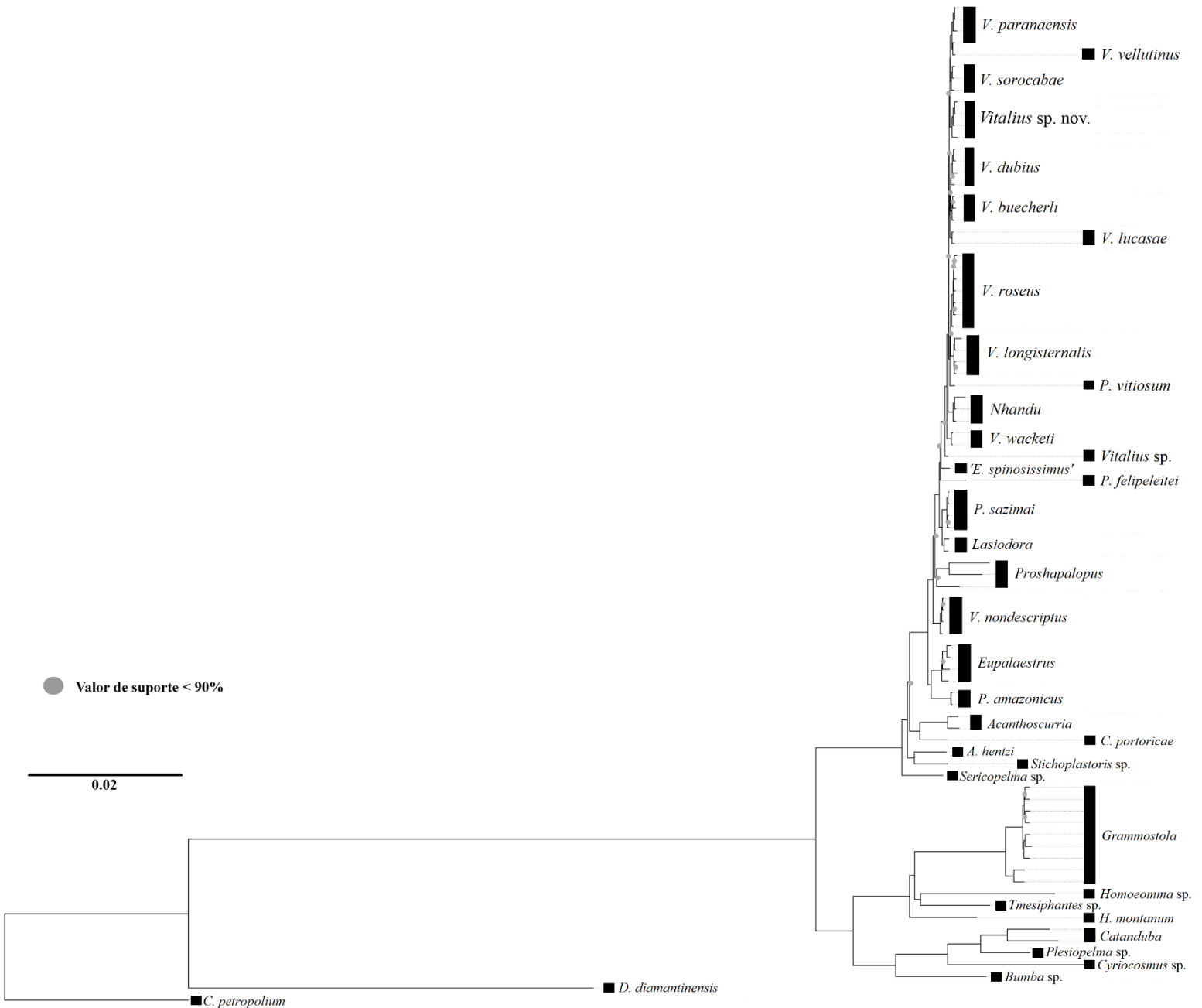


Figura 1. Cladograma resultante da análise de máxima verossimilhança com gêneros Theraphosinae usando UCEs.

### Cenários evolutivos de Theraphosinae

Observando a nossa topologia, foi possível identificar caracteres que vem sendo

utilizados como sinapomorfias morfológicas em diferentes filogenias de Theraphosinae (PÉREZ-MILES et al., 1996; BERTANI, 2001; PERAFÁN et al., 2016; GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018, FABIANO-DA-SILVA et al., 2020). Dentre os grupos, é possível observar os dois clados compostos por gêneros que possuem cerdas urticantes tipos III e IV (*Bumba*, *Cyriocosmus*, *Plesiopelma*, *Catanduba*, *Homoeomma*, *Tmesiphantes* e *Grammostola*) e os que possuem cerdas urticantes tipo I e III (*Sericopelma*, *Aphonopelma*, *Stichoplatoris*, *Cyrtopholis*, *Acanthoscurria*, *Eupalaestrus*, *Proshapalopus*, *Lasiadora*, *Pterinopelma*, *Nhandu* e *Vitalius*).

Em relação aos tipos de quilhas nos bulbos copuladores masculinos é possível notar que as quilhas prolaterais superior e inferior (PS e PI) surgem na base de Theraphosinae, sendo compartilhada por todos os gêneros (perdida em algumas espécies do gênero *Cyriocosmus*) e que a quilha apical (A) surge na base do grupo formado pelos gêneros com cerdas urticantes tipo I e III. O grupo formado pelos gêneros *Eupalaestrus*, *Proshapalopus*, *Lasiadora*, *Pterinopelma* e *Vitalius* surgiu agrupado e todos os representantes compartilham em sua morfologia a presença de uma quilha subapical (SA) (modificada em *Eupalaestrus* e perdida em *P. felipeleitei* e *E. spinosissimus*, ver discussão no tópico 4 deste capítulo) e quilha retrolateral (R) (Figura 2).

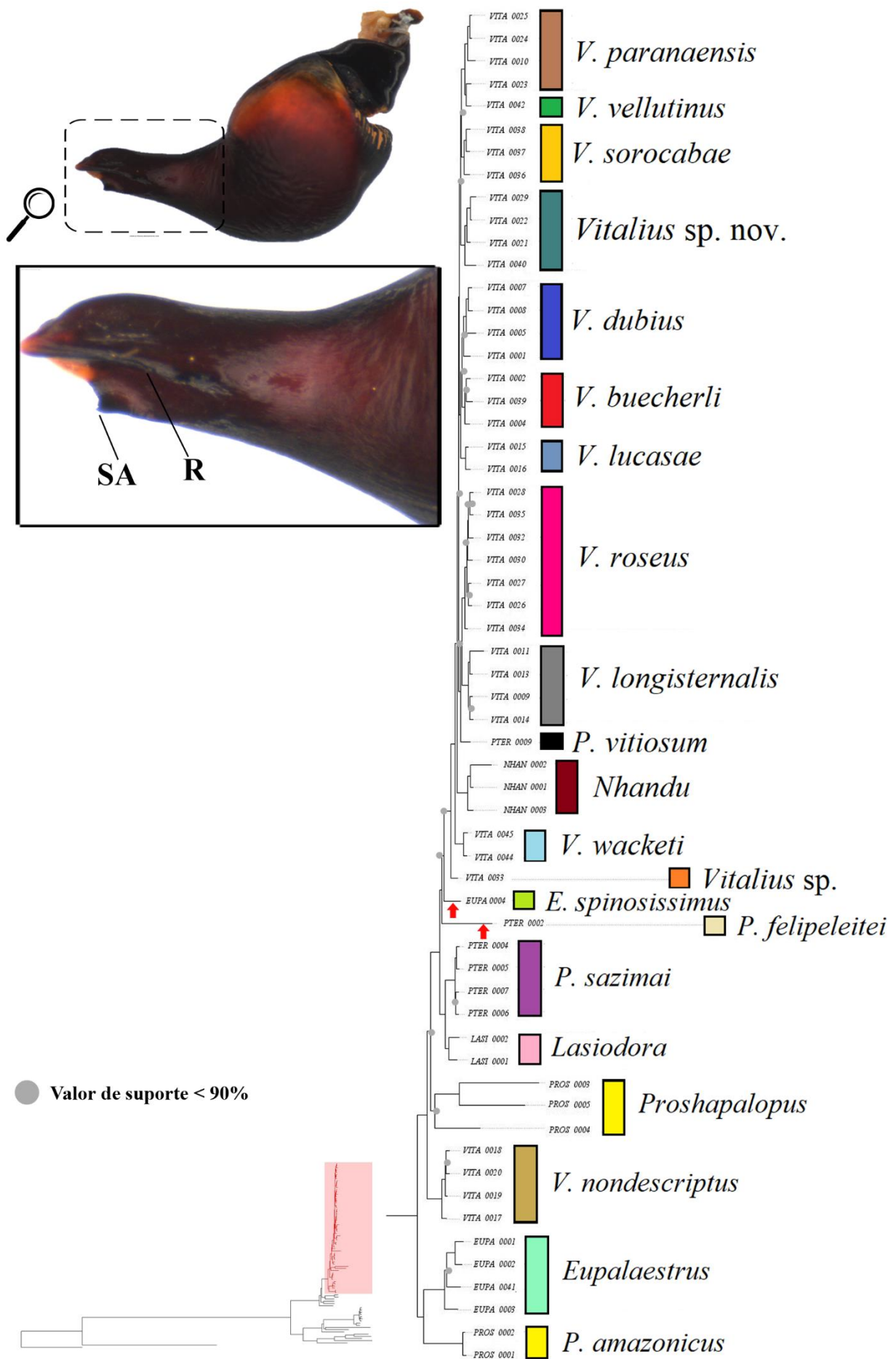


Figura 2. Topologia resultante da análise de máxima verossimilhança com destaque para a

linhagem de Theraphosinae dos gêneros que apresentam quilhas retrolateral e subapical. Bulbo representando a face retrolateral. SA – Quilha Subapical; R – Quilha Retrolateral. Setas vermelhas indicam a reversão do caráter quilha SA em *E. spinosissimus* e *P. felipeleitei*.

#### *Vitalius e as relações dos gêneros com quilha retrolateral e subapical*

As espécies do gênero *Eupalaestrus* (exceto *E. spinosissimus* Mello-Leitão, 1923, que foi recuperado distantes das outras) surgiram como grupo irmão da espécie *Proshapalopus amazonicus* Bertani, 2001, enquanto as outras espécies de *Proshapalopus* foram recuperadas relacionadas entre si.

*V. nondescriptus* (Mello-Leitão, 1926), que aqui foi incluído pela primeira vez em uma análise filogenética, aparece distante das outras espécies do gênero *Vitalius*.

O gênero *Lasiadora* e a espécie *P. sazimai* foram recuperados como grupo-irmãos. As outras espécies de *Pterinopelma*, também não surgiram agrupadas entre si, com *P. felipeleitei* constituindo um clado único e *P. vitiosum* (Keyserling, 1891), relacionada ao gênero *Nhandu* e o restante das espécies de *Vitalius*.

Neste grupo, a espécie *V. wacketi* (Mello-Leitão, 1923) surge posicionada como grupo irmão a *Nhandu*, *P. vitiosum* e as demais espécies de *Vitalius* (exceto *V. nondescriptus*). Por outro lado, o gênero *Nhandu*, recuperado monofilético, surge como grupo irmão de (*P. vitiosum* (*V. longisternalis* Bertani, 2001 + *V. roseus* (Mello-Leitão, 1923)) e outro grupo constituído pelas espécies *V. lucasae* Bertani, 2001 irmã de *V. buecherli* Bertani 2001 + *V. dubius*, *Vitalius* sp. nov., *V. paranaensis* Bertani, 2001, *V. vellutinus* (Mello-Leitão, 1923) e *V. sorocabae*. A espécie *V. paranaensis* surgiu relacionada a único exemplar, a princípio, da espécie *V. vellutinus* e finalmente, *V. sorocabae* sendo recuperado como espécie-irmã de *V. paranaensis* + *V. vellutinus*.

#### 4. Discussão

##### *A evolução de caracteres morfológicos*

A filogenia apresentada neste estudo possibilitou um entendimento dos relacionamentos evolutivos mais bem definidos de alguns gêneros de Theraphosinae, comparada à filogenias baseadas em caracteres morfológicos (PÉREZ-MILES et al. 1996; BERTANI, 2001; BERTANI

et al 2011; GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018; PERAFÁN & VALENCIA-CUELLAR, 2018). De acordo com a hipótese morfológica de Pérez-Miles et al. (1996), a subfamília Theraphosinae pode ser dividida em dois grandes grupos, um com cerdas urticantes tipo I e III e o outro com cerdas urticantes tipo III e IV. Neste trabalho abrimos discussão sobre a monofilia destes grupos, apesar de não serem totalmente amostrados. Vale notar que um dos caracteres morfológicos sinapomórficos de *Vitalius* (ausência de cerda urticante tipo III nas fêmeas) surgiu homoplástico (*P. amazonicus*, *P. felipeleitei*, *E. spinosissimus*, *P. vitiosum* e *Vitalius* ssp.).

As quilhas do bulbo masculino vem ganhando atenção desde 2000, quando Bertani codificou estes caracteres em uma matriz morfológica formada por alguns gêneros da subfamília. Segundo Bertani (2000), as quilha PS e PI aparecem na base de Theraphosinae (sendo perdidas em alguns gêneros). O autor destaca também o surgimento da quilha apical nos gêneros com cerdas urticantes tipo I e III. Em seu trabalho de revisão do gênero *Vitalius*, Bertani (2001) sugeriu como sinapomorfia do clado formado pelos gêneros *Eupalaestrus*, *Lasiadora*, *Proshapalopus*, *Nhandu* e *Vitalius*, a presença de quilha retrolateral e um êmbulo com ápice ligeiramente achatado na lateral, com face retrolateral levemente côncava abaixo e acima da quilha retrolateral. Além disso, o autor aponta que *Lasiadora*, *Proshapalopus*, *Nhandu* e *Vitalius* são relacionados pela presença de uma quilha subapical e machos com metatarso I que toca o ramo retrolateral da apófise tibial quando flexionado (exceto para algumas espécies de *Vitalius*). Aqui corroboramos esta hipótese morfológica, porém com os gêneros *Eupalaestrus*, *Proshapalopus*, *Pterinopelma* e *Vitalius* não recuperados como monofiléticos.

#### *O não-monofiletismo de Eupalaestrus, Proshapalopus e Pterinopelma.*

Em 2011, Bertani e colaboradores revalidaram o gênero *Pterinopelma* e incluíram duas espécies na matriz morfológica proposta em 2001. Este gênero surgiu posicionado junto aos indivíduos com quilha subapical. Entretanto, em 2018, Galleti-Lima & Guadanucci recuperaram *P. sazimai* distante das outras espécies do gênero. Aqui, *P. sazimai* surgiu como grupo-irmão de *Lasiadora*. Estes táxons apresentam semelhanças morfológicas na forma da apófise tibial, forma do bulbo copulador, quilha subapical fortemente pronunciada, flexão do metatarso I sobre o ramo

retrolateral da apófise tibial e comportamento agressivo (observação pessoal) (figuras 3-4). Apesar de compartilharem estes mesmos caracteres morfológicos, *P. sazimai* não possui cerdas estridulatórias nas coxas, caráter sinapomórfico para *Lasiadora* (Pérez-Miles et al. 1996; Bertani, 2001; Bertani et al., 2011; Galleti-Lima & Guadanucci, 2018; Perafán & Valencia-Cuellar, 2018), que inclusive apresenta uma variedade única desta cerda, de acordo com Galleti-Lima & Guadanucci, 2018 e Galleti-Lima & Guadanucci, 2019.

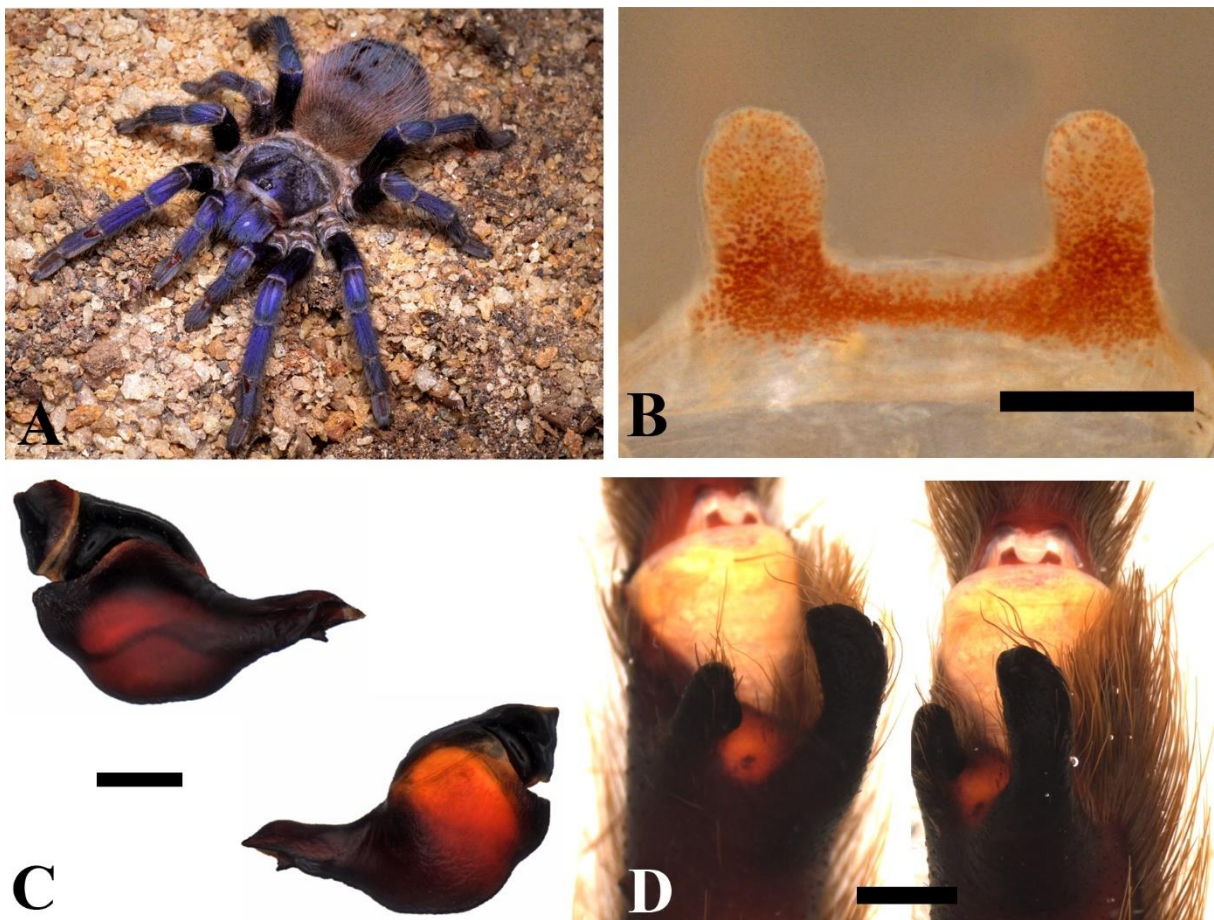


Figura 3. *Pterinopelma sazimai*. A. fêmea em vida (Foto: W. Moeller). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

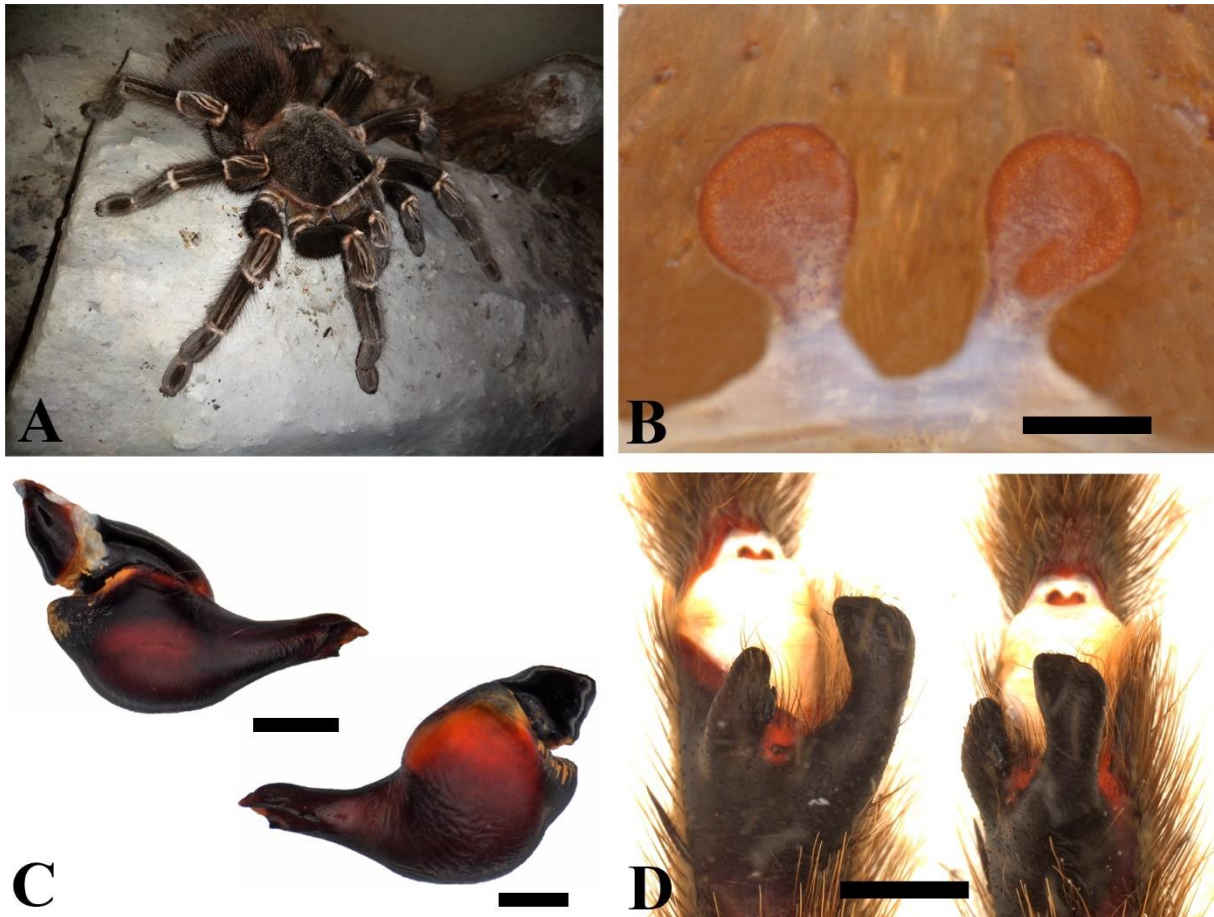


Figura 4. *Lasiodora* sp. A. Fêmea em vida. B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

O fato de *Eupalaestrus* ser recuperado como grupo irmão de *P. amazonicus*, é corroborado pela morfologia destes táxons, que apresentam fêmeas com tíbia da perna IV engrossada (figuras 5-6). Entretanto, esse relacionamento gera questionamento sobre o monofiletismo do grupo de quilha subapical. Uma das sinapomorfias de *Eupalaestrus* é a presença de quilha subapical denticulada (figura 5, C), que é morfologicamente distinta das demais quilhas subapicais compartilhadas pelos outros gêneros. Bertani (2000; 2001) já discutia sobre a quilha denticulada de *Eupalaestrus* ser homóloga à quilha subapical de *Lasiodora*, *Proshapalopus*, *Nhandu* e *Vitalius*, o que nos leva a assumir este mesmo pensamento. Já *P. amazonicus*, que outrora pertencia ao gênero *Eupalaestrus* (LUCAS et al., 1993), apresenta caracteres muito diferentes das outras espécies de *Proshapalopus* (figuras 7-8). Dentre as diferenças pode-se destacar a forma do bulbo com uma protuberância na região ventral (que a

diferencia de *P. anomalus*), flexão do metatarso I tocando o ápice do ramo retrolateral (que a diferencia de *P. multicuspidatus*) e tibia IV engrossada, compartilhando com estas outras espécies do gênero apenas a presença de quilha acessória. Além disso, *P. amazonicus* sempre surgiu posicionado como espécie-irmã de *P. multicuspidatus* + *P. anomalus* em outras filogenias morfológicas (BERTANI, 2001; GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018; PERAFÁN & VALENCIA-CUELLAR, 2018).



Figura 5. *Eupalaestrus campestratus*. A. Fêmea em vida (Foto: L.M. Borges). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figuras D = 2 milímetros. Seta preta indicando tibia IV engrossada.

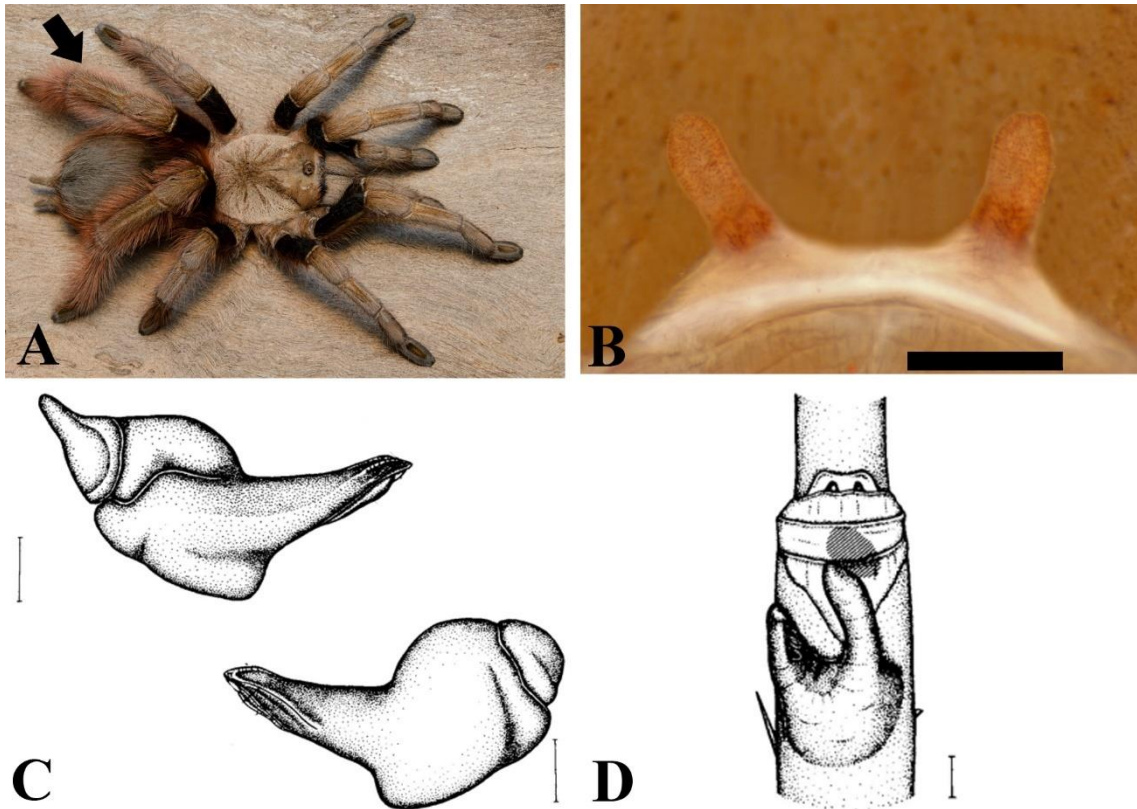


Figura 6. *Proshapalopus amazonicus*. A. Fêmea em vida (Foto: L.M. Borges). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo. Escalas = 1 milímetro. Fotos C e D retiradas de Bertani (2001). Seta preta indicando tibia IV engrossada.

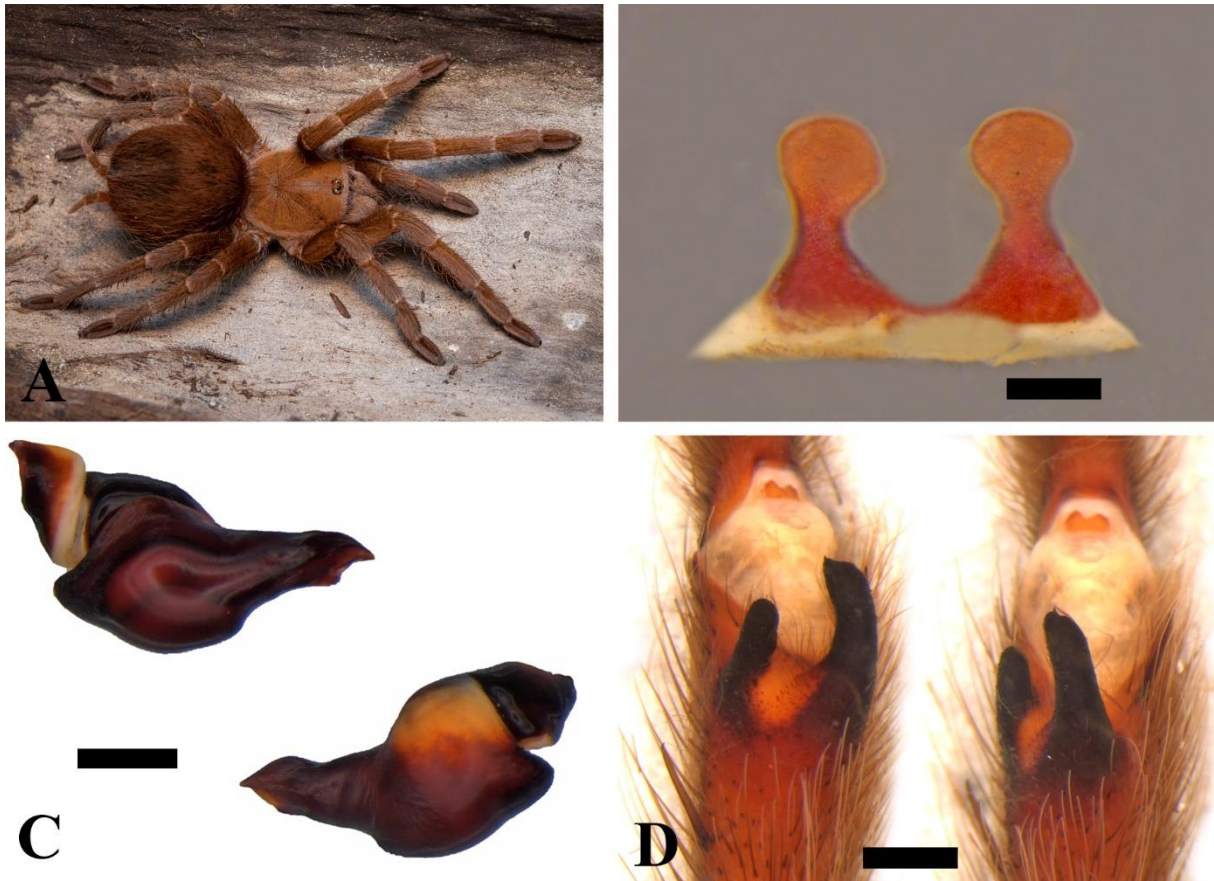


Figura 7. *Proshapalopus anomalus*. A. Fêmea em vida (Foto: L.M. Borges). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino de *P. anomalus*. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

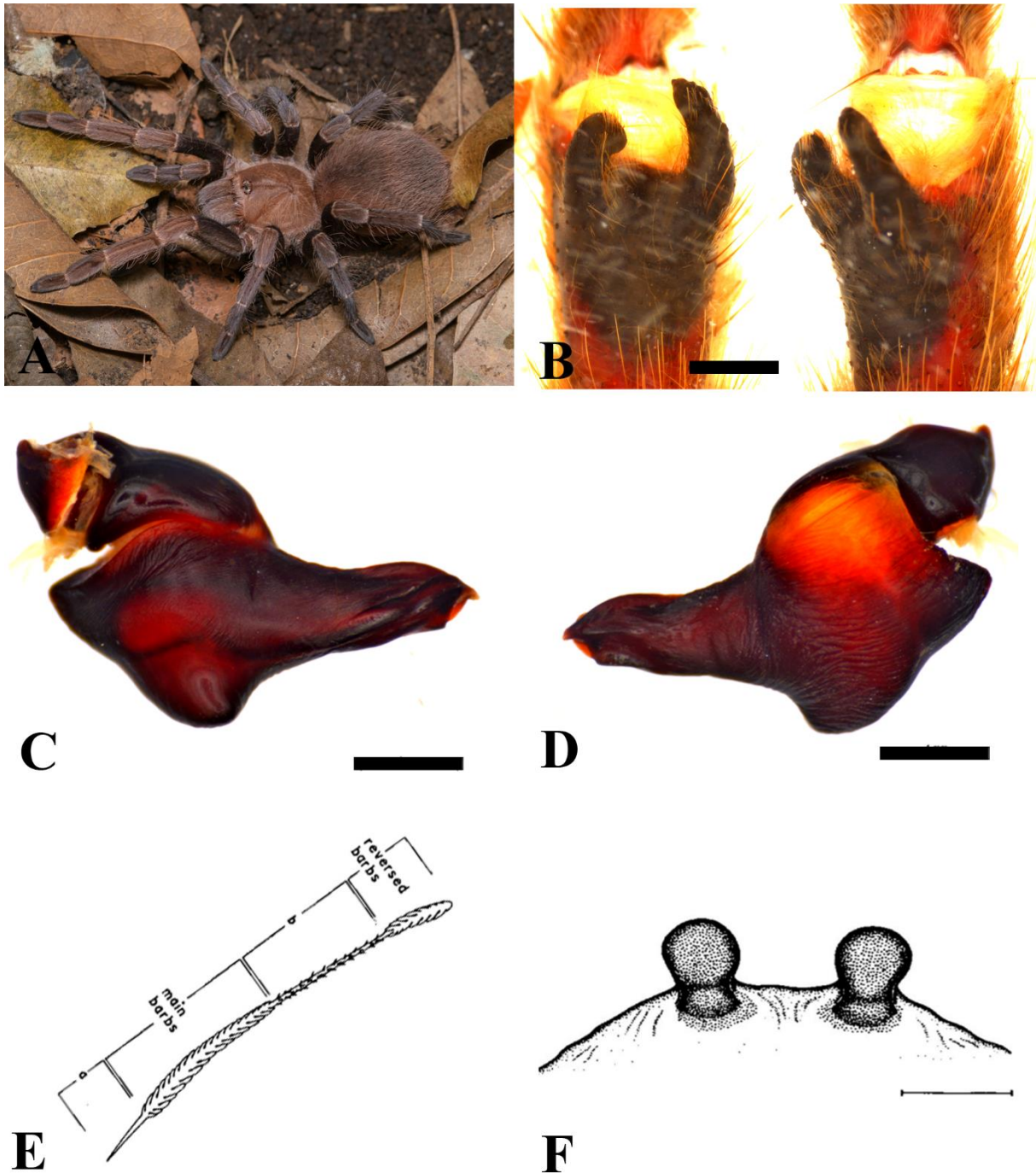


Figura 8. *Proshapalopus multicuspidatus*. A. Fêmea em vida (Foto: W. Moeller). B. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. C. Faces prolateral do bulbo copulador masculino. D. Faces retrolateral do bulbo copulador masculino. E. Cerda urticante tipo I da fêmea (retirado de Bertani, 2001). F. Espermateca da fêmea (retirado de Bertani, 2001). Escalas: figura B = 2 milímetros; figura D- E = 1 milímetro.

A espécie *E. spinosissimus* (Figura 9), recuperada aqui distante da espécie-tipo do gênero, *E. campestratus*, é conhecida apenas pela presença de uma fêmea descrita (BERTANI, 2001). Bertani (2001) alocou esta espécie neste gênero pelo fato de as fêmeas possuírem tibia e

metatarso engrossados. Entretanto, ela nunca havia sido codificada em uma matriz filogenética até o momento. Em sua dissertação de mestrado não publicada, que visou a revisão do gênero *Eupalaestrus*, Borges (2019) propõe a criação de um novo gênero, baseado na descrição adicional de um macho de *E. spinosissimus*. Em suas hipóteses filogenéticas, Borges (2019) recupera o novo gênero relacionado a *Lasiadora* e as espécies *P. vitiosum* e *P. felipeleitei*.

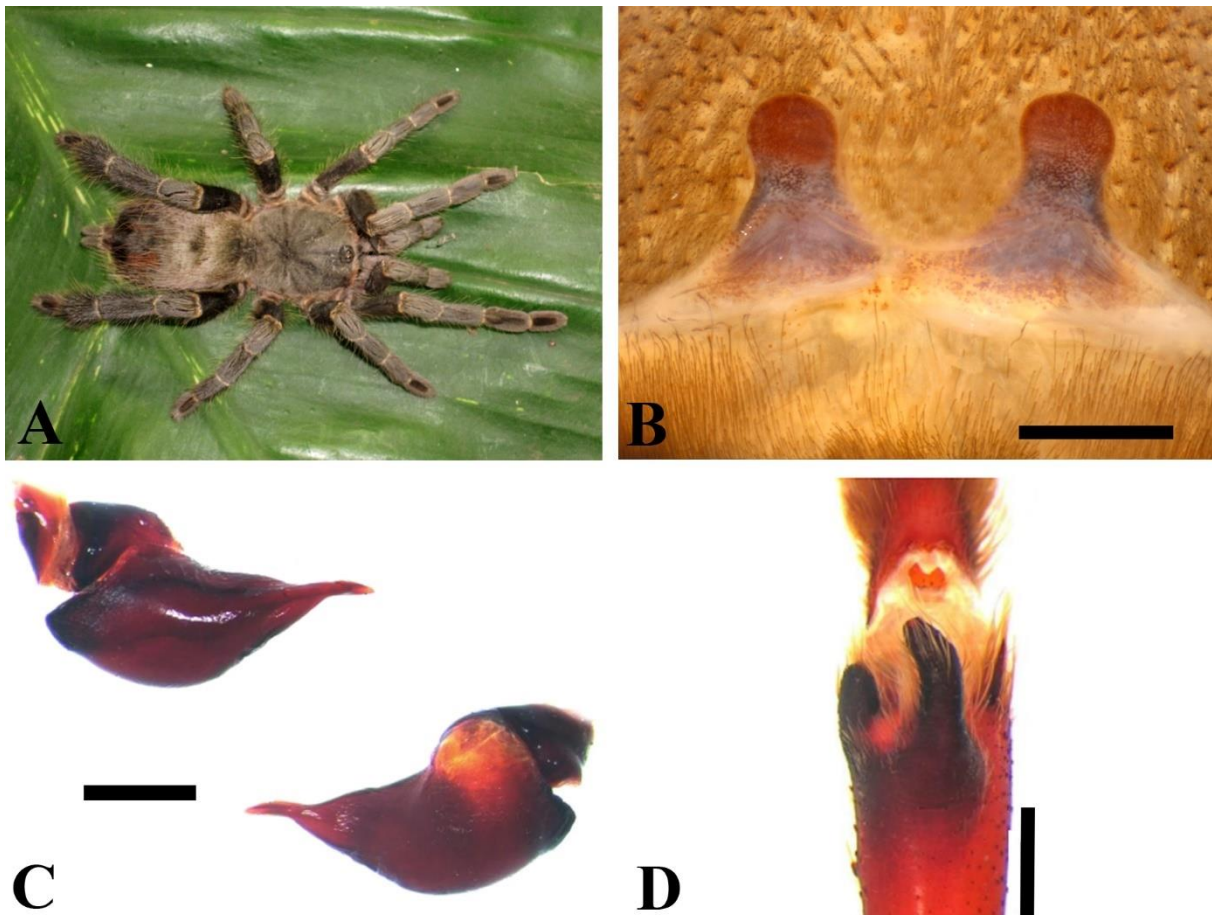


Figura 9. *Eupalaestrus spinosissimus*. A. Fêmea em vida (Foto: J.P.L. Guadanucci). B. Espermateca da fêmea (Foto: L.M. Borges). C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino (Foto: L.M. Borges). D. Apófise tibial esquerdo (Foto: L.M. Borges). Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros. figuras B-D retiradas de Borges (2019).

Os posicionamentos de *E. spinosissimus*, bem como *P. felipeleitei* (Figura 10) e uma fêmea identificada como *Vitalius* (VITA 0033) surgiram relacionadas. Acreditamos que *E. spinosissimus* tenha de fato alguma relação com *P. felipeleitei* devido às espécies apresentarem bulbo copulador masculino com quilhas reduzidas e um êmbulo encurtado (figuras 9-C e 10-C). Além disso, as fêmeas destes três táxons se assemelham por não possuírem cerdas urticantes tipo

### III.

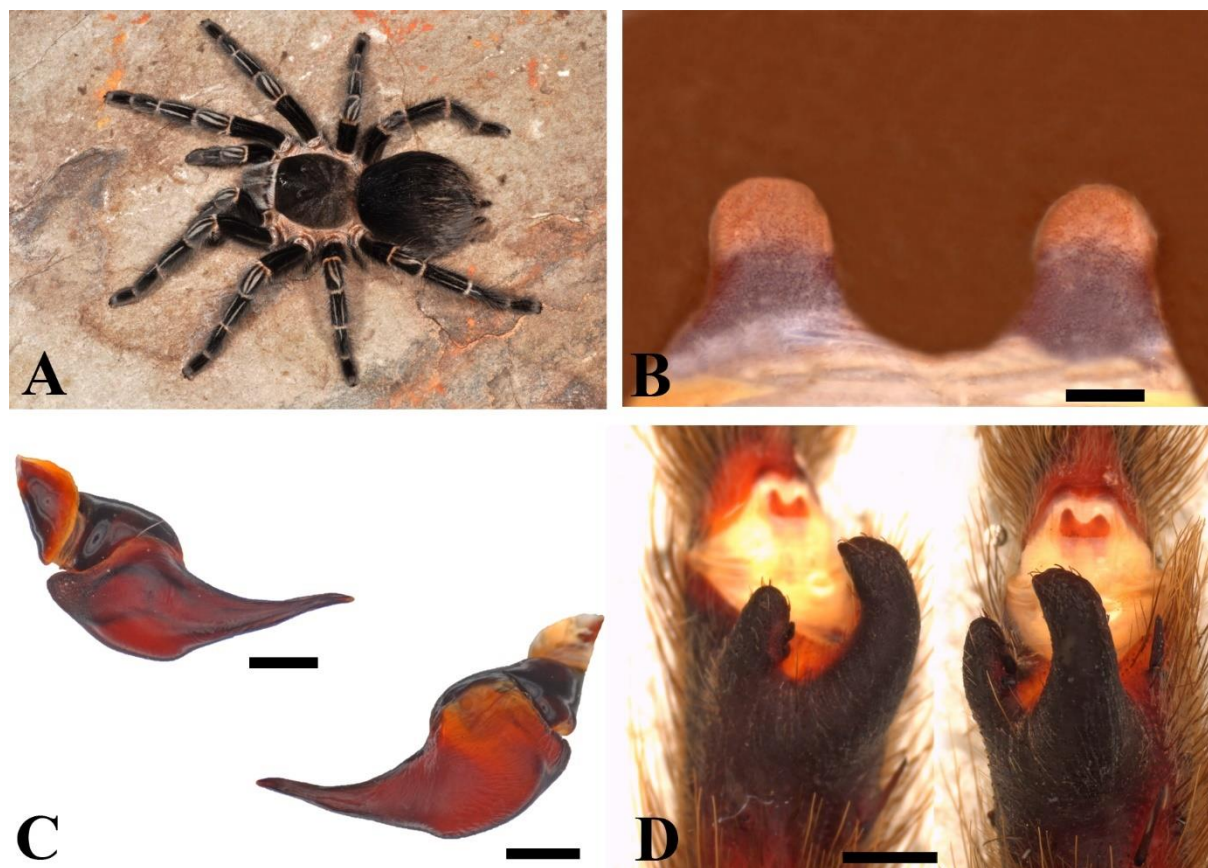


Figura 10. *Pterinopelma felipeleitei*. A. Fêmea em vida (Foto: P.H. Martins). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

#### *P. vitiosum* e os gêneros *Vitalius* e *Nhandu*

A espécie *V. nondescriptus*, nunca havia sido incluída em um estudo filogenético até então (BERTANI, 2001; BERTANI et al., 2011; BERTANI et al., 2012; GALLETI-LIMA & GUADANUCCI, 2018). Neste trabalho, além de esclarecermos o relacionamento com as demais espécies, apontamos o posicionamento mais próximo a base do clado das caranguejeiras com quilhas SA e R. Sua morfologia apresenta diferenças únicas que corroboram o clado como diferente das demais espécies de *Vitalius*. A presença de quilha subapical mais curta, ramos da apófise tibial mais delgados, ramo retrolateral da apófise tibial quase que reto, fêmeas com cerdas urticantes tipo I morfologicamente diferentes e tufo de cerdas marrons no metatarso da perna IV são utilizadas como um caráter diagnóstico para o táxon (figura 11).

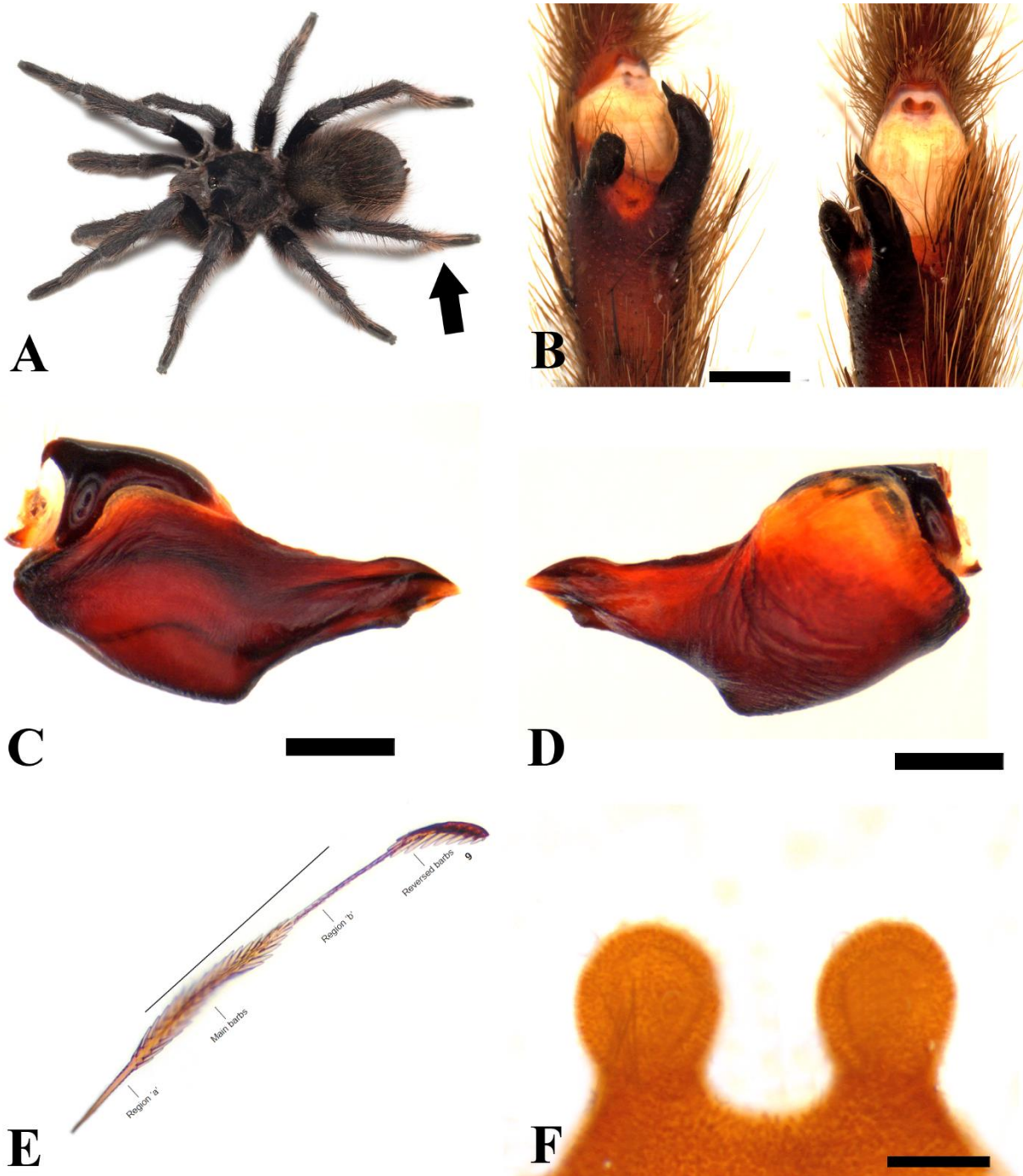


Figura 11. *Vitalius nondescriptus*. A. Macho em vida (Foto: W. Moeller). B. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. C. Faces prolateral do bulbo copulador masculino. D. Faces retrolateral do bulbo copulador masculino. E. Cerda urticante tipo I da fêmea (retirado de Bertani et al., 2012). F. Espermateca da fêmea Escalas. figuras B = 2 milímetros; figura C - F = 1 milímetro. Setas pretas indicando tufo de cerdas marrons no metatarso IV.

*V. wacketi* (figura 12), táxon que surgiu como grupo-irmão do grupo constituído pelo restante das espécies de *Vitalius*, *P. vitiosum* e *Nhandu*, apresenta morfologia dos órgãos sexuais

masculinos altamente diferenciada (apófise tibial com ramos engrossados, bulbo copulador com êmbulo comprido e quilhas fortemente pronunciadas) e que parece não ser compartilhada com os outros táxons. Outro fato que traz atenção para o grupo é a distribuição restrita apenas à Serra do Mar.

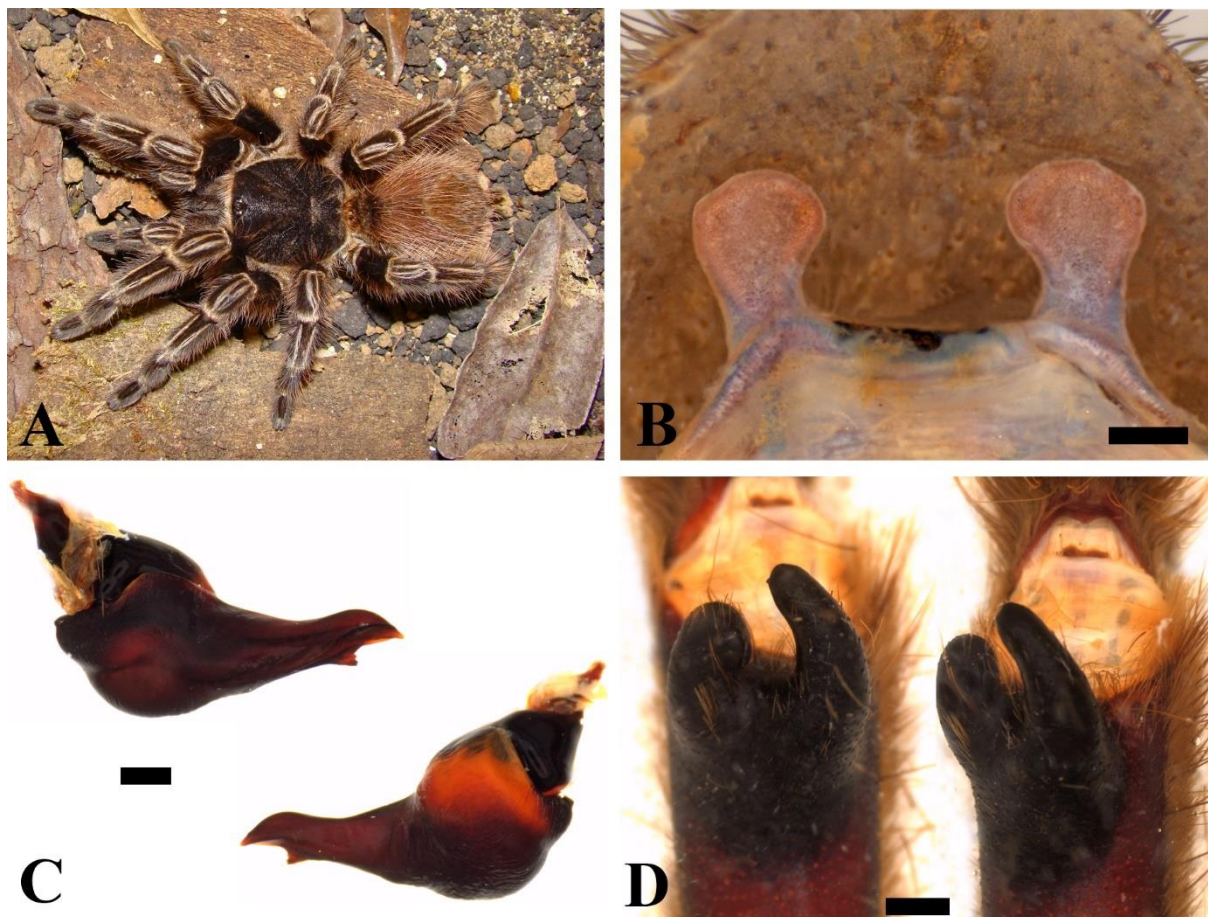


Figura 12. *Vitalius wacketi*. A. fêmea em vida (Foto: R.P. Indicatti). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

O monofiletismo de *Nhandu* é corroborado aqui, uma vez que clado apresentou um alto valor de suporte, além de possuir espécies com morfologia diferente dos outros grupos, como presença de longas cerdas na borda da carapaça, forma do bulbo copulador mais robusta, êmbulo do bulbo mais curto, quilhas do bulbo fortemente pronunciadas e presença de cerdas urticantes tipo III nas fêmeas (figura 13).

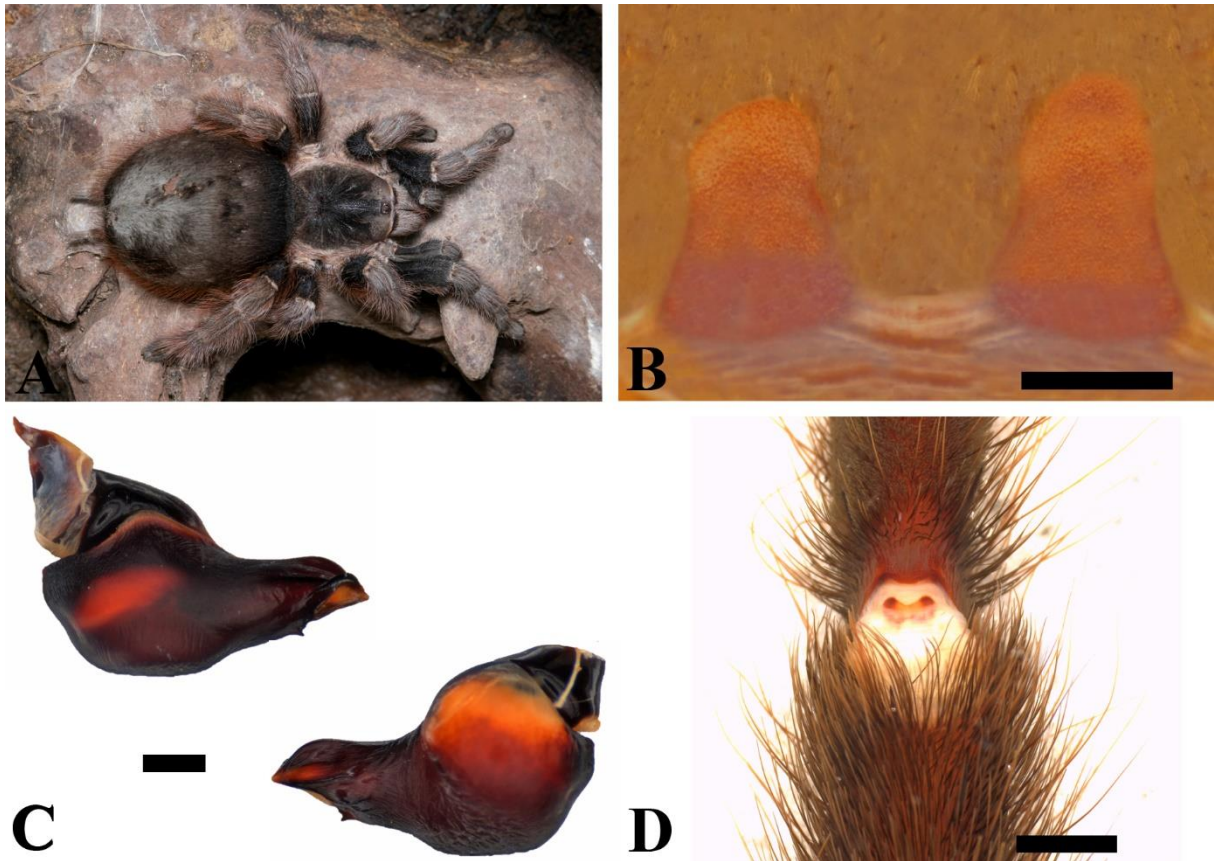


Figura 13. *Nhandu carapoensis*. A. fêmea em vida (Foto: W. Moeller). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Tíbia esquerda (ausência de apófise tibial). Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; Figura D = 2 milímetros.

A topologia resultou no monofiletismo de *P. vitiosum* irmã de *V. longisternalis* + *V. roseus*. Morfologicamente, estas espécies compartilham os seguintes caracteres morfológicos (Figuras 14-16): apófise tibial posicionado na face retrolateral da tíbia, metatarso I tocando lateralmente o ramo prolateral da apófise tibial, forma do êmbulo mais longa e fina (exceto em *V. roseus*). Além disso observamos variações populacionais de *V. roseus* com esterno mais longo do que largo, tornando esses indivíduos morfológicamente semelhantes à espécie *V. longisternalis* (ver resultados e discussão sobre morfometria geométrica do Capítulo I).

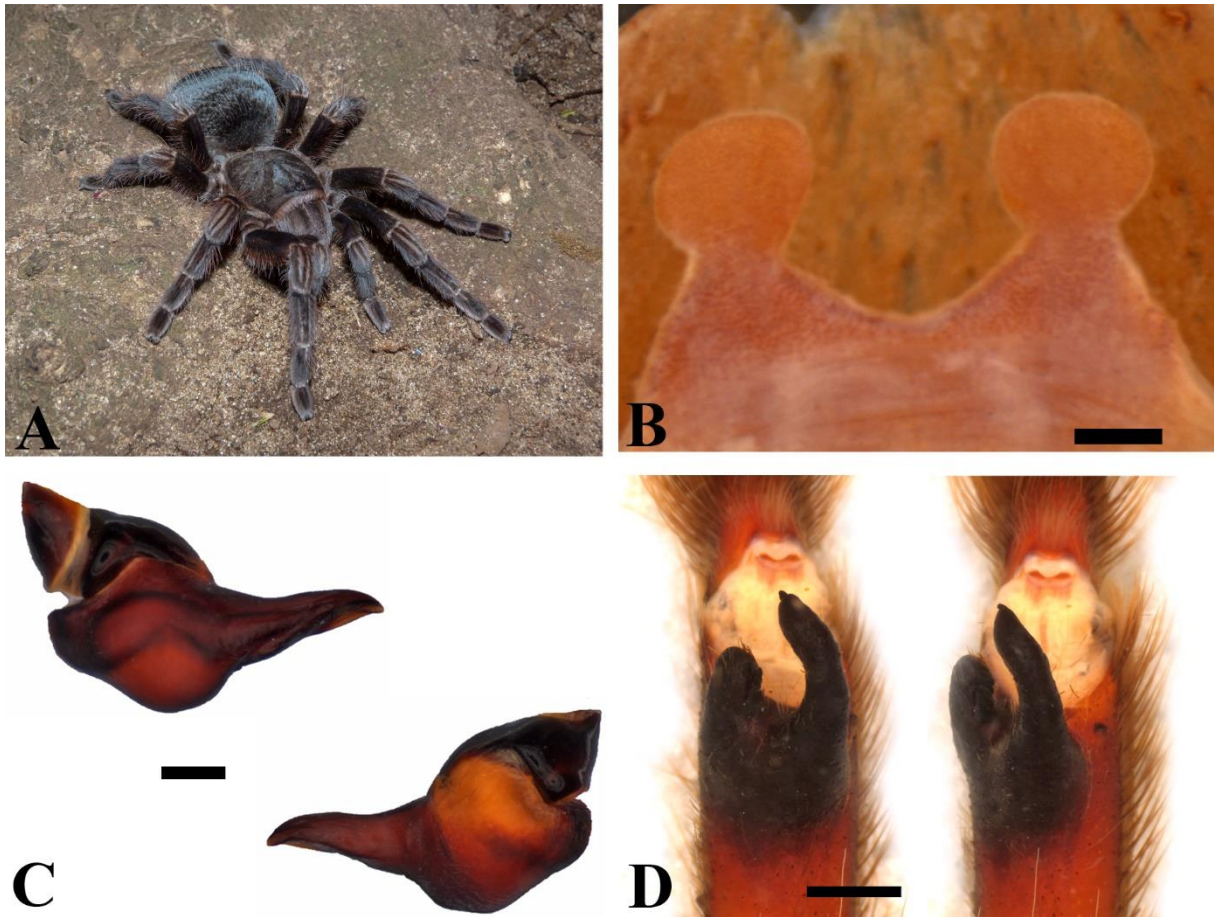


Figura 14. *Pterinopelma vitiosum*. A. Fêmea em vida (Foto: L.M. Borges). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Tíbia esquerda e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figuras D = 2 milímetros.

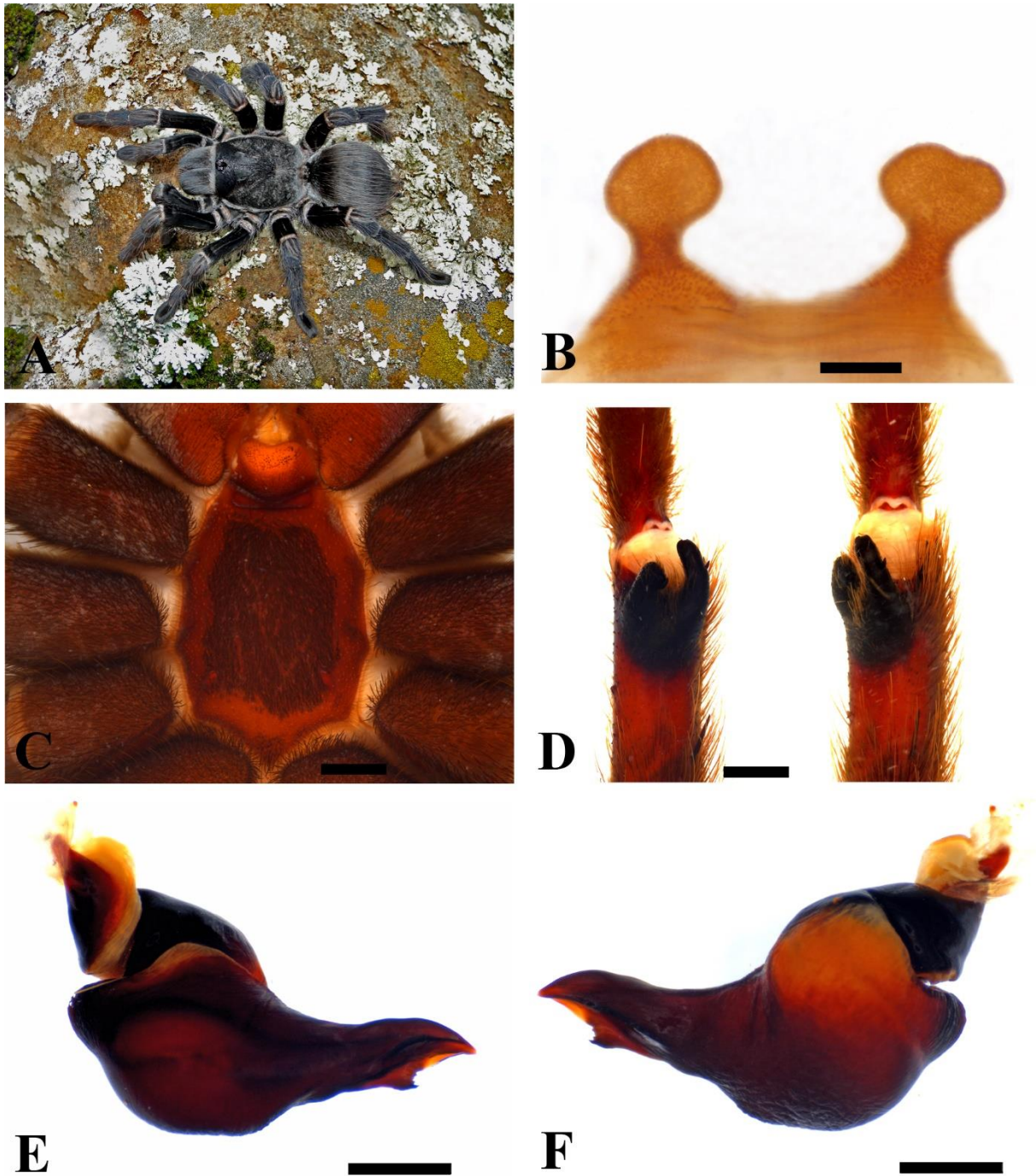


Figura 15. *Vitalius longisternalis*. A. Fêmea em vida (Foto: R.P. Indicatti). B. Espermateca da fêmea. C. Esterno (vista ventral). D. Tíbia esquerda e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. E. Face prolateral do bulbo copulador masculino. F. Face retrolateral do bulbo copulador masculino. Escalas: figuras B, F e G = 1 milímetro; figuras C e D = 2 milímetros.



Figura 16. *Vitalius roseus*. A. Fêmea em vida (Foto: L.M. Borges). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Tíbia esquerda e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

As espécies *V. buecherli* e *V. dubius* surgem aqui como irmãs, corroborando a hipótese cladística baseada em caracteres morfológicos proposta por Bertani (2001). Bertani (2001) discute que a morfologia altamente semelhante do bulbo copulador destas espécies é a sinapomorfia que une os dois táxons (figuras 17-18). Já *V. lucasae* (figura 19), compartilha tamanhos corporais e coloração semelhantes com *V. buecherli*, além de ambas possuírem uma apófise masculina posicionada em uma região mais centralizada na tíbia.

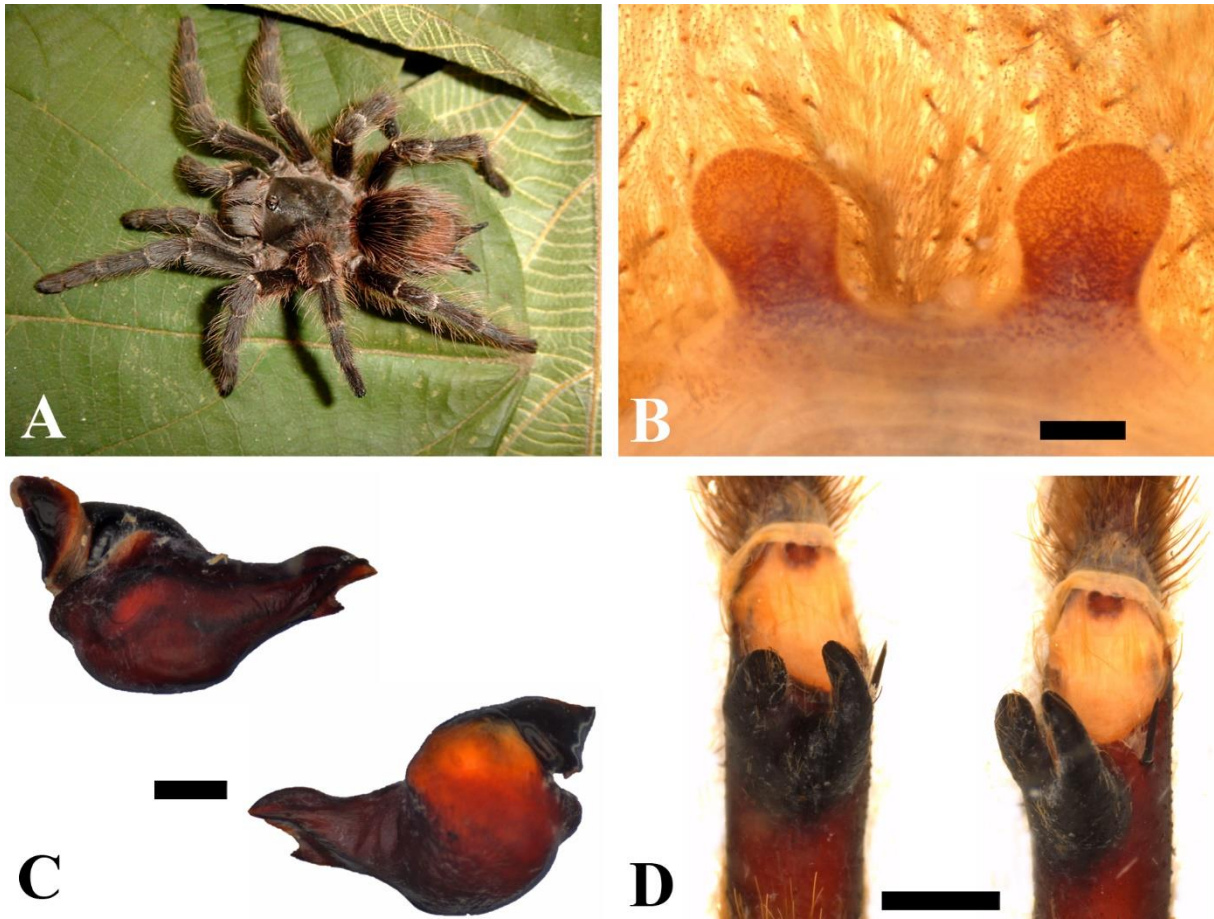


Figura 17. *Vitalius buecherli*. A. fêmea em vida (Foto: R.P. Indicatti). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

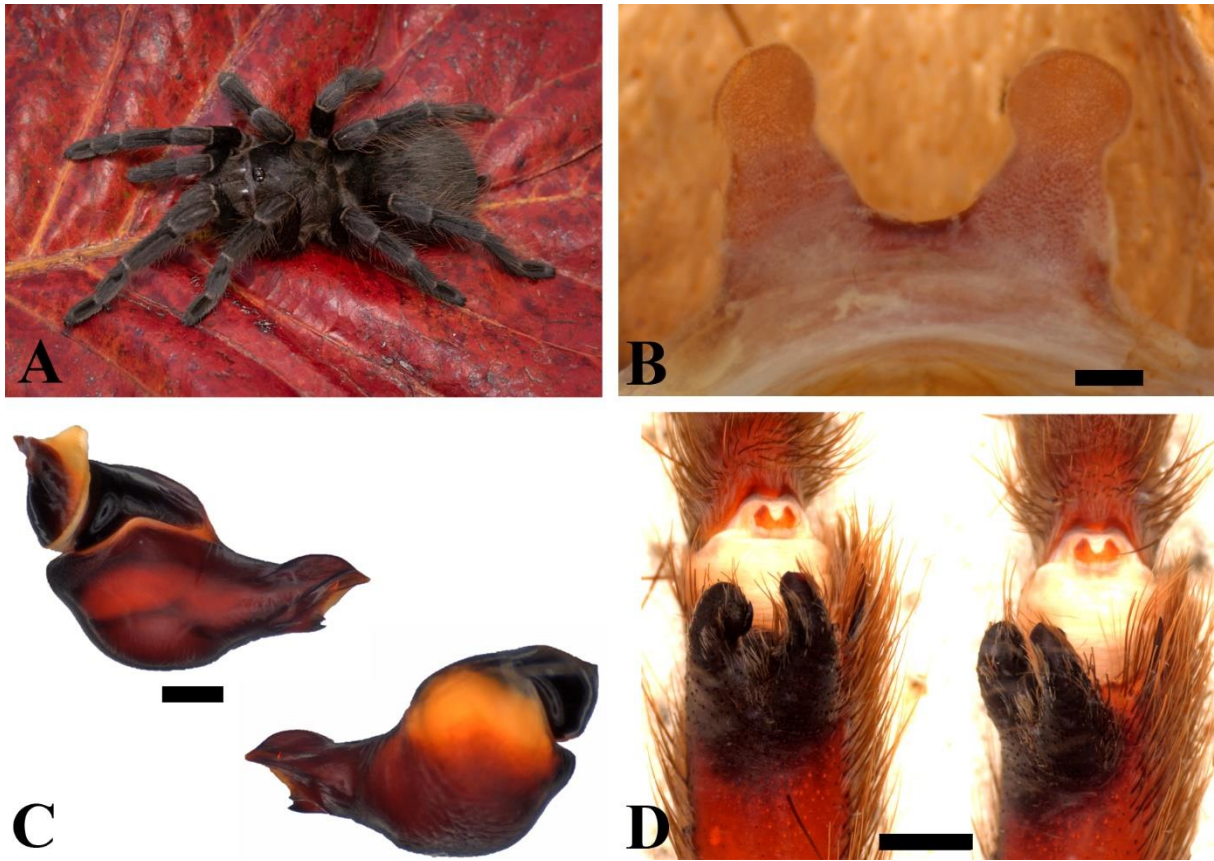


Figura 18. *Vitalius dubius*. A. fêmea em vida (Foto: W. Moeller). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

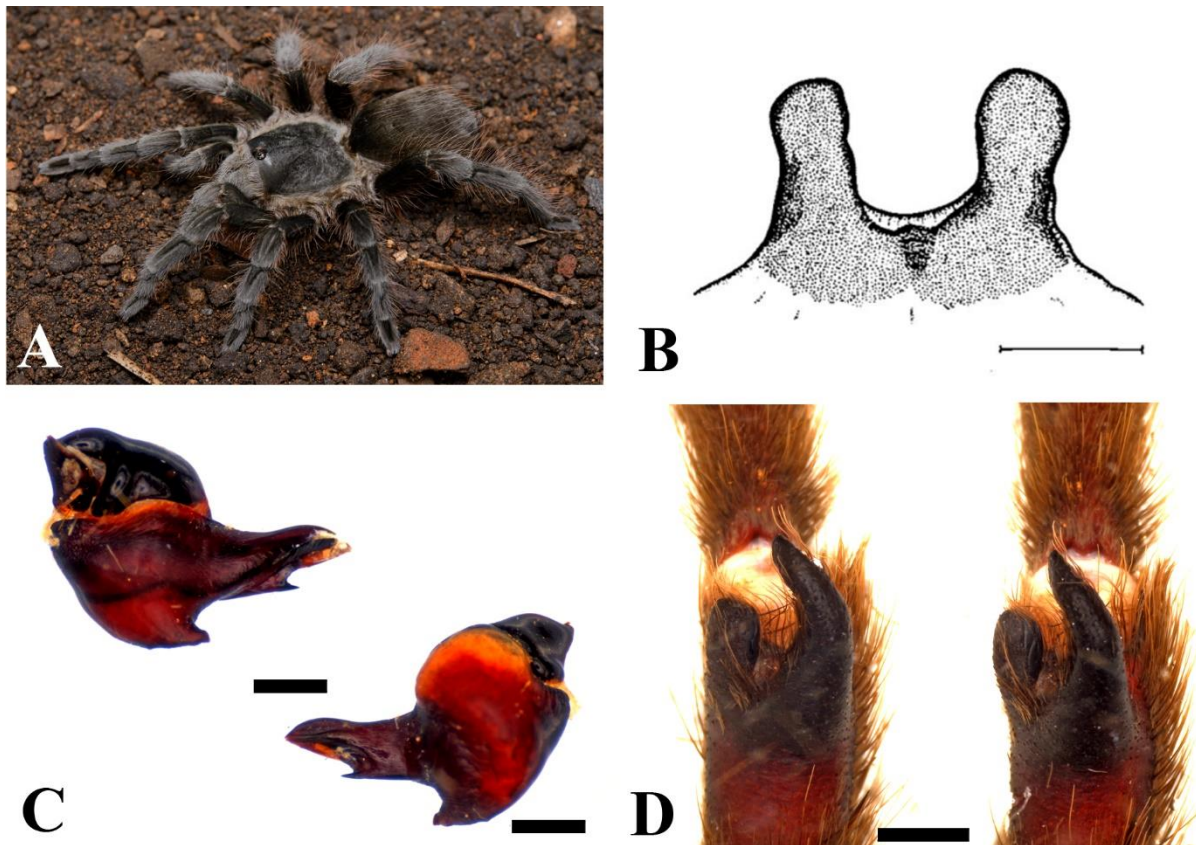


Figura 19. *Vitalius lucasae*. A. fêmea em vida (Foto: L.M. Borges). B. Espermateca da fêmea (retirado de Bertani, 2001). C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura D = 2 milímetros.

Os espécimes masculinos VITA 0021 e VITA 0022 registrados para os municípios de Guamiranga e Cândido de Abreu, no estado do Paraná, foram previamente identificados como *V. paranaensis* (baseados na morfologia semelhante dos caracteres sexuais e na ACP do capítulo III) se relacionaram com uma fêmea de *Vitalius* (VITA 0040) do município de Pitanga. A morfologia deste espécime nos chamou a atenção por não se assemelhar com outras espécies de *Vitalius* do Paraná, gerando dificuldade em sua identificação, fato que também ocorreu com a fêmea (VITA 0029), com registro para o município de Três Passos, no estado do Rio Grande do Sul. A figura 20 apresenta o espécime VITA 0040 em vida e sua espermateca (figura 20, A-B), além dos caracteres sexuais masculinos de VITA 0021.

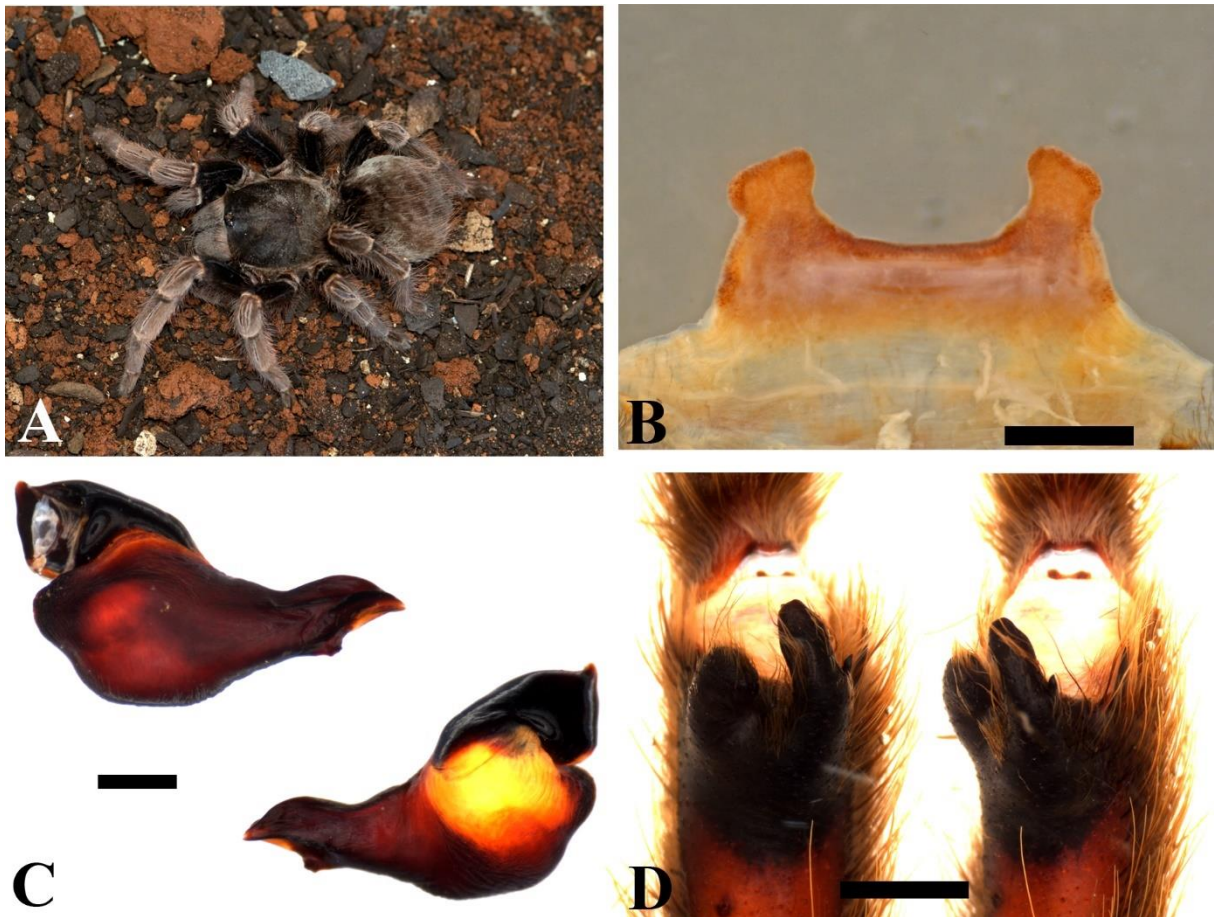


Figura 20. *Vitalius* sp. nov. A. Fêmea VITA 0040 em vida (Foto: W. Moeller). B. Espermateca VITA 0040. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino de VITA 0021. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo de VITA 0021. Escalas: figuras C-E = 1 milímetro; figura E = 2 milímetros.

O outro grupo formado por espécimes de *V. paranaensis* (três com registro para o Parque Nacional de Foz do Iguaçu e uma para Maringá, no Paraná aparece em nossas análises relacionado com um espécime juvenil de *V. vellutinus*. Esse posicionamento pode ser explicado por dois fatores: a falta de caracteres diagnósticos bem definidos para as fêmeas de *V. vellutinus* e a problemática diagnose biogeográfica para a diferenciação entre estas espécies. Bertani (2001) propôs que as fêmeas destes dois táxons se diferenciam apenas pela ocorrência geográfica, com *V. paranaensis* se restringindo ao estado do Paraná e província de Misiones, na Argentina, enquanto *V. vellutinus* se distribuí pelo oeste do estado de São Paulo. No capítulo III deste trabalho, apresentamos um estudo morfométrico das pernas, cefalotórax, espermatecas e bulbos copuladores masculinos, possibilitando a diferenciação morfológica entre elas. Além

disso, realizamos uma modelagem de distribuição de espécies (MDE), onde apontamos áreas de adequabilidade em São Paulo para a ocorrência de *V. paranaensis* e áreas de adequabilidade para a ocorrência de *V. vellutinus* no Paraná. O único espécime de *V. vellutinus* apresentado nesta topologia (VITA 0042), que trata-se de um indivíduo juvenil e imaturo, foi coletado durante nossa expedição científica para o Parque Estadual do Morro do Diabo, situado no município de Teodoro Sampaio, no estado de São Paulo. Para confirmar de qual espécie este indivíduo se trata, de fato, será necessário uma delimitação molecular. Caso consideremos a identificação errada e a análise de delimitação molecular confirme este indivíduo (VITA 0042) como da espécie *V. paranaensis*, a diagnose proposta por Bertani (2001) para a diferenciação entre as *V. vellutinus* e *V. paranaensis* se torna incorreta. Além disso, o posicionamento de *V. vellutinus* se torna incerto, uma vez que não teríamos incluído a espécie em nossa topologia. Ainda destacamos que em nossas análises foi possível observar três variações morfológicas entre os indivíduos do Parque Nacional de Foz do Iguaçu: um morfótipo marrom, um morfótipo preto e um morfótipo com esterno mais longo do que largo. A figura 21 indicam as variações morfológicas de *V. paranaensis* e a figura 22 B-C indica a fêmea e macho de *V. vellutinus* em vida, enquanto a figura 22-C indica o juvenil VITA 0042 apresentado nesta topologia.

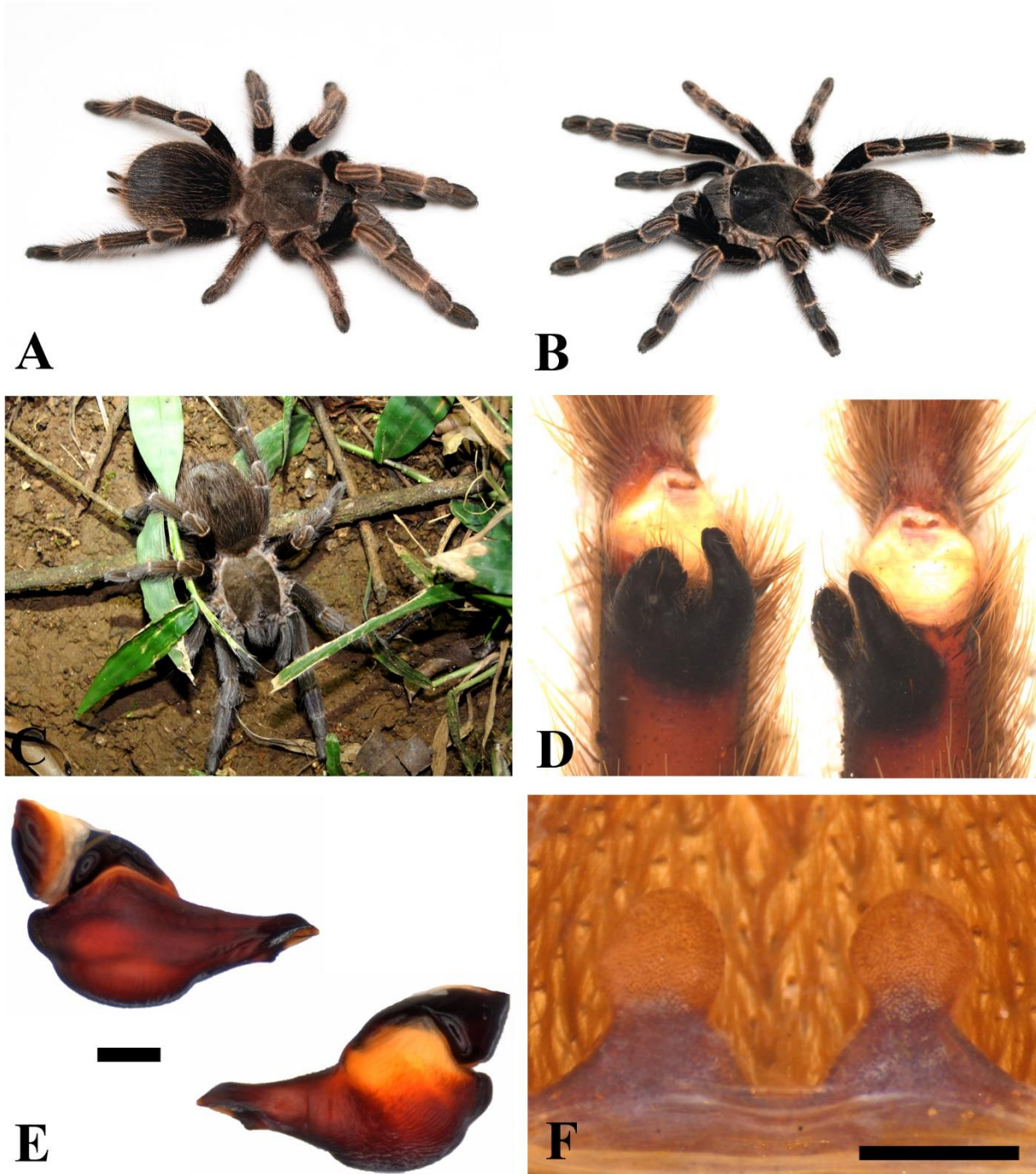


Figura 21. *Vitalius paranaensis*. A. Fêmea morfótipo marrom em vida (Foto: W. Moeller). B. Fêmea morfótipo preto em vida (Foto: W. Moeller). C. Fêmea do morfótipo com esterno modificado em vida (Foto: R.P. Indicatti). D. Tíbia esquerda dos três morfótipos e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. E. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino dos três morfótipos. F. Espermateca da fêmea dos três morfótipos. Escalas: figuras G-H = 1 milímetro; figura E = 2 milímetros.



Figura 22. *Vitalius vellutinus*. A. Fêmea em vida. B. Macho em vida. C. Juvenil (VITA 0042) em vida. Fotos A-C: R.P. Indicatti.

Relacionado a este grupo está a espécie-tipo do gênero, *V. sorocabae*. Aqui as duas espécies podem ser caracterizadas por apresentarem metatarso da perna I reto, bulbo copulador com um êmbulo mais curto que as demais espécies, pernas mais engrossadas, quilha subapical menos pronunciada e apófise tibial mais engrossadas (figura 23).

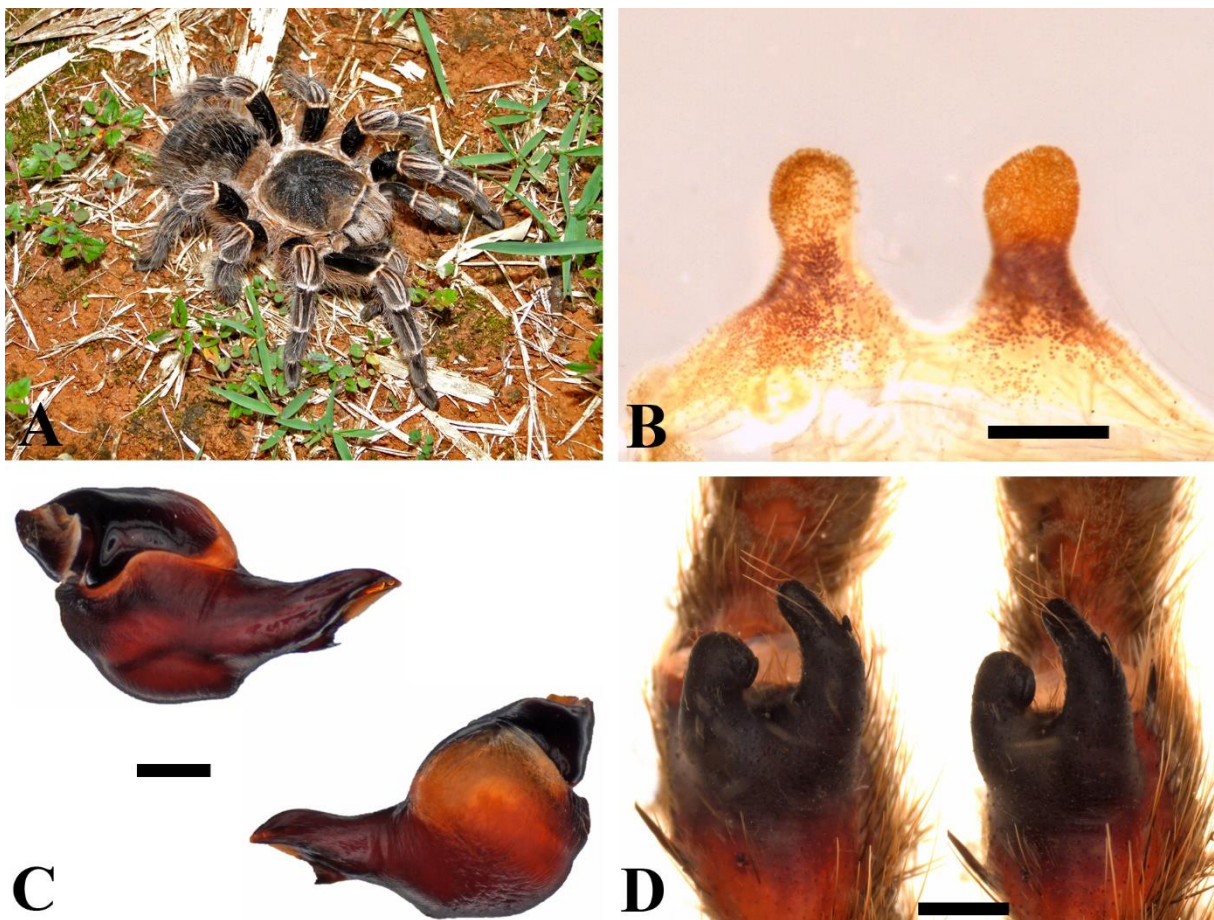


Figura 23. *Vitalius sorocabae*. A. fêmea em vida (Foto: R.P. Indicatti). B. Espermateca da fêmea. C. Faces prolateral e retrolateral do bulbo copulador masculino. D. Apófise tibial esquerdo e flexão do metatarso I sobre a apófise tibial esquerdo. Escalas: figuras B e C = 1 milímetro; figura

D = 2 milímetros.

## 5. Conclusão

Pela primeira vez um estudo filogenômico utilizando UCEs é realizado com aranhas no Brasil. As técnicas filogenômicas aqui propostas apresentaram maiores benefícios em termos de tempo e produção de dados, o que pode motivar novas pesquisas sobre o tema.

Com nossos resultados possibilitamos a elaboração de uma nova filogenia para um grupo de aranhas altamente homoplástico, possibilitando o entendimento das relações de algumas espécies que geravam dúvidas e que eram incertos.

Este trabalho forneceu uma visão geral sobre a evolução de caracteres morfológicos importantes para a taxonomia de Theraphosinae, além de possibilitar futuros estudos acerca dos processos de diversificação e conseqüentemente a criação de novas hipóteses biogeográficas e de especiação.

Propomos alocar *V. nondescriptus*, *P. sazimai* e *V. wacketi* em novos gêneros. Para estas espécies serão realizadas análises moleculares utilizando DNA *barcoding* para investigação de espécies crípticas, uma vez que apresentam variações morfológicas populacionais.

Propomos aqui as transferências de *P. amazonocius* para o gênero *Eupalaestrus*, além de *V. longisternalis* e *V. roseus* para o gênero *Pterinopelma*, já que surgiram monofiléticos com a espécie-tipo *P. vitiosum*. Desta forma, *Vitalius* se mantém válido, englobando as espécies *V. lucasae*, *V. buecherli*, *V. dubius*, *Vitalius* sp. nov., *V. paranaensis* e *V. sorocabae*.

O posicionamento de *V. vellutinus* ainda se mantém incerto, devendo ser incluídas mais amostras em análises futuras.

## Referências bibliográficas

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BEJERANO, G. et al. Ultraconserved elements in the human genome. **Science**, v. 304, n. 5675, p. 1321-1325, 2004.

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. Revalidation of *Pterinopelma* Pocock 1901 with description of a new species and the female of *Pterinopelma vitiosum* (Keyserling 1891) (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae). **Zootaxa**, v. 2814, n. 1, p. 1-18, 2011.

BERTANI, R.; GUADANUCCI, J. P. L. Morphology, evolution and usage of urticating setae by tarantulas (Araneae: Theraphosidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 30, p. 403-418, 2013.

BERTANI, R.; LEAL, F. A new species of *Pterinopelma* (Araneae: Theraphosidae) from the highlands of the state of Minas Gerais, Brazil and description of the male of *P. sazimai*. **Zoologia (Curitiba)**, v. 33, n. 2, 2016.

BLAIMER, B. B. et al. Phylogenomic methods outperform traditional multi-locus approaches in resolving deep evolutionary history: a case study of formicine ants. **BMC evolutionary biology**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2015.

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.

BORGES, L. M. Revisão taxonômica e análise cladística do gênero *Eupalaestrus* Pocock, Dissertação de Mestrado, 1901. 2019.

BOROWIEC, M. L. Spruceup: fast and flexible identification, visualization, and removal of outliers from large multiple sequence alignments. **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 42, p. 1635, 2019.

BRANSTETTER, M. G. et al. Enriching the ant tree of life: Enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other Hymenoptera. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 768-776, 2017.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.

DERKARABETIAN, S.; BENAVIDES, L. R.; GIRIBET, G. Sequence capture phylogenomics of historical ethanol-preserved museum specimens: Unlocking the rest of the vault. **Molecular Ecology Resources**, v. 19, n. 6, p. 1531-1544, 2019.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FABIANO-DA-SILVA, W.; GUADANUCCI, J. P. L.; DASILVA, M. B. Taxonomy and phylogenetics of *Tmesiphantes* Simon, 1892 (Araneae, Theraphosidae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 7, p. 650-668, 2019.

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.

FAIRCLOTH, B. C. Illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. 2013.

FAIRCLOTH, B. C. PHYLUCES is a software package for the analysis of conserved genomic loci. **Bioinformatics**, v. 32, n. 5, p. 786-788, 2016.

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, 2019.

FOLEY, S.; SARANATHAN, V.; PIEL, W. H. The evolution of coloration and opsins in tarantulas. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1935, p. 20201688, 2020.

FOLEY, S. et al. Phylogenomic analyses reveal a Gondwanan origin and repeated out of India colonizations into Asia by tarantulas (Araneae: Theraphosidae). **PeerJ**, v. 9, p. e11162, 2021.

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.

GARGIULO, F. F.; BRESCOVIT, A. D.; LUCAS, S. M. *Umbyquyra* gen. nov., a new tarantula spider genus from the Neotropical region (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae), with a description of eight new species. **Eur. J. Taxon.**, p. 1-50, 2018.

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.

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. 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.; FORMANOWICZ, D. R.; BOND, J. 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. 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.

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, 2018A.

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, 2018B.

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. 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.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KULKARNI, S. et al. Spider-specific probe set for ultraconserved elements offers new perspectives on the evolutionary history of spiders (Arachnida, Araneae). **Molecular Ecology**

**Resources**, v. 20, n. 1, p. 185-203, 2020.

LUCAS, S.; DA 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.

MCCORMACK, J. E.; TSAI, W. LE; FAIRCLOTH, B. C. Sequence capture of ultraconserved elements from bird museum specimens. *Molecular ecology resources*, v. 16, n. 5, p. 1189-1203, 2016.

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.

MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. **Molecular biology and evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530-1534, 2020.

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. 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.; 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.

PERAFÁN, Carlos; CIFUENTES, Yeimy; ESTRADA-GOMEZ, Sebastián. Aguapanela, a new tarantula genus from the Colombian Andes (Araneae, Theraphosidae). **Zootaxa**, v. 4033, n. 4, p. 529-542, 2015.

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

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.

RAMBAUT, A. FigTree v 1.4. 4. 2018.

RAVEN, R. J. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): cladistics and systematics. **Bulletin of the AMNH**, v. 182, article 1. 1985.

STARRETT, J. et al. High phylogenetic utility of an ultraconserved element probe set designed for Arachnida. **Molecular ecology resources**, v. 17, n. 4, p. 812-823, 2017.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic biology**, v. 56, n. 4, p. 564-577, 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.

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.

WOOD, H. M. et al. Next-generation museum genomics: Phylogenetic relationships among palpimanoid spiders using sequence capture techniques (Araneae: Palpimanoidea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 127, p. 907-918, 2018.

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

XU, X. et al. Phylogenomic analysis of ultraconserved elements resolves the evolutionary and biogeographic history of segmented trapdoor spiders. **Systematic biology**, 2021.

YEATES, D. K.; ZWICK, A.; MIKHEYEV, A. S. Museums are biobanks: unlocking the genetic potential of the three billion specimens in the world's biological collections. **Current opinion in insect science**, v. 18, p. 83-88, 2016.

ZHANG, Y. M.; WILLIAMS, J. L.; LUCKY, A. Understanding UCEs: a comprehensive primer on using ultraconserved elements for arthropod phylogenomics. **Insect Systematics and Diversity**, v. 3, n. 5, p. 3, 2019.

## ANEXO I

Lista de material utilizado na análise filogenética.

Código topologia	Voucher	Nº	Sexo	Gênero	Espécie	Município	UF	País
APH_0645	Idaho	1		<i>Aphonopelma</i>	<i>hentzi</i>			EUA
AUMS_10968	Idaho	2		<i>Stichoploporus</i>	sp.			CR
APH_3004	Idaho	3		<i>Sericopelma</i>	sp.			PN
APH_3056	Idaho	8		<i>Cyrtopholis</i>	<i>portoricae</i>			
CATU_0001	Bocaina_2019_The	4	F	<i>Catumiri</i>	<i>petropolium</i>	Paraty	RJ	BR
DOLI_0001	SE2018_The	20	M	<i>Dolicochele</i>	<i>diamantinensis</i>	Diamantina	MG	BR
CYRI_0001	VG-T	37	F	<i>Cyriocosmus</i>	sp.		AP	BR
BUMB_0001	VG-T	10	M	<i>Bumba</i>	sp.	São Desidério	BA	BR
TMES_0001	VG-T	4	F	<i>Tmesiphantes</i>	sp	Iraquara	BA	BR
GRAM_0001	SC_2019_The	18	M	<i>Grammostola</i>	<i>actaeon</i>	Urubici	SC	BR
GRAM_0002	LAB	19	M	<i>Grammostola</i>	<i>actaeon</i>	Pinhão	PR	BR
GRAM_0003	Bocaina_2019_The	1	F	<i>Grammostola</i>	<i>actaeon</i>	São José do Barreiro	SP	BR
GRAM_0004	SC_2019_The	2	F	<i>Grammostola</i>	<i>iheringi</i>	Blumenau	SC	BR
GRAM_0005	VG-T	3	F	<i>Grammostola</i>	<i>iheringi</i>	Rancho Queimado	SC	BR
GRAM_0008	VG-T	11	F	<i>Grammostola</i>	sp	Caçapava do Sul	RS	BR
GRAM_0006	SC_2019_The	8	M	<i>Grammostola</i>	<i>iheringi</i>	3 Barras	SC	BR
GRAM_0009	VGT	105	F	<i>Grammostola</i>	sp	Praia Grande	SC	BR
GRAM_0007	SC_2019_The	6	F	<i>Grammostola</i>	<i>iheringi</i>	Guabiruba	SC	BR
HOMO_0001	Itatiaia_2019_The	1	F	<i>Homoeomma</i>	<i>montanum</i>	Resende	RJ	BR
HOMO_0002	RS2018_The	1	M	<i>Homoeomma</i>	sp	Cambará do Sul	RS	BR
PLES_0001	VG-T	17	F	<i>Plesiopelema</i>	<i>insulare</i>	Guararema	SP	BR
CATA_0001	VG-T	27	M	<i>Catanduba</i>	<i>peruacu</i>	São Desidério	BA	BR
CATA_0002	VG-T	31	M	<i>Catanduba</i>	<i>simonii</i>	Hidrolina	GO	BR
ACAN_0001	VG-T	95.1	M	<i>Achanthoscurria</i>	<i>gomesiana</i>	Rio Claro	SP	BR
ACAN_0043	PEMD_2020_The	10	juv	<i>Achanthoscurria</i>	sp.	Teodoro Sampaio	SP	BR
EUPA_0001	LMB	005	F	<i>Eupalaestrus</i>	<i>campestratus</i>	Bonito	MS	BR
EUPA_0002	LMB	017	F	<i>Eupalaestrus</i>	<i>campestratus</i>	Caracol	MS	BR
EUPA_0003	LMB	400	M	<i>Eupalaestrus</i>	sp.	Rosário do Sul	RS	BR
EUPA_0004	VG-T	60.1	F	<i>Eupalaestrus</i>	<i>spiniosissimus</i>	Itatiaia	RJ	BR
EUPA_0041	LMB	028	F	<i>Eupalaestrus</i>	sp.	Caracol	MS	BR
LASI_0001	VG-T	82	M	<i>Lasiodora</i>	sp.1	Chapada Gaúcha	MG	BR

LASI_0002	LAB	24	M	<i>Lasiodora</i>	sp.2	Curitiba	PR	BR
NHAN_0001	LMB	011	juv	<i>Nhandu</i>	<i>carapoensis</i>	Caracol	MS	BR
NHAN_0002	LMB	469	F	<i>Nhandu</i>	<i>carapoensis</i>	Aquidauana	MS	BR
NHAN_0003	VG-T	62.10	juv	<i>Nhandu</i>	sp.n	Pedra Preta	MS	BR
PROS_0001	Pará_2020_The	2	F	<i>Proshapalopus</i>	<i>amazonicus</i>	Aveiro	Pará	BR
PROS_0002	Pará_2020_The	2B	M	<i>Proshapalopus</i>	<i>amazonicus</i>	Aveiro	Pará	BR
PROS_0003	VG-T	91	M	<i>Proshapalopus</i>	<i>anomalous</i>	Itatiaia	RJ	BR
PROS_0004	LMB	195	M	<i>Proshapalopus</i>	<i>multicuspidatus</i>	São Miguel dos Campos	AL	BR
PROS_0005	SE2018_The	19	juv	<i>Proshapalopus</i>	sp.	Diamantina	MG	BR
PTER_0002	AGL	01	F	<i>Pterinopelma</i>	<i>felipeleitei</i>	Diamantina	MG	BR
PTER_0004	SE2018_The	2	M	<i>Pterinopelma</i>	<i>sazimai</i>	Santana do Riacho	MG	BR
PTER_0005	SE2018_The	3	F	<i>Pterinopelma</i>	<i>sazimai</i>	Santana do Riacho	MG	BR
PTER_0006	LAB	4	F	<i>Pterinopelma</i>	<i>sazimai</i>	Diamantina	MG	BR
PTER_0007	LAB	7	F	<i>Pterinopelma</i>	<i>sazimai</i>	São Gonçalo do Rio das Pedras	MG	BR
PTER_0009	LMB	041	juv	<i>Pterinopelma</i>	<i>vitiosum</i>	Caxias do Sul	RS	BR
VITA_0002	LAB	69	F	<i>Vitalius</i>	<i>buecherli</i>	Curitiba	PR	BR
VITA_0039	LMB	152	F	<i>Vitalius</i>	<i>buecherli</i>	Campina Grande	PR	BR
VITA_0004	PETAR_2019_The	2	juv	<i>Vitalius</i>	<i>buecherli</i>	Iporanga	SP	BR
VITA_0001	VG-T	92	M	<i>Vitalius</i>	<i>dubius</i>	Biritiba Mirim	SP	BR
VITA_0005	LAB	8	M	<i>Vitalius</i>	<i>dubius</i>	Rio Claro	SP	BR
VITA_0007	LAB	185	M	<i>Vitalius</i>	<i>dubius</i>	Jundiaí	SP	BR
VITA_0008	LAB	178	M	<i>Vitalius</i>	<i>dubius</i>	São Paulo	SP	BR
VITA_0009	SC_2019_The	1	F	<i>Vitalius</i>	<i>longisternalis</i>	Urbicici	SC	BR
VITA_0011	LAB	20	F	<i>Vitalius</i>	<i>longisternalis</i>	Pitanga	PR	BR
VITA_0013	LAB	35	M	<i>Vitalius</i>	<i>longisternalis</i>	Guarapuava	PR	BR
VITA_0014	PR_2020_The	4	F	<i>Vitalius</i>	<i>longisternalis</i>	Fernandes Pinheiro	PR	BR
VITA_0015	LAB	38	M	<i>Vitalius</i>	<i>lucasae</i>	Campina Grande do Sul	PR	BR
VITA_0016	LMB	074	F	<i>Vitalius</i>	<i>lucasae</i>	Curitiba	PR	BR
VITA_0017	SE2018_The	9	juv	<i>Vitalius</i>	<i>nondescriptus</i>	Santana do Riacho	MG	BR
VITA_0018	SE2018_The	13	F	<i>Vitalius</i>	<i>nondescriptus</i>	Diamantina	MG	BR
VITA_0019	SE2018_The	14	F	<i>Vitalius</i>	<i>nondescriptus</i>	Diamantina	MG	BR
VITA_0020	SE2018_The	15	F	<i>Vitalius</i>	<i>nondescriptus</i>	Diamantina	MG	BR
VITA_0010	PNIguaçu_2018_The	5	M	<i>Vitalius</i>	<i>paranaensis</i> "esterno modificado"	Foz do Iguaçu	PR	BR
VITA_0021	LAB	36	M	<i>Vitalius</i>	<i>paranaensis</i>	Guamiranga	PR	BR
VITA_0022	LAB	37	M	<i>Vitalius</i>	<i>paranaensis</i>	Candido de Abreu	PR	BR
VITA_0024	PNIguaçu_2018_The	1	M	<i>Vitalius</i>	<i>parananensis</i> "preto"	Foz do Iguaçu	PR	BR
VITA_0025	PNIguaçu_2018_The	6	F	<i>Vitalius</i>	<i>parananensis</i> "marrom"	Foz do Iguaçu	PR	BR
VITA_0023	LAB	40	M	<i>Vitalius</i>	<i>paranaensis</i>	Maringá	PR	BR
VITA_0026	LMB	073	M	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	Rosário do Sul	RS	BR
VITA_0027	LMB	043	F	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	Jaguari	RS	BR
VITA_0028	LMB	330	M	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	Santa Maria	RS	BR
VITA_0030	LMB	075	M	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	Cerro Largo	RS	BR
VITA_0032	LMB	138	M	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	Nova Palma	RS	BR
VITA_0034	LMB	150	M	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	Derrubadas	RS	BR
VITA_0035	LMB	433	F	<i>Vitalius</i>	<i>roseus</i>	São Martinho da Serra	RS	BR
VITA_0036	LAB	30	M	<i>Vitalius</i>	<i>sorocabae</i>	São Paulo	SP	BR
VITA_0037	FNI_2019_The	1	juv	<i>Vitalius</i>	<i>sorocabae</i>	Iperó	SP	BR
VITA_0038	FNCB_2019_The	1	F	<i>Vitalius</i>	<i>sorocabae</i>	Capão Bonito	SP	BR
VITA_0042	PEMD_2020_The	14	juv	<i>Vitalius</i>	<i>vellutinus</i>	Teodoro Sampaio	SP	BR
VITA_0044	PR_2018_The	1	F	<i>Vitalius</i>	<i>wacketi</i>	Matinhos	PR	BR
VITA_0045	LAB	186	M	<i>Vitalius</i>	<i>wacketi</i>	Bertioga	SP	BR
VITA_0029	LMB	053	F	<i>Vitalius</i>	sp.	Três Passos	RS	BR
VITA_0033	LMB	148	F	<i>Vitalius</i>	sp.	Paraíso do Sul	RS	BR
VITA_0040	PR_2020_The	8	F	<i>Vitalius</i>	sp.	Pitanga	PR	BR

## 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.