



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E MANEJO DA
VIDA SILVESTRE

SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO DE ARANHAS-ARMADEIRAS (CTENIDAE:
PHONEUTRIA) A PARTIR DE EVIDÊNCIAS MOLECULARES, MORFOLÓGICAS E
ECOLÓGICAS



GUILHERME HENRIQUE FERNANDES DE AZEVEDO

BELO HORIZONTE
2012

GUILHERME HENRIQUE FERNANDES DE AZEVEDO

SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO DE ARANHAS-ARMADEIRAS (CTENIDAE:
PHONEUTRIA) A PARTIR DE EVIDÊNCIAS MOLECULARES, MORFOLÓGICAS E
ECOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ecologia.

Orientador: Adalberto José dos Santos

Belo Horizonte
2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Adalberto J. Santos pela disposição em compartilhar seus conhecimentos aracnológicos comigo ao longo desses quatro anos de orientação e pela companhia nos bons e maus (porém engraçados) momentos dos trabalhos de campo. Agradeço a colaboração dos professores Fabrício R. Santos e Teofânia H.D.A. Vidigal, cujos conhecimentos do “mundo molecular” foram essenciais para a realização desse trabalho. Outra pessoa que teve participação muito importante e que eu agradeço imensamente é o Daniel Coscarelli, que me ensinou e ajudou com os procedimentos de bancada. Agradeço também a colaboração de Antonio Brescovit com seu conhecimento a respeito da sistemática e morfologia de *Phoneutria* e pela coleta de espécimes. Sem essas cinco pessoas, essa dissertação não teria sido realizada.

Agradeço à CAPES pela concessão de uma bolsa de mestrado, e pelo financiamento a este projeto pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ 01991-09, PRONEX APQ 00336-09). Parte das coletas foi financiada por diárias concedidas pela FAPEMIG à Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Agradeço às instituições, curadores e assistentes de curadoria das coleções (listadas na seção “Material e Métodos” dos capítulos) que emprestaram material para ser analisado, mesmo, em alguns casos, à custa de um pedaço da perna do espécime para a análise molecular. Agradeço também a Andrew Meade pela versão 2.0 do programa BayesTraits.

Diversas pessoas contribuíram com a amostragem de exemplares de *Phoneutria*, seja participando diretamente ou ajudando com a logística e burocracia das coletas, e que eu gostaria de agradecer: João Paulo Pena-Barbosa (“Mamilo”), Karina e “Zé” (de SP), pelas coletas no Espírito Santo; Guilherme Dutra (“Noel”), Emanuel Cafofo (“Pato”), Bruno V.B. Rodrigues (“Chimbinha”), Alexandre B. Bonaldo (MPEG), Esmeraldo (MPEG), Nancy Lo-Man-Hung, David Candiani e Laura Miglio pelas coletas em Belém e suporte no Laboratório de Aracnologia do MPEG; Elder Morato (UFAC) e “Seu” Robson pela imensa ajuda com as coletas no Acre; Guilherme e Ananda, Tiago Porto (“Tiko”) e Jacques Delabie

(CEPLAC) pelas coletas na Bahia; Paulo De Marco e Flávia pelas coletas em Goiás; Ana, Werner e Ricardo Ott (FZRS), Edison Zefa (UFPEL) pelo suporte e ajuda com as coletas do Rio Grande do Sul; Glauco Machado (USP), Bruno Buzatto e Daniel Caetano (“Musgo”) pela expedição na Serra dos Órgãos. Agradeço também àquelas pessoas que se lembram de mim ao ver uma armadeira (ou algo que parecesse com uma) durante seu trabalho de campo: Caio Ambrósio, Clarissa Dantas (“Clara”), Fernando Leal, Fernando Silveira, Hans Thomassen, Ivo Oliveira, José Eustáquio Júnior, Marcelo Gonzaga, Marcos Hanashiro e Silva (“Marcão”), Ricardo Pinto-da-Rocha, José Uchoa, Alípio Benedetti, Marcus Thadeu Santos (“Empada”), Paulo Pinheiro (“Callithrix”), Pedro Taucce (“Pedrão”) e Tiago Pezzuti (“Prezuntinho”). A esses quatro últimos também agradeço pelos momentos de descontração e diversão com a banda Galapagos’ Finches.

Agradeço também aos administradores e funcionários das seguintes unidades de conservação que permitiram o acesso para coleta: Estação de Preservação e Desenvolvimento Ambiental de Peti (MG), Estação Experimental Catuaba (AC), Estación Biológica Jatun-Sacha (Napo, Equador), Fazenda São Nicolau (MT), Horto Florestal da UFPEL (RS), Parque Ambiental de Belém – Utinga (PA), Parque Ecológico do Guma (PA), Parque Estadual do Rio Doce (MG), Parque Estadual do Turvo (RS), Parque Nacional Cavernas do Peruaçu (MG), Parque Nacional do Itatiaia (RJ), Reserva Biológica Municipal Poço D’Anta (MG), Reserva Florestal Humaitá (AC), Reserva Zoobotânica- CEPLAC (BA) e RPPN Pousada das Araras (GO).

Agradeço ao professor Mário de Maria por ter me concedido a primeira oportunidade de trabalhar com aracnologia me aceitando como seu aluno. Deixo aqui meus agradecimentos também aos colegas do Laboratório de Aracnologia Ana Alice Monteiro, Bárbara Faleiro, Gracielle Ferreira, Ivan Magalhães (“Momô”), Marina Miranda, Ubirajara de Oliveira, Vinícius Diniz e Viviane Costa pela ajuda nas coletas, pelas conversas, discussões filosóficas, biológicas e sobre coisas inúteis, mas divertidas. Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Malacologia e Sistemática Molecular e do Laboratório Biologia de Evolução Molecular (LBEM) pelas conversas, ajuda, informações e paciência, em especial à

Cynthia, Luciana, Anderson (“Raul”), Érica, Bárbara, José Eustáquio, Lúcia, Bruno (“Minduin”), Augusto, Letícia e Gisele Dantas.

Sem o apoio da minha família, alguns momentos ao longo desses dois anos de mestrado seriam muito mais difíceis. Obrigado Xande, Laya, Déia, Gustavo, Helena, Rafa, Bebê, Ricardo, Fátima, Didi e é claro, minha mãe, Magdala, por todo o suporte e amor ao longo de todos esses anos e especialmente nos momentos finais dessa dissertação. Agradeço eternamente ao meu pai, Vicente, cuja luta e trabalho ao longo de sua vida me permitiu chegar até aqui, além é claro de todo o carinho e amor. Foi ele quem me ensinou o princípio da parcimônia muito antes de eu saber o que era uma filogenia.

Deixo aqui também, um “Muito Obrigado” mais que especial para a Izabela (“Iza”). Obrigado por todo amor ao longo desses “anos, passados, presentes, vividos entre o sonho e som” (como diria Belchior); obrigado por compreender (ou pelo menos tentar) os momentos em que precisei ficar ausente; obrigado por me apoiar e trazer alegria nos momentos mais difíceis desses árduos dois anos, dando força para seguir em frente; obrigado pela preocupação e pelos “puxões de orelha” com a intenção de fazer com que eu não deixasse a fase final do mestrado consumisse minha saúde; e obrigado por me ajudar com a formatação da versão final dessa dissertação.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho, mesmo que o nome não esteja mencionado aqui.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO I: Delimitação de Espécies em Aranhas do Gênero <i>Phoneutria</i> (Araneae: Ctenidae)	
utilizando evidências morfológicas e moleculares	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAIS E MÉTODOS	20
Amostragem de Espécimes	20
Morfologia e Morfometria Geométrica	23
Dados Moleculares	25
Inferência da Genealogia	27
Teste de Hipótese de Limites de Espécies	28
RESULTADOS	30
Morfologia	30
Genealogias	33
Limites de Espécies	38
DISCUSSÃO	41
Limites de Espécies	41

Morfologia	43
Filogenia	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO II: Filogeografia, evolução do nicho e diversificação de aranhas do gênero <i>Phoneutria</i> (Araneae: Ctenidae)	54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAIS E MÉTODOS	59
Filogenia e Filogeografia	59
Nicho das Espécies Atuais	61
Reconstrução do Nicho Ancestral	63
Evolução do Nicho ao Longo do Tempo	64
RESULTADOS	65
Filogenia e Filogeografia	65
Evolução do Nicho	69
DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Distribuição geográfica das espécies de *Phoneutria* e localidades dos indivíduos amostrados para as análises morfométricas (A) e para análises moleculares (B).....22
- Figura 1.2:** Palpo (A) e epígino (B) de *Phoneutria* mostrando os marcos anatômicos (pontos pretos) e os semi-marcos (pontos brancos) utilizados para as análises de morfometria geométrica24
- Figura 1.3:** Análise de deformações relativas (RWA) do êmbolo de *Phoneutria* baseada em dois marcos anatômicos e 98 semi-marcos. O primeiro e segundo eixo explicam 60% e 14% da variação, respectivamente. Elipses representam intervalo de confiança de 95%. As figuras ao redor do gráfico representam a forma estimada para o centróide de cada espécie.....31
- Figura 1.4:** Padrão de coloração ventral do abdômen: (A) *P. nigriventer*, fêmea de Catalão, Goiás (UFMG4057); (B) *P. eickstedtae*, fêmea de Serranópolis, Goiás (UFMG5269).32
- Figura 1.5:** Análise de deformações relativas (RWA) do epígino de *Phoneutria* baseada em dois marcos anatômicos e 98 semi-marcos. O primeiro e segundo eixo explicam 42% e 14% da variação, respectivamente. Elipses representam intervalo de confiança de 95%. As figuras ao redor do gráfico representam a forma estimada para o centróide de cada espécie. Setas indicam a posição dos espécimes-tipo.34
- Figura 1.6:** Árvore de máxima verossimilhança (A) e consenso de maioria da inferência bayesiana (B) para o gene mitocondrial COI. Nenhuma das análises assume relógio molecular36
- Figura 1.7:** Árvore de maior probabilidade posterior obtida através de inferência bayesiana (assumindo relógio molecular relaxado) e localização geográfica dos indivíduos do gr. *nigriventer* amostrados. Nós com probabilidade posterior igual ou maior que 90% estão indicados com*.....37
- Figura 1.8:** Filogenia de *Phoneutria* estimada a partir de abordagem coalescente multi-espécies. Árvore do gene mitocondrial COI representada dentro da árvore de espécies. Números nos nós representam a probabilidade posterior do clado da árvore de espécies.....40
- Figura 1.9:** Epígino, vista ventral. (A) *Phoneutria nigriventer* UFMG4168; (B) *P. eickstedtae* UFMG3614; (C) *P. pertyi* IBSP3402; (D) *P. keyserlingi* IBSP2186. AL= Apófise lateral; CL= Campo lateral; CM= Campo médio; GL= Guia lateral; LP= Lobo posterior.....45
- Figura 1.10:** Espermateca vista dorsal. (A) *Phoneutria nigriventer* UFMG4168; (B) *P. eickstedtae* UFMG3614; (C) *P. pertyi* IBSP3402; (D) *P. keyserlingi* IBSP2186. ES= Espermateca; CAC= Região

posterior da concavidade da abertura copulatória; **PL**= Projeção lateral da espermateca.....46

Figura 2.1: Filogenia, distribuição geográfica e localidades amostradas para as espécies de *Phoneutria*. Números nos ramos indicam a probabilidade posterior dos clados. Grupo externo não representado.....66

Figura 2.2: Evolução do nicho em *Phoneutria*. Árvore de máxima probabilidade posterior com datas de divergência (eixo *x*) projetada no primeiro componente principal (eixo *y*) da PCA feita com as tolerâncias ambientais das espécies recentes e com as estimadas para as espécies ancestrais. Os nós estão representados pelas médias da divergência e do espaço ambiental (nicho) dos ancestrais comuns mais recentes. Barras verticais representam o intervalo de confiança de 95% do espaço ocupado pelas espécies atuais no primeiro componente principal. Números nos nós representam o intervalo de 95% de maior densidade posterior da data de divergência67

Figura 2.3: Genealogia do gene mitocondrial COI para as espécies de *Phoneutria* e localização geográfica dos indivíduos do gr. *nigriventer* amostrados. Nós com probabilidade posterior igual ou maior que 90% estão indicados com *. **a**= zona de cisalhamento de Cubatão; **b**=descontinuidade crustal do Rio Paraíba do Sul; **c**= zona de falhas do Além Paraíba.....68

Figura 2.4: Teste de similaridade de nicho: (A) *Phoneutria fera* X *P. reidy*; (B) *P. nigriventer* X *P. keyserlingi*. Histogramas mostram a distribuição de frequência do índice de sobreposição para 1.000 pseudoréplicas geradas a partir de pontos aleatórios dentro da distribuição das espécies. Setas indicam o valor real de sobreposição dos modelos gerados pelo MAXENT. Em ambos os casos o nicho é mais similar do que o esperado ao acaso.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Fator Bayesiano ($B_{01}=M_0/M_1$) para cada comparação entre as hipóteses de limites de espécie e o logaritmo da verossimilhança dos modelos. Valores maiores que 4 indicam evidência significativa contra M_139

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Lista dos espécimes utilizados na análise de morfometria geométrica com respectivas localidades e coordenadas geográficas. Agrupados por espécie sensu Martins & Bertani 2007.

Anexo 2: Lista dos espécimes utilizados nas análises moleculares com respectivas localidades e coordenadas geográficas. Espécies como delimitado no capítulo I. Haplogrupo determinado pela análise molecular como mostra a Figura 2.3.

Anexo 3: Lista dos espécimes examinados, mas não utilizados nas análises morfométricas e moleculares, com respectivas localidades e coordenadas geográficas. Espécies agrupadas sensu Martins & Bertani 2007.

RESUMO

O gênero *Phoneutria* engloba atualmente oito espécies neotropicais cujo histórico taxonômico é controverso, principalmente com relação a quatro espécies da Floresta Atlântica e Cerrado. Sua ampla distribuição ao longo dos maiores biomas sul-americanos, mas com certo endemismo de algumas espécies, fazem desses organismos potenciais modelos para estudos filogeográficos. Muitas das hipóteses propostas para explicar a diversidade neotropical envolvem a participação de fatores ambientais. Entretanto, poucos estudos abordam o papel do nicho nos processos de diversificação das linhagens. Neste trabalho, utilizamos evidências moleculares, morfológicas e ecológicas para delimitar espécies dentro do gênero e propor hipóteses a respeito da participação de fatores ambientais e possíveis eventos históricos envolvidos na diversificação das linhagens de *Phoneutria*. Análises de morfometria geométrica indicam que o formato da genitália masculina é capaz de diferenciar três das quatro espécies cuja taxonomia é controversa. A forma da genitália feminina, por sua vez, não apresenta diferenças claras entre as espécies e a árvore para o gene mitocondrial COI não recupera nenhuma dessas quatro espécies como monofiléticas. Análises de coalescência indicam a existência de três linhagens evolutivas independentes, as quais correspondem aos três grupos encontrados com base na morfologia da genitália masculina. Nossos resultados indicam, portanto, a existências de sete entidades que poderiam ser consideradas como espécies, sendo válidos os nomes *Phoneutria fera*, *P. nigriventer*, *P. reidy*, *P. boliviensis*, *P. pertyi* e *P. keyserlingi*. Aspectos da morfologia e uma hipótese de relações filogenéticas entre as espécies são discutidas. Para estudar a evolução do nicho, utilizamos uma filogenia com datas de divergência inferidas a partir de uma abordagem bayesiana, com base em um modelo de relógio molecular relaxado, e dados ambientais das espécies para reconstruir o nicho ancestral em cada nó. Os resultados mostram que, de uma maneira geral, as divergências ecológicas ocorreram no início da diversificação do grupo, enquanto que divergências mais recentes apresentam conservação do nicho. Os possíveis eventos envolvidos na diversificação de *Phoneutria* são discutidos com base nas principais hipóteses propostas para explicar a diversidade neotropical e levando em consideração a evolução do nicho, a distribuição geográfica e a data de divergência das espécies.

ABSTRACT

The spider genus *Phoneutria* currently comprises eight Neotropical species whose taxonomic history is controversial, especially regarding four species from the Atlantic Forest and the Cerrado. Since the species of *Phoneutria* are widely distributed along the major biomes of South America, but still with endemism of some species, these organisms are potential models for phylogeographic studies. Many of the hypotheses proposed to explain the Neotropical diversity involve the participation of environmental factors. However, few studies address the role of the niche in the process of diversification of lineages. In this paper, we use molecular, morphological and ecological evidence to delimit species within the genus and propose hypotheses about the environmental factors and possible historical events involved in the diversification of lineages of *Phoneutria*. Geometric morphometric analysis indicates that the shape of male genitalia can be used to differentiate three of the four species whose taxonomy is controversial. The shape of female genitalia, in turn, has no clear differences between species, and a mitochondrial gene tree based on COI does not recover any of these four species as monophyletic. Coalescence analysis indicates the existence of three independent evolutionary lineages, which correspond to the three groups found based on the morphology of male genitalia. The results indicate, therefore, the existence of seven entities that could be considered as species in this genus, to which the following names can be applied: *Phoneutria fera*, *P. nigriventer*, *P. reidyi*, *P. boliviensis*, *P. pertyi* and *P. keyserlingi*. Aspects of the morphology and a hypothesis of phylogenetic relationships among those species are discussed. To study the evolution of the niche, we used a Bayesian approach to reconstruct a phylogeny with divergence dates inferred through a relaxed molecular clock model, and environmental data of existent species to reconstruct the ancestral niche on each node. The results show that, in general, the ecological differences occurred in the early diversification of the group, while more recent divergences have shown niche conservatism. The possible events involved in the diversification of *Phoneutria* are discussed based on the main hypotheses proposed to explain the Neotropical diversity and taking into account the evolution of the niche, geographical distribution and the date of divergence of species.

INTRODUÇÃO GERAL

As aranhas do gênero *Phoneutria* Perty, 1883 são caracterizadas pela presença de uma escópula densa na face pró-lateral da tíbia e do tarso dos palpos, e pelo comportamento defensivo em posição ereta, com movimentos laterais do corpo e com as pernas dianteiras elevadas (Simó & Brescovit 2001). Devido a esse comportamento, essas aranhas são, em algumas regiões do Brasil, conhecidas popularmente como “aranhas-armadeiras”. As espécies de *Phoneutria* estão distribuídas por quase toda a América Central e do Sul, desde a Guatemala até o norte da Argentina (Fig. 1.1). São aranhas noturnas, errantes, encontradas sobre a vegetação e no solo de áreas florestadas, podendo também habitar ambientes antropizados (Lucas 2003), como casas e plantações de banana.

O fato das espécies de *Phoneutria* possuírem veneno extremamente ativo em seres humanos (Antunes & Málaque 2003), aliado ao seu sinantropismo, faz com que as armadeiras sejam responsáveis por boa parte dos acidentes com artrópodes peçonhentos no Brasil (Lucas 2003). Por outro lado, algumas propriedades farmacológicas instigam cientistas que buscam por aplicações biotecnológicas de compostos derivados das toxinas presentes no veneno (*e.g.* Paranbos *et al.* 2008; Dalmolin *et al.* 2011). Uma vez que essas toxinas podem ser espécie-específicas, é importante que os limites taxonômicos entre as espécies sejam claros, a fim de facilitar a comunicação entre os pesquisadores. Entretanto, no caso das espécies de *Phoneutria* da região sul e sudeste do Brasil, a grande variação intraespecífica e pouca variação interespecífica parecem dificultar a identificação, e muitos autores discordam quanto ao *status* taxonômico de algumas espécies (Bücherl 1952, 1968; Schiapelli & Gerschman de Pikelin 1966; Eickstedt 1979; Simó & Brescovit 2001; Martins & Bertani 2007). É necessário, portanto, estudos que visam à delimitação das espécies de *Phoneutria* e permitam entender melhor as relações evolutivas dentro do gênero fortalecendo, assim, as bases para estudos posteriores sobre sua biologia.

A ampla distribuição do gênero na região Neotropical, com certo grau de endemismo de algumas espécies, e sua ocorrência nos maiores biomas brasileiros (Amazônia, Cerrado e Floresta Atlântica) fazem

desses organismos modelos potenciais para estudos biogeográficos e evolutivos. Ferramentas da filogeografia (Avice 2009; Knowles 2009; Hickerson *et al.* 2010), aliadas a métodos de análise baseados em Sistemas de Informações Geográficas (*Geographic Information Systems*, GIS) permitem a descrição de padrões de distribuição espacial e de divergência das linhagens e a identificação de possíveis processos associados a esses padrões (Carstens & Richards 2007; Richards *et al.* 2007; Chan *et al.* 2011). Com estas ferramentas é possível, por exemplo, inferir como foi a evolução do nicho em um organismo e propor hipóteses sobre como fatores ambientais podem ter influenciado na diversificação e no padrão de distribuição das linhagens (Kozak & Wiens 2006; Evans *et al.* 2009; Vieites *et al.* 2009; Jakob *et al.* 2010; Nakazato *et al.* 2010; Struwe *et al.* 2011;). Saber como fatores ambientais atuam em um organismo pode nos ajudar a entender melhor os processos geradores da biodiversidade no planeta e fazer previsões sobre como futuras mudanças no ambiente podem afetar as espécies que conhecemos hoje.

O presente trabalho teve, portanto, dois objetivos, os quais serão abordados em dois capítulos diferentes dessa dissertação. O primeiro visa utilizar dados morfológicos, tanto quantitativos como qualitativos, junto com ferramentas de análise de dados moleculares, para propor e testar hipóteses de limites entre espécies de *Phoneutria*. O segundo objetivo foi descrever padrões filogeográficos, inferir como foi a evolução do nicho e propor hipóteses sobre como fatores ambientais e eventos históricos podem ter influenciado na diversificação do grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, E. & Málaque, C.M.S. 2003. Mecanismo de ação do veneno de *Phoneutria* e aspectos clínicos do foneutrismo. In: J.L.C. Cardoso, F.O.S. França, F.H. Wen, C.M.S. Málaque & V. Haddad Jr. (Orgs.) *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, São Paulo, pp. 150–159.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- Bücherl, W. 1952. Aranhas do Rio Grande do Sul. *Memórias do Instituto Butantan* **24**: 127–155.
- Bücherl, W. 1968. Brazilian scorpions and spiders: I. Biology of scorpions and effects of their venoms. II. The poisonous spiders of the genus *Phoneutria* Perty, 1833. *Revista brasileira de Pesquisas médicas e biológicas* **1**(3/4): 181–190.
- Carstens, B.C. & Richards, C.L. 2007. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution* **61**: 1439–1454.
- Chan, L.M., Brown, J.L. & Yoder, A.D. 2011. Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**: 523–537.
- Dalmolin, G.D., Silva, C.R., Rigo, F.K., Gomes, G.M., Cordeiro, M.D.N., Richardson, M., Silva, M.A.R., Prado, M.A.M., Gomez, M.V. & Ferreira, J. 2011. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain* **152**: 2224–2232.
- Eickstedt, V.R.D. von. 1979. Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) (Araneae; Labidognatha; Ctenidae). *Memórias do Instituto Butantan*, **42/43**: 95–126.
- Evans, M.E.K., Smith, S.A., Flynn, R.S. & Donoghue, M.J. 2009. Climate, niche evolution, and diversification of the “bird-cage” evening primroses (*Oenothera*, sections *Anogra* and *Kleinia*). *The American naturalist* **173**: 225–240.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. 2010. Phylogeography’s past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 291–301.
- Jakob, S.S., Heibl, C., Rödder, D. & Blattner, F.R. 2010. Population demography influences climatic niche evolution: evidence from diploid American *Hordeum* species (Poaceae). *Molecular ecology* **19**: 1423–1438.
- Knowles, L.L. 2009. Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **40**: 593–612.
- Kozak, K.H. & Wiens, J.J. 2006. Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution* **60**: 2604–2621.
- Lucas, S.M. 2003. Aranhas de interesse médico no Brasil. In: J.L.C. Cardoso; F.O.S. França; F.H. Wen; C.M.S. Málaque & V. Haddad Jr. (Orgs.) *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, São Paulo, pp. 141–149.
- Martins, R. & Bertani, R. 2007. The non-Amazonian species of the Brazilian wandering spiders of the genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae: Ctenidae), with the description of a new species. *Zootaxa* **1526**: 1–36.
- Nakazato, T., Warren, D.L. & Moyle, L.C. 2010. Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American journal of botany* **97**: 680–693.
- Paranbos M., Andrade, E., Troncone, L., Villanova, F., Andrade, P., Messina, L., Leite, K. & Srougi, M. 2008. *Phoneutria nigriventer* spider toxin: A new horizon for the treatment of erectile dysfunction. *Journal of Sexual Medicine* **5**(Suppl. 1): 12.

- Richards, C.L., Carstens, B.C. & Knowles, L.L. 2007. Distribution modelling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses. *Journal of Biogeography* **34**: 1833–1845.
- Schiapelli, R. & Gerschman De Pikelin, B.S. 1966. Estudio comparativo de *Phoneutria fera* Perty, 1833 y *Phoneutria nigriventer* (Keyserling), 1891 (Araneae: Ctenidae). *Memórias do Instituto Butantan* **33**: 675–682.
- Simó, M. & Brescovit, A.D. 2001. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. *Bulletin of the British Arachnological Society* **12**: 67–82.
- Struwe, L., Smouse, P.E., Heiberg, E., Haag, S. & Lathrop, R.G. 2011. Spatial evolutionary and ecological vicariance analysis (SEEVA), a novel approach to biogeography and speciation research, with an example from Brazilian Gentianaceae. *Journal of Biogeography* **38**: 1841–1854.
- Vieites, D.R., Nieto-Román, S. & Wake, D.B. 2009. Reconstruction of the climate envelopes of salamanders and their evolution through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106 (Supl. 2)**: 19715–19722.

CAPÍTULO I

Delimitação de espécies em aranhas do gênero *Phoneutria* (Araneae: Ctenidae) utilizando evidências morfológicas e moleculares

RESUMO

A taxonomia de *Phoneutria* é marcada por uma história confusa e controversa envolvendo principalmente as espécies presentes na região centro-oeste, sul e sudeste do Brasil. Isso se deve basicamente à grande variabilidade morfológica da genitália de quatro espécies, *P. nigriventer*, *P. pertyi*, *P. keyserlingi* e *P. eickstedtae*. Neste trabalho, utilizamos evidências da morfologia e da história evolutiva do gene mitocondrial COI para delimitar as espécies do gênero. Análises de morfometria geométrica e inferência da genealogia a partir de análise bayesiana e de máxima verossimilhança foram empregadas para detectar diferenças morfológicas e genéticas e possibilitar a formulação de hipóteses a respeito dos limites entre espécies. Uma análise de coalescência foi então utilizada para testar cada uma das hipóteses. As análises morfométricas indicam que o formato da genitália masculina é capaz de diferenciar três grupos claramente: um que corresponde à *P. pertyi*, outro à *P. keyserlingi* e por último uma que engloba *P. nigriventer* e *P. eickstedtae*. Estas duas últimas podem ser diferenciadas apenas pela coloração do abdômen. A forma da genitália feminina, por sua vez, não apresenta diferenças claras entre as espécies e a genealogia não recupera nenhuma dessas quatro espécies como monofiléticas. Embora não haja monofiletismo recíproco e a genitália das fêmeas seja muito similar, a análise de coalescência indica a existência de três linhagens evolutivas independentes, as quais correspondem aos três grupos encontrados com base na morfologia da genitália masculina. A coloração do abdômen não parece por tanto, ser um indicativo confiável do limite entre *P. nigriventer* e *P. eickstedtae*, e essas duas poderiam ser sinonimizadas. *Phoneutria pertyi* e *P. keyserlingi* poderiam ser consideradas espécies válidas, mas não são reciprocamente monofiléticas. Aspectos da morfologia e caracteres diagnósticos são discutidos, assim com uma hipótese de relação filogenética entre as espécies do gênero.

ABSTRACT

The taxonomy of *Phoneutria* is marked by a confusing and controversial history involving mainly the species present in the central-western, southern and southeastern Brazil. This is basically due to the great morphological variability of the genitalia of four species: *P. nigriventer*, *P. pertyi*, *P. keyserlingi* and *P. eickstedtae*. In this paper, we use evidence from morphology and evolutionary history of mitochondrial gene COI for species delimitation in this genus. Geometric morphometric analysis and inference of the genealogy from Bayesian analysis and maximum likelihood were used to detect genetic and morphological differences and enable the formulation of different hypotheses about the boundaries between species. Coalescent analysis was then used to test each hypothesis. The morphometric analysis indicate that the shape of male genitalia is able to clearly discriminate three groups: one that corresponds to *P. pertyi*, other to *P. keyserlingi* and finally one that includes *P. nigriventer* and *P. eickstedtae*. The latter two species can be differentiated only by the color of the abdomen. The shape of the female genitalia, in turn, has no clear differences between species and the genealogy does not recover any of these four species as monophyletic. Although there is no reciprocal monophyly and the female genitalia is very similar, the coalescence analysis indicates the existence of three independent evolutionary lineages, which correspond to the three groups found based on the morphology of male genitalia. Therefore the coloration of the abdomen does not seem to be a reliable indicator of the boundary between *P. nigriventer* and *P. eickstedtae*, and these two could be synonymized. *Phoneutria pertyi* and *P. keyserlingi* could be considered valid species, but are not reciprocally monophyletic. Aspects of morphology and diagnostic characters are discussed, along with a hypothesis of phylogenetic relationship among the species.

INTRODUÇÃO

“Também não discutirei aqui as muitas definições que já foram apresentadas sobre o termo espécie. Nenhuma dessas definições satisfaz todos os naturalistas, mesmo que todos tenham uma vaga ideia do que querem dizer quando se referem a uma espécie em particular.”

Darwin (1859)

Embora as espécies sejam a unidade fundamental da biologia, discussões a cerca de definições do termo são de longa data. De fato, de um mínimo de 22 conceitos de espécies elaborados até hoje (Mayden 1999) nenhum se aplica otimamente a todas as formas de vida conhecidas (de Queiroz 1998), o que leva alguns autores a questionar se espécies realmente são entidades naturais (Mallet 2007). Por outro lado, todos os conceitos propostos até o momento concordam que as espécies são metapopulações evoluindo separadamente (de Queiroz 2007). A dificuldade estaria então, no critério utilizado como evidência relevante para determinar a separação dessas linhagens (*e.g.* morfologia, comportamento, ecologia, fisiologia, genética, etc; de Queiroz 2007).

Muitos trabalhos vêm, portanto, focando abordagens integrativas, utilizando várias linhas de evidências para delimitar espécies em táxons cujos limites interespecíficos são difíceis de estabelecer (Raxworthy *et al.* 2007; Rissler & Apodaca 2007; Stockman & Bond 2007; Bond & Stockman 2008; Leaché *et al.* 2009; Macías-Hernández *et al.* 2010; Evin *et al.* 2011). A morfometria geométrica (Rohlf 1990; Adams *et al.* 2004; Mitteroecker & Guns 2009), por exemplo, é uma ferramenta que pode ser utilizada para explorar quantitativamente a variação morfológica de grupos de espécies (*e.g.* Crews 2009; Costa-Schmidt & Araújo 2010). Entretanto, essa diferença morfológica pode ser resultado de polimorfismos dentro da população (*e.g.* *Oedothorax gibbosus* (Blackwall 1841), Heinemann & Uhl 2000), não indicando a separação entre duas linhagens. De fato, vários exemplos de polimorfismo em aranhas, inclusive em genitálias, sugerem que a variabilidade intraespecífica pode dificultar a delimitação de espécies (Jocqué 2002). Aliada à morfometria, pode-se usar técnicas da filogeografia (Avice 2009;

Knowles 2009; Hickerson *et al.* 2010) para avaliar diferenciação genética das populações e relaciona-la com a morfologia, adicionando assim, uma nova linha de evidência para delimitar as espécies (Crews & Hedin 2006; Leaché *et al.* 2009; Macías-Hernández *et al.* 2010; Evin *et al.* 2011).

A maioria dos métodos utilizados para avaliar a diferenciação genética e delimitar espécies se baseia em critérios de exclusividade, como o monofiletismo recíproco (Sites & Marshal 2003). Esses métodos falham por não levar em conta os processos estocásticos que podem levar a discordâncias entre árvore de espécies e árvores gênicas (Maddison 1997). Um dos fatores que podem levar a essa discordância é a retenção de polimorfismo ancestral (ou coalescência profunda), quando dois alelos de indivíduos de espécies diferentes coalescem antes da divergência entre as espécies. Baseado em teorias de coalescência, é possível modelar probabilisticamente a história de um ou mais genes e a sua relação com determinadas árvores de espécies, possibilitando assim, testar hipóteses sobre a divergência das linhagens em um determinado grupo (Knowles & Carstens 2007; Carstens & Dewey 2010; Leaché & Fujita 2010).

Portanto, baseado no conceito unificado de espécies (de Queiroz 2007), em que estas seriam linhagens de metapopulações evoluindo separadamente, nós nos propomos a utilizar morfologia e a genealogia de populações para delimitar espécies dentro do gênero *Phoneutria* Perty, 1883. Este gênero é atualmente constituído por oito espécies neotropicais (Platnick 2012), sendo que três delas são encontradas na região amazônica e as outras cinco em florestas da Mata Atlântica e Cerrado (Fig. 1.1). Apesar de o gênero ser aparentemente monofilético, e facilmente identificado pela presença de uma escópula densa na face proteral da tíbia e do tarso dos palpos, e pelo comportamento defensivo (Simó & Brescovit 2001), a grande variabilidade intraespecífica da genitália, comparada com a variação interespecífica (principalmente das fêmeas), parece dificultar a delimitação de espécies.

A controvérsia a respeito da taxonomia do gênero *Phoneutria* ocorre principalmente entre as espécies das regiões sul e sudeste do Brasil, envolvendo uma história confusa de sinónimas e revalidações (para maiores detalhes veja Bücherl 1952, 1968; Schiapelli & Gerschman de Pikelin 1966; Eickstedt 1979; Simó & Brescovit 2001; Martins & Bertani 2007). As três revisões mais recentes

discordam quanto à validade de três espécies. Alguns autores consideram que *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) seria sinônimo sênior de *P. pertyi* (F.O. Pickard-Cambridge, 1897) e *P. keyserlingi* (F.O. Pickard-Cambridge, 1897) (Simó & Brescovit 2001), enquanto que outros consideram essas três espécies como táxons válidos (Eickstedt 1979; Martins & Bertani 2007). O trabalho mais recente de revisão do gênero também conta com a descrição de uma nova espécie: *Phoneutria eickstedtae* Martins e Bertani 2007. Essa espécie também apresenta morfologia da genitália, tanto de machos quanto de fêmeas, muito similar àquela de *Phoneutria nigriventer*. Além disso, todas essas espécies apresentam distribuição com certa sobreposição geográfica, o que complica ainda mais a identificação, dependendo da procedência do indivíduo.

Todos os trabalhos taxonômicos com as espécies do gênero publicados até o momento se basearam apenas na análise comparativa e qualitativa de caracteres morfológicos, principalmente da genitália. Embora trabalhos como esses possam ser eficientes e práticos para muitos táxons, em outros, como no caso de *Phoneutria*, parece ser interessante e necessária a utilização de abordagens que integrem outras fontes de informação. Assim é possível propor hipóteses de limites entre as espécies de uma forma mais embasada na história evolutiva do grupo. Neste estudo, utilizamos morfometria geométrica para acessar quantitativamente as diferenças na forma da genitália, a filogeografia para verificar diferenças genéticas entre as populações e testamos possíveis limites entre as espécies com modelos coalescentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem de Espécimes

Os espécimes utilizados nesse estudo foram obtidos de duas maneiras: (1) através de coletas durante os anos de 2009 a 2011, cujo material foi armazenado em álcool 96% e em local refrigerado, e (2) através de empréstimo de material armazenado em álcool 70–80%, proveniente das seguintes coleções (abreviações e curadores entre parêntesis): California Academy of Sciences, São Francisco, Califórnia,

EUA (CAS, Charles Griswold); Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (UFMG, Adalberto J. Santos); Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal (DZUB, Paulo C. Motta); Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo (IBSP, Irene Knysak); Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas (INPA, Célio Magalhães); Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru (MUSM, Diana Silva Dávila); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo (MZSP, Ricardo Pinto-da-Rocha); Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia (UFBA, Tânia K. Brasil), Museu Nacional, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (MNRJ, Adriano B. Kury); Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará (MPEG, Alexandre B. Bonaldo); Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, França (MNHN, Christine Rollard); The Natural History Museum, Londres, Inglaterra (BMNH, Janet Beccaloni).

Os indivíduos foram escolhidos de forma que abrangessem a distribuição conhecida das espécies do gênero (Fig. 1.1). Os lotes cujas coordenadas geográficas não estavam indicadas na etiqueta foram georreferenciados a partir de buscas no banco de dados do Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA) através da ferramenta geoLoc (<http://smlink.cria.org.br/geoloc?criaLANG=pt>), ou através do Google Earth®.

O holótipo de *P. nigriventer* e os síntipos de *P. pertyi* foram examinados e fotografados por A.J. Santos e incluídos nas análises morfológicas. O holótipo de *P. keyserlingi* não foi encontrado no BMNH (A.J. Santos, comunicação pessoal) e o de *P. eickstedtae* não foi encontrado no IBSP após o incêndio de maio de 2010 (A.D. Brescovit, comunicação Pessoal). Entretanto, espécimes coletados na localidade-tipo de *P. keyserlingi* e próximo à localidade-tipo de *P. eickstedtae* foram analisados. A lista completa do material examinado com respectivo número de tombo e coordenadas geográficas está nos Anexos 1, 2 e 3.

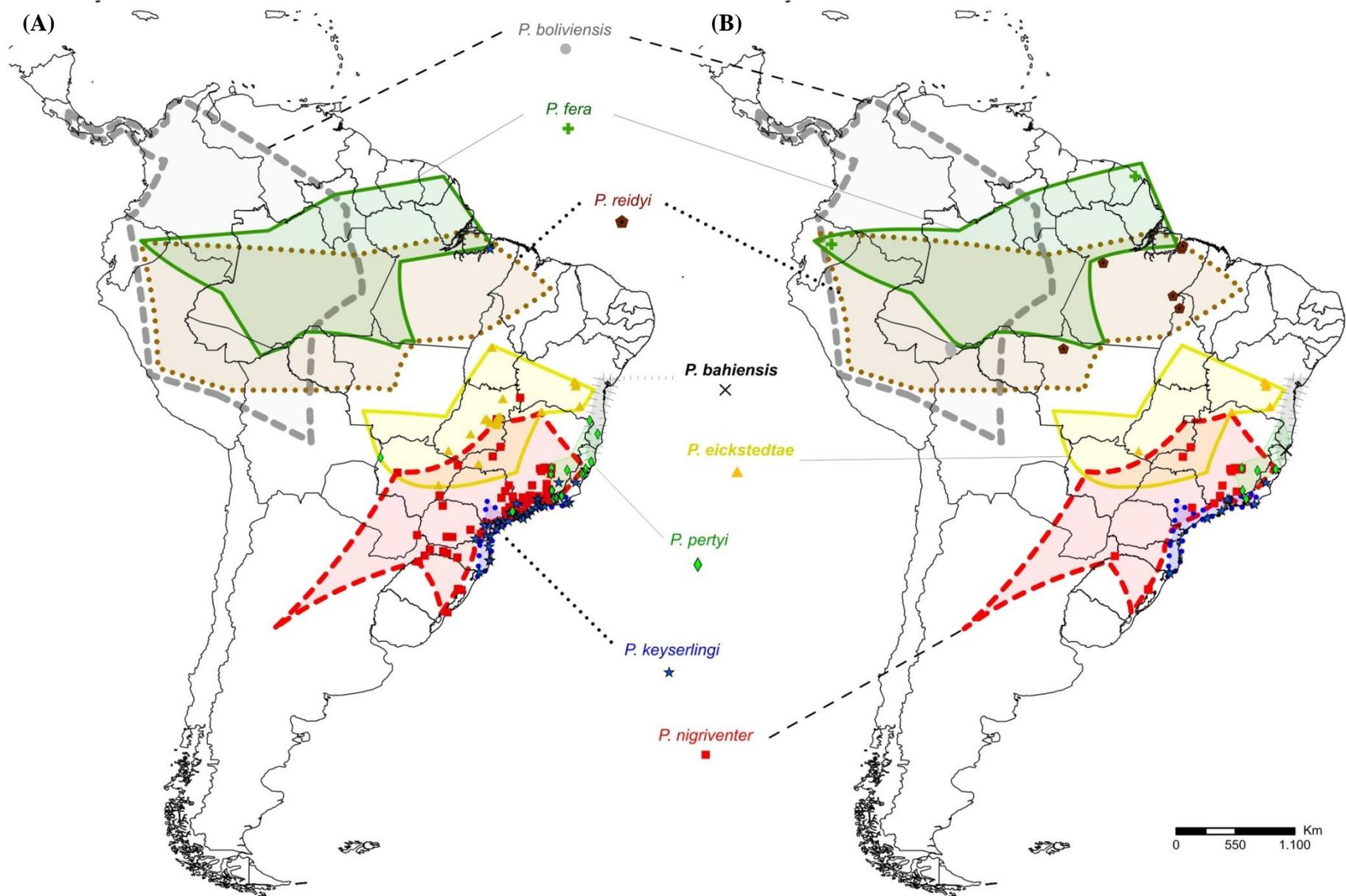


Figura 1.1: Distribuição geográfica das espécies de *Phoneutria* e localidades dos indivíduos amostrados para as análises morfométricas (A) e para análises moleculares (B).

Morfologia e Morfometria Geométrica

Uma vez que o foco da discordância é entre as espécies do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, e que essas espécies possuem morfologia da genitália bem distinta das espécies amazônicas e de *Phoneutria bahiensis* Simó & Brescovit, 2001; apenas indivíduos provenientes da área de distribuição de *P. nigriventer*, *P. pertyi*, *P. keyserlingi* e *P. eickstedtae* foram incluídos na análise morfométrica. Entretanto, os exemplares das outras espécies também foram examinados e tiveram sua morfologia comparada de forma tradicional, sem análises quantitativas.

O epígino de 144 fêmeas e o palpo esquerdo de 118 machos foram removidos e limpos, com remoção de cerdas e detritos. Imagens digitais foram obtidas utilizando uma câmera Leica DFC500 acoplada a um microscópio estereoscópio Leica M205C (Laboratório de Aracnologia, UFMG) ou Leica MZ16A (Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan). Várias imagens foram tiradas de um mesmo espécime em planos focais diferentes e, em seguida, foram processadas para formar uma única imagem multifocal utilizando o programa Leica Applications Suite versão 3.3.0 (Leica Inc.). Os espécimes-tipo do BMNH foram fotografados com uma câmera digital Canon 450D acoplada a um estereomicroscópio Zeiss Stemi SV11 no *Sackler Biological Imaging Laboratory* (BMNH). Imagens multifoco foram montadas usando o programa HeliconFocus 4.8 (<http://www.heliconsoft.com/heliconfocus.html>)

O programa tpsUtil v. 1.44 (Rohlf 2009) foi utilizado para criar o arquivo com as figuras a serem analisadas. Esse arquivo foi importado para o programa tpsDIG v. 2.16 (Rohlf 2008a), o qual foi utilizado para extrair coordenadas de dois marcos anatômicos (*landmarks*) e 98 semi-marcos (*semi-landmarks*) (Fig. 1.2). Marcos anatômicos são pontos supostamente homólogos entre as estruturas, usados como pontos de referência em análises morfométricas (Zelditch *et al.* 2004). No caso dos machos, esses pontos foram a inserção superior e inferior do êmbolo no tégulo (Fig. 1.2A). Para as fêmeas, os marcos correspondem à inserção superior da guia lateral do campo médio no campo lateral do epígino (Fig. 1.2B). Os semi-marcos correspondem a pontos igualmente espaçados ao longo do contorno da região pro-lateral do êmbolo, no caso dos machos, e do campo médio e lobo posterior do epígino, nas fêmeas.

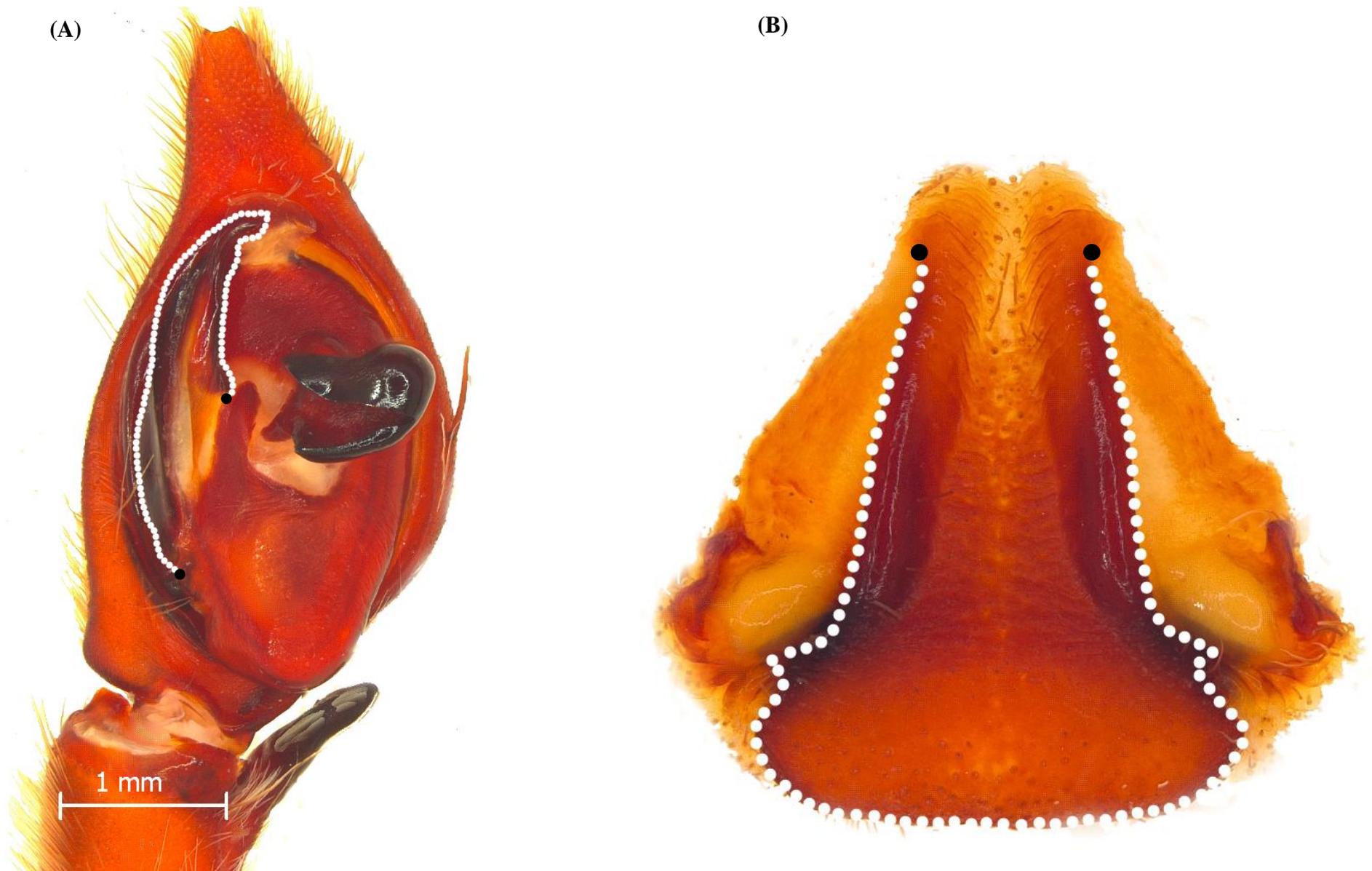


Figura 1.2: Palpo (A) e epígino (B) de *Phoneutria* mostrando os marcos anatômicos (pontos pretos) e os semi-marcos (pontos brancos) utilizados para as análises de morfometria geométrica.

As coordenadas foram sobrepostas através do método Procrustes (Rohlf 1990) e o critério utilizado para a sobreposição dos semi-marcos foi a Mínima Distância de Procrustes (Bookstein 1997). Uma Análise de Deformações Relativas (*Relative Warp Analysis*, RWA) com $\alpha = 0$, o que é equivalente a uma análise de componentes principais de variáveis da forma (Adams *et al.* 2004; Zelditch *et al.* 2004), foi empregada nas coordenadas sobrepostas dos machos e das fêmeas separadamente. O programa tpsRelw v.1.46 (Rohlf 2008b) foi utilizado para a RWA e o programa tpsUtil v. 1.44 (Rohlf 2009) foi utilizado para criar o arquivo *slider* necessário para a sobreposição dos semi-marcos.

Os indivíduos também foram examinados visualmente para a comparação da morfologia e análise qualitativa da variação de caracteres que não podem ser quantificados através da morfometria, como a coloração e estruturas tridimensionais que carecem de marcos anatômicos. Embora tenha sido dada atenção especial para caracteres já mencionadas na literatura, também foi feita uma busca por outras características ainda não descritas e que pudessem diferenciar grupos. A morfologia dos espécimes-tipo (quando possível), a distribuição geográfica e a diagnose e desenhos das espécies descritas foram então utilizadas para atribuir nomes aos grupos discriminados pelas análises morfológicas.

Dados Moleculares

Exemplares preservados em álcool 96%, e alguns preservados em álcool 70–80%, de cada um dos grupos determinados nas análises morfológicas foram utilizados para as análises moleculares. A escolha dos indivíduos foi baseada (1) na morfologia, buscando amostrar boa parte da variação morfológica presente; (2) na distribuição geográfica, tentando amostrar áreas importantes da distribuição das espécies, como extremos e áreas de contato e (3) na data de coleta, no caso de espécimes preservados em álcool 70–80%, uma vez que em espécimes muito antigos o DNA poderia estar degradado. A lista do material utilizado na análise molecular está no Anexo 2.

O DNA foi extraído a partir do músculo do fêmur de uma das pernas (aproximadamente 20mg) utilizando kits de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Protocolos e reagentes padrões para reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados para amplificar fragmentos de DNA mitocondrial de aproximadamente 700pb, compreendendo à região do gene Citocromo C Oxidase I (COI), com os *primers* universais LCO1490 (5'-ggtaacaacataaaagatattgg-3') e HC02198 (5'-taaacttcagggtgacaaaaaatca-3) (Folmer *et al.* 1994). As condições de amplificação para espécimes armazenados em álcool 96% consistiram de uma fase de desnaturação inicial de 95°C por 4min e 30seg, seguidos por 37 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, hibridização dos iniciadores por 1min a 56°C e dois minutos de extensão da cadeia a 72°C. Indivíduos armazenados em álcool 70-80% foram submetidos a condições um pouco diferentes envolvendo seis ciclos iniciais com temperatura de hibridização dos iniciadores de 50°C por um minuto e mais 34 ciclos com temperatura de 56°C. Os fragmentos amplificados foram purificados através de protocolo de limpeza com Polietilenoglicol (Polietilenoglicol 20% e NaCl 2,5M) e sequenciados utilizando kits Dynamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) em um sequenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham/Pharmacia). A qualidade das sequências e sequência-consenso para cada indivíduo foram obtidas utilizando os programas phredPHrap e Consed (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998; Gordon *et al.* 1998). Um total de 96 indivíduos foi sequenciado, sendo que 90 pertencem ao gênero *Phoneutria* e oito compõem o grupo externo (cinco espécies de *Ctenus* Walckenaer, 1805; uma de *Isoctenus* Bertkau, 1880; uma de *Cupiennius* Simon, 1891 e uma de *Nothroctenus* Badcock, 1932). Quatro sequências adicionais foram obtidas do GenBank, uma correspondente a um indivíduo de *Phoneutria fera* Perty, 1833 proveniente da Guiana Francesa (HM575999.1), e três de espécies para complementar o grupo externo: uma de *Acanthoctenus* Keyserling, 1877 (HM575996.1), uma de *Anahita fauna* Karsch, 1879 (AB564740.1), uma de *Vulsor* Simon, 1889 (HM576001.1). A escolha do grupo externo foi baseada em trabalhos recentes com a família Ctenidae (Simó & Brecovit 2001; Silva-Davila 2003; Polotow 2011) e feita de maneira a abranger alguns indivíduos de diferentes subfamílias, mas com maior amostragem de exemplares de Cteninae, subfamília

a qual pertence o gênero *Phoneutria*. Uma vez que *Vulsor* pertence à subfamília mais basal dentre os Ctenidae (Viridasiinae), ela foi utilizada para enraizar as árvores.

As sequências foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE v. 3.8.31 (Edgar 2004) com os parâmetros-padrão determinados pelo programa (o alinhamento convergiu após cinco iterações). A edição e correções manuais do alinhamento foram feitas utilizando o programa BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall 1999), resultando em um alinhamento final de 593 bases com eventos de inserção/deleção.

Inferência da Genealogia

O modelo de evolução molecular com melhor ajuste aos dados foi selecionado a partir de 56 modelos potenciais através de um teste de razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio Test*, LRT) no programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). O modelo mais adequado aos dados e utilizado para as análises posteriores foi o *General Time Reversible* com heterogeneidade de taxas entre sítios (GTR + Γ). Este modelo foi empregado para inferir a genealogia para os espécimes através de dois métodos, Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB).

A análise de ML foi feita através do programa PAUP* v. 4.0b10 (Swofford 2002) através do algoritmo *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR), cujas iterações foram restritas a um máximo de 10.000 rearranjos, a partir de uma árvore inicial obtida pelo método *Neighbour-Joining*. O relógio molecular não foi forçado e as lacunas nas sequências foram tratadas como dados ausentes. O suporte dos clados foi acessado através de *Bootstrap* com 1.000 replicações.

As análises de IB sem forçar o relógio molecular foram feitas pelo programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck *et al.* 2001). Todas as probabilidades *a priori* dos parâmetros foram deixadas no padrão do programa. Foram feitas duas corridas simultâneas, cada uma com quatro sequências de Cadeias de Markov-Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*, MCMC), sendo que três cadeias foram “aquecidas”, por 10.000.000 de gerações, com frequência de amostragem igual 1.000 gerações. Uma taxa de 25% dos

estágios iniciais da cadeia foi eliminada como *burn in*. As árvores da fase estacionária da cadeia foram então sumarizadas através de um consenso de maioria das árvores com probabilidade superior a 50%.

Uma vez que a dependência do tempo no processo evolutivo não deveria ser ignorada *a priori* (Drummond *et al.* 2006), um modelo de relógio molecular relaxado não-correlacionado foi utilizado para IB da genealogia no programa BEAST v. 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007). A taxa de mutação de cada ramo foi retirada de uma distribuição log-normal. As probabilidades *a priori* dos parâmetros foram mantidas como no padrão do programa. Também foram feitas duas corridas simultâneas com 10.000.000 de gerações de MCMC, amostradas a uma frequência de 1.000 gerações, sendo que 25% foram eliminadas como *burn in*. O programa LogCombiner v. 1.6.2 foi utilizado para combinar o arquivo de saída das duas corridas. O programa Tracer v. 1.5 foi utilizado para avaliar a performance das corridas e a árvore de maior probabilidade posterior foi sumarizada através do programa TreeAnnotator v. 1.6.2. Todos esses programas são distribuídos junto com o pacote do Beast (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>).

Teste de Hipóteses de Limites de Espécies

O método empregado aqui para testar os limites de espécies se baseia em uma abordagem coalescente proposta por Knowles & Carstens (2007), em que a probabilidade da árvore gênica (genealogia), dadas duas árvores de espécies (filogenia), é calculada. Essas duas filogenias são hipóteses de limites de espécies que podem ser testadas usando LRT. Em uma das hipóteses duas linhagens (subespécies, variações geográficas, etc.) são tratadas como pertencentes a um mesmo ramo da árvore de espécies (não há divergência). Na outra, as duas linhagens são consideradas como pertencentes a dois ramos diferentes (existe divergência). Esse método considera que tanto a filogenia quanto as genealogias são conhecidas sem erro, incluindo topologia e comprimento dos ramos. Entretanto, com dados naturais é impossível saber ao certo a filogenia e a genealogia. Kubatko *et al.* (2009) desenvolveram um método (STEM) para estimar a árvore de espécies mais verossímil a partir de árvores gênicas conhecidas, o qual posteriormente foi usado para testar limites de espécies (Carstens & Dewey 2010; Ence & Carstens 2011).

Além do pressuposto da certeza a cerca da genealogia, o STEM também considera um relógio molecular estrito. Por outro lado, programas como BEST (Liu 2008) e *BEAST (Heled & Drummond 2010) permitem a busca integrada pelas árvores de espécies e gênicas, permitindo a comparação de hipóteses de limites de espécies a partir de uma abordagem bayesiana e levando em conta a incerteza a cerca da filogenia e da genealogia (*e.g.* Carstens & Dewey 2010). Além disso, com esses métodos não é necessário forçar um relógio molecular estrito. Embora o *BEAST ainda não tenha sido usado para explorar testes de limites de espécies, essa abordagem parece ser promissora. Uma das diferenças entre BEST e *BEAST é que, no segundo, o tamanho da população pode variar ao longo dos ramos. Uma vez que o tamanho da população é importante na determinação da probabilidade de uma árvore de espécies (Maddison 1997), pode ser interessante considerar esse parâmetro em testes de hipóteses de divergências de espécies.

Neste trabalho, portanto, utilizamos o método *BEAST (Heled & Drummond 2010), disponível junto com o pacote do BEAST v. 1.6.2, para acessar a distribuição posterior de várias hipóteses de limites de espécies diferentes para populações de *Phoneutria* do sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, levando em conta a incerteza do comprimento de ramos da filogenia e da genealogia. A hipótese nula considera as quatro espécies reconhecidas atualmente para esta região como linhagens evolutivas independentes. Essa hipótese foi testada, através de fator bayesiano, contra outras hipóteses em que as espécies descritas são agrupadas de diferentes maneiras, sendo que esses agrupamentos foram baseados nas semelhanças genéticas e morfológicas observadas a partir das análises de morfometria e genealogia realizadas anteriormente.

Para acessar a distribuição posterior das hipóteses, foi utilizado um modelo de relógio molecular relaxado não-correlacionado, com distribuição log-normal das taxas em cada ramo. Uma vez que há apenas um registro fóssil para Ctenidae, e sua posição filogenética não é conhecida (Dunlop *et al.* 2012) foi necessário fornecer informações *a priori* sobre a média da taxa de mutação. Esse *prior* foi determinado por uma distribuição log-normal, com média de 0,0115 e Log (desvio padrão) igual 0,01 (para o parâmetro *uclid.mean*). Dessa forma é possível acrescentar incertezas a respeito da taxa, mas

assumindo que o valor esteja próximo de 0,0115 mutações por milhão de anos. Esse valor foi baseado na taxa proposta por Brower (1994) a partir da comparação de dados de sequências mitocondriais e datas de divergências (inferidas através de eventos geológicos) de diferentes grupos de Arthropoda. Essa taxa tem sido utilizada em alguns estudos recentes com aranhas (Hedin 2001; Chang et al. 2007; Framenau et al., 2010; Rix & Harvey 2012). Todos os outros *priors* foram mantidos como no padrão do programa. Foram utilizadas, para cada hipótese, duas corridas de 10.000.000 de gerações, amostrando com uma frequência de 1.000. A diferença entre as hipóteses foi testada através do Fator Bayesiano utilizando o programa Tracer v. 1.4 e a árvore de espécies de maior probabilidade posterior da melhor hipótese foi sumarizada com o programa TreeAnnotator v. 1.6.2.

RESULTADOS

Morfologia

A RWA dos machos revelou três grupos cuja morfologia do êmbolo é bem distinta (Fig. 1.3). O primeiro eixo distingue um grupo de indivíduos que possuem a região pró-lateral do êmbolo mais reta (escores positivos no gráfico da Fig. 1.3) dos indivíduos dos outros dois grupos, cujo embolo é curvo (escores negativos). Esses dois grupos são discriminados pelo segundo eixo da RWA, onde valores mais altos indicam curvatura mais acentuada na região apical, enquanto que valores mais baixos indicam curvatura mais acentuada na região basal.

Comparando a morfologia e a distribuição geográfica dos grupos encontrados na análise morfométrica com as descrições, diagnoses, desenhos e distribuição apresentadas na literatura, é possível concluir que: (1) o grupo que apresenta o êmbolo com a curvatura acentuada na base corresponde à espécie nominal *Phoneutria pertyi*; (2) o grupo morfométrico formado por indivíduos que possuem êmbolo com ápice mais curvo correspondem à *P. keyserlingi*; e (3) os espécimes do grupo cujo êmbolo é

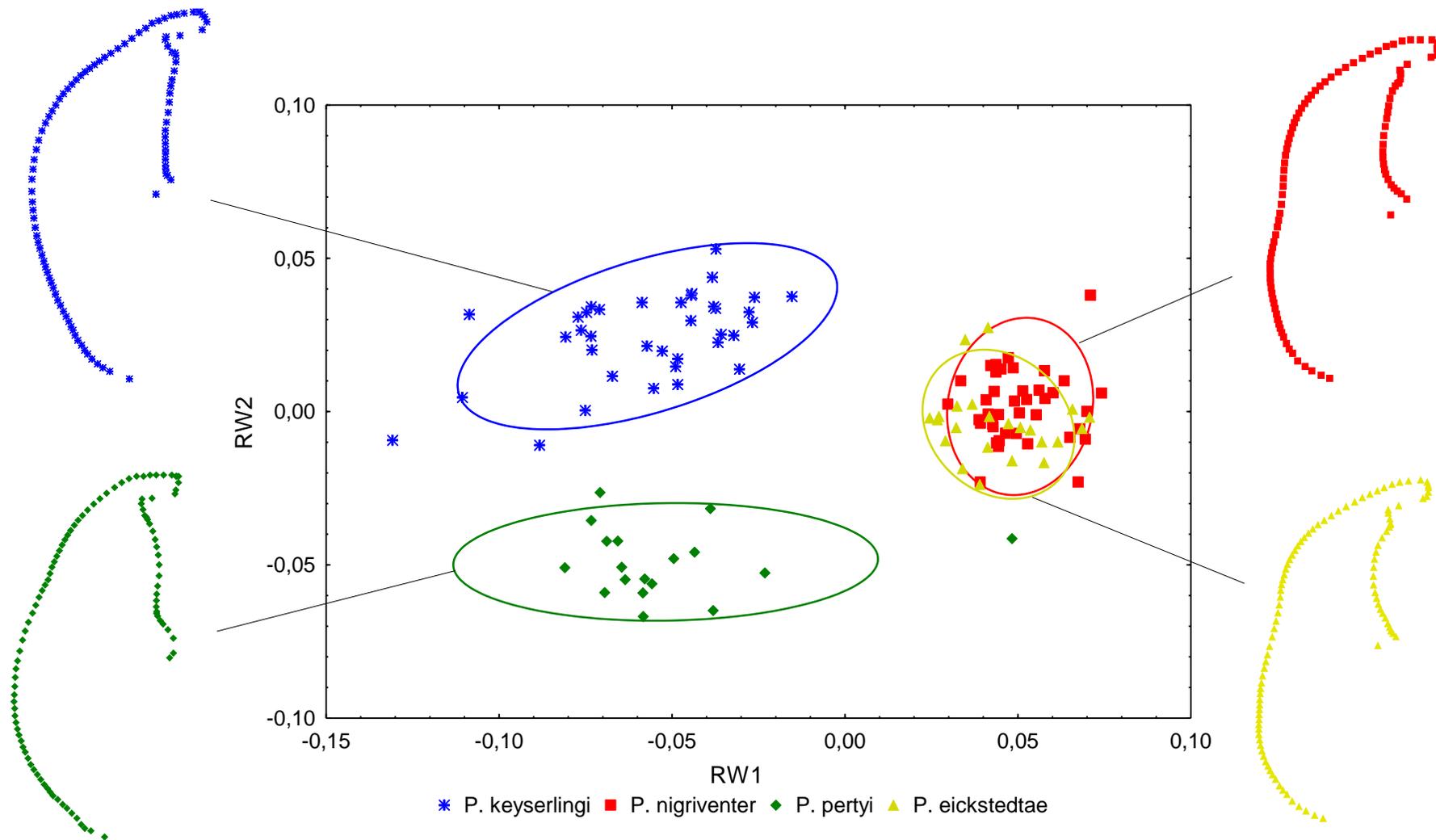


Figura 1.3: Análise de deformações relativas (RWA) do êmbolo de *Phoneutria* baseada em dois marcos anatômicos e 98 semi-marcos. O primeiro e segundo eixo explicam 60% e 14% da variação, respectivamente. Elipses representam intervalo de confiança de 95%. As figuras ao redor do gráfico representam a forma estimada para o centróide de cada espécie.

(A)



(B)



Figura 1.4: Padrão de coloração ventral do abdômen: (A) *P. nigriventer*, fêmea de Catalão, Goiás (UFMG4057); (B) *P. eickstedtae*, fêmea de Serranópolis, Goiás (UFMG5269).

reto pertencem à *P. nigriventer* (*sensu* Martins e Bertani 2007) e à espécie mais recentemente descrita *P. eickstedtae*, que diferem apenas pelo padrão de coloração ventral do abdômen (Fig. 1.4).

A análise de RWA para as fêmeas, por outro lado, não discriminou grupos de indivíduos com base na forma do campo médio e do lobo posterior do epígino (Fig. 1.5). Os valores mais altos no primeiro eixo da RWA indicam epíginos mais estreitos na região posterior do campo médio. No segundo eixo, valores mais altos indicam constrição mais acentuada entre o campo médio e o lobo posterior.

Examinando a morfologia dos espécimes, e comparando sua localidade com a distribuição geográfica dos machos, foi possível perceber caracteres na genitália não quantificados pela morfometria que podem ajudar a distinguir *P. nigriventer*, *P. pertyi* e *P. keyserlingi*, embora também apresentem aparentemente grande variação intraespecífica. Apenas *P. eickstedtae* e *P. nigriventer* parecem não apresentar genitália distinta, sendo o padrão de coloração ventral do abdômen a única diferença morfológica aparente entre elas (Fig. 1.4).

Genealogias

As árvores obtidas pelo método ML e IB sem assumir relógio molecular (utilizando o MrMayes) e IB com relógio molecular relaxado (realizado no Beast) foram muito semelhantes no que diz respeito às relações filogenéticas entre espécimes de *Phoneutria* (Figs. 1.6; 1.7). Entretanto, apenas a análise bayesiana com relógio molecular relaxado recupera *Phoneutria* como um grupo monofilético. Nas outras duas, um grupo formado por *Ctenus ornatus* (Keyserling, 1877), *C. inaja* Höfer, Brescovit & Gasnier, 1994 e *C. crulsi* apresenta-se como grupo irmão de *P. bahiensis* (Fig 1.6). A comparação, através de fator bayesiano, dos modelos gerados pelo MrBayes e pelo BEAST favorece fortemente o modelo de relógio molecular relaxado ($B_{01}=195,52$, sendo M_0 o modelo com relógio molecular relaxado e M_1 o modelo sem forçar relógio molecular). Além disso, o monofiletismo de *Phoneutria* é bem sustentado por análises morfológicas (Simó & Brescovit 2001; Polotow 2011). Portanto, os resultados e discussão são focados na hipótese obtida pelo BEAST. De qualquer forma, a escolha dessa árvore genealógica não interfere nas

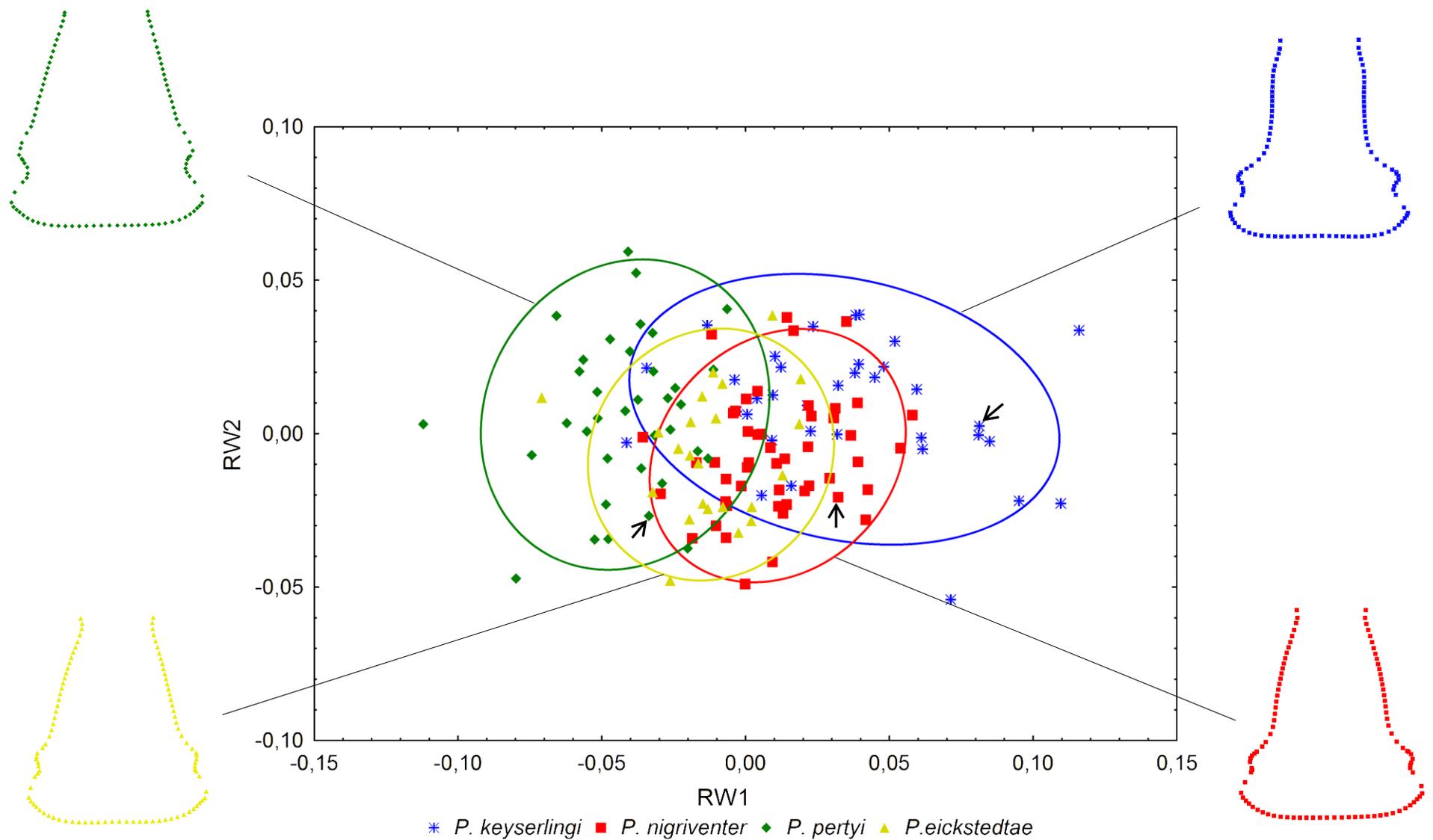


Figura 1.5: Análise de deformações relativas (RWA) do epígino de *Phoneutria* baseada em dois marcos anatômicos e 98 semi-marcos. O primeiro e segundo eixo explicam 42% e 14% da variação, respectivamente. Elipses representam intervalo de confiança de 95%. As figuras ao redor do gráfico representam a forma estimada para o centróide de cada espécie. Setas indicam a posição dos espécimes-tipo.

propostas e testes sobre os limites das espécies-alvo desse estudo, uma vez que *P. nigriventer*, *P. pertyi*, *P. keyserlingi*, e *P. eickstedtae* formam um grupo monofilético com alto suporte, recuperado em todas as análises com topologia muito similar.

A genealogia sugere a divisão do gênero *Phoneutria* em dois grupos com suporte a cima de 90% de probabilidade posterior (Fig.1.7). Um deles, o qual será chamado de grupo *fera* daqui pra frente, é formado por *P. bahiensis* e as espécies amazônicas *P. fera* Perty, 1833, *P. reidy* (F. O. P.-Cambridge, 1897) e *P. boliviensis* (F. O. P.-Cambridge, 1897). Todas essas espécies são monofiléticas e apresentam suporte alto (99%). Essas três últimas se agrupam em um clado com suporte de 85%, porem as relações dentro dele não são claras.

As espécies alvo das controvérsias taxonômicas se agrupam no segundo grupo de aranhas do gênero *Phoneutria*, o grupo *nigriventer*. Esse grupo apresenta uma dicotomia basal a qual o separa em dois outros subgrupos. Um deles, com o suporte baixo (59% de probabilidade posterior), é composto por indivíduos de *P. pertyi* e *P. keyserlingi*, sendo que elas não são reciprocamente monofiléticas. Quatro indivíduos de *P. keyserlingi*, dois provenientes do sul do Rio de Janeiro e dois do Espírito Santo, são mais aparentados com indivíduos *P. pertyi* (Fig.1.7). Esse dois indivíduos representam registros ainda não documentados na literatura para *P. keyserlingi*. As três principais linhagens dentro desse subgrupo apresentam alto suporte (>97% de probabilidade posterior). O segundo subgrupo possui um suporte alto (93%) e é formado por *P. nigriventer* e *P. eickstedtae*. Os indivíduos de *P. eickstedtae* provenientes do leste da Bahia e norte de Minas Gerais estão agrupados em um clado com suporte baixo (62%), porém, outros indivíduos dessa espécie, provenientes do sul de Goiás, são mais relacionados com indivíduos de *P. nigriventer* (Fig 1.7).

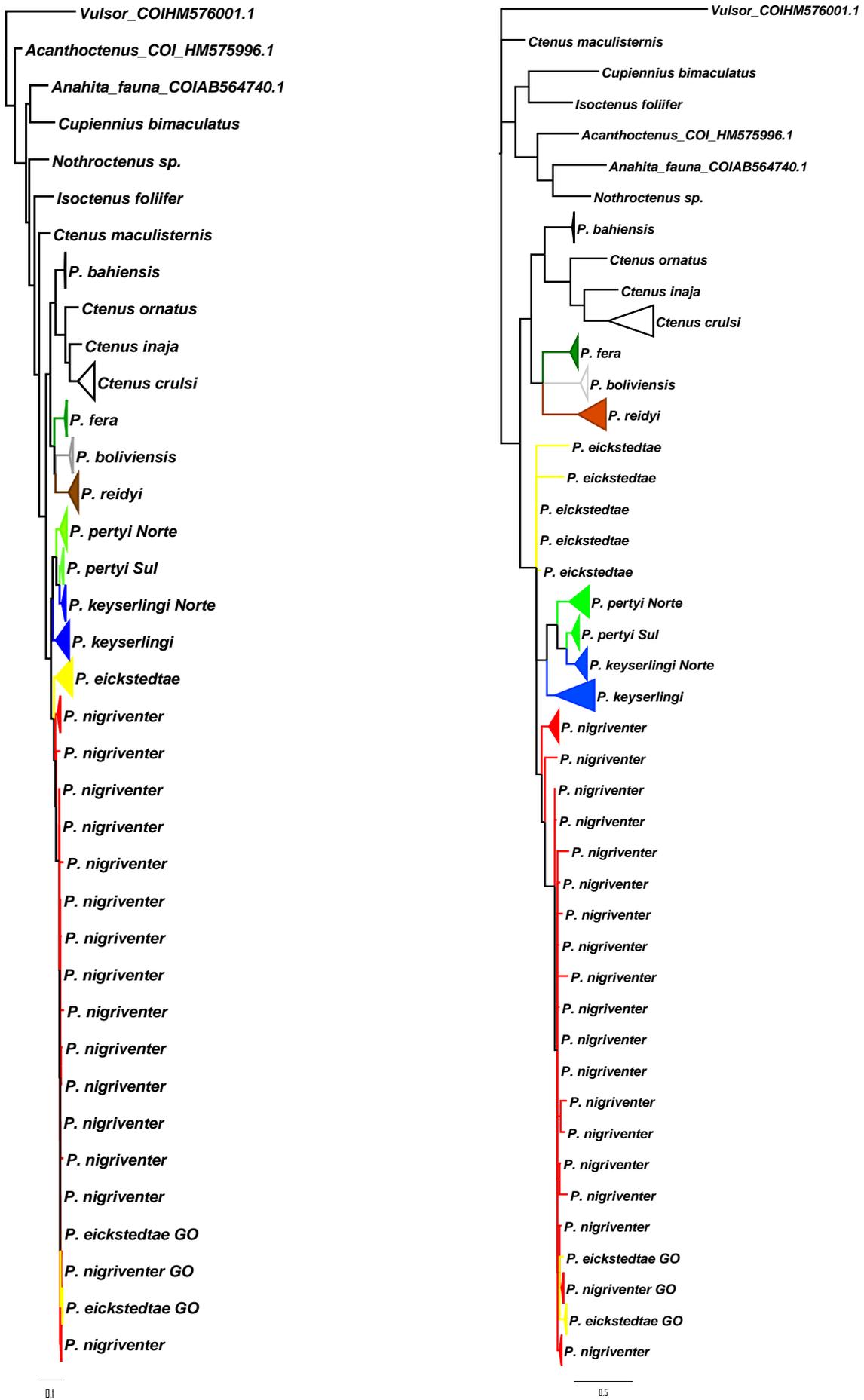


Figura 1.6: Árvore de máxima verossimilhança (A) e consenso de maioria da inferência bayesiana (B) para o gene mitocondrial COI. Nenhuma das análises assume relógio molecular.

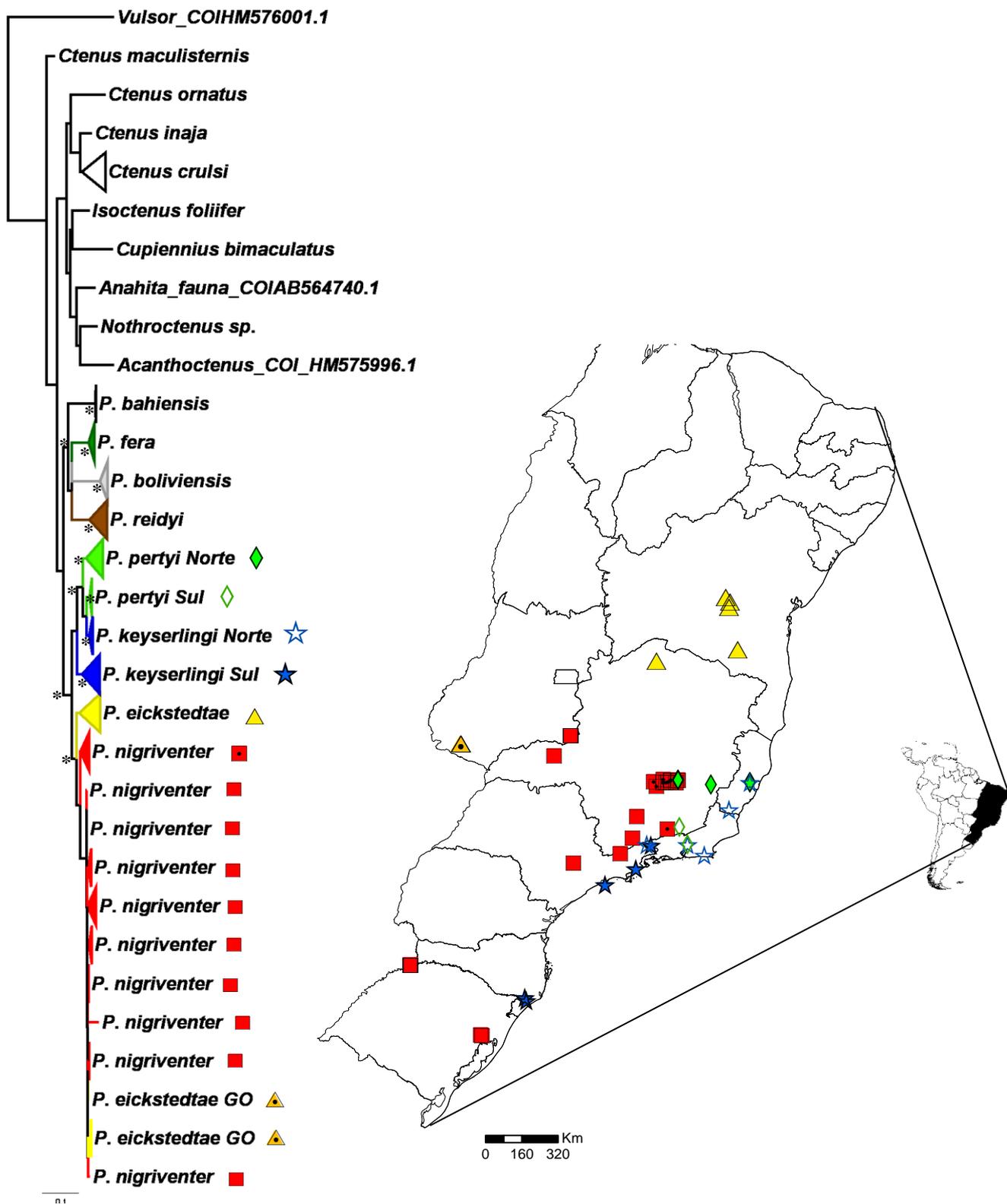


Figura 1.7: Árvore de maior probabilidade posterior obtida através de inferência bayesiana (assumindo relógio molecular relaxado) e localização geográfica dos indivíduos do gr. *nigriventer* amostrados. Nós com probabilidade posterior igual ou maior que 90% estão indicados com *.

Limites de Espécies

Baseado nos resultados acima foram propostas quatro hipóteses para testar os limites entre as espécies do grupo *nigriventer*. A primeira delas (H1) trata cada uma das quatro espécies descritas como linhagens separadas, considerando *P. nigriventer*; *P. pertyi*, *P. keyserlingi*, e *P. eickstedtae* como espécies válidas, assim como está atualmente proposto pela literatura. De acordo com H1, os casos de parafiletismo observados na árvore seriam devido à presença de polimorfismos ancestrais e as características morfológicas apresentadas por Martins & Bertani (2007) seriam realmente indicativas da divergência entre elas.

Tendo em vista que *P. nigriventer* e *P. eickstedtae* são geneticamente e morfológicamente muito similares entre si, mas relativamente diferentes das outras duas espécies, foi proposta a segunda hipótese (H2). Nela, os indivíduos de *P. nigriventer* e *P. eickstedtae* são unidos em um mesmo ramo da árvore filogenética enquanto que *P. keyserlingi* e *P. pertyi* são mantidos separados, compondo três espécies no grupo *nigriventer*. Segundo H2, haveria uma grande probabilidade de *P. nigriventer* e *P. eickstedtae* não serem geneticamente divergentes e a série de pontos longitudinais presentes no ventre do abdômen de indivíduos da segunda espécie nominal seria apenas uma variação intraespecífica.

Phoneutria keyserlingi e *P. pertyi* apresentam genitálias com algumas diferenças morfológicas, sendo que essas diferenças são mais claras apenas nos órgãos genitais masculinos. Entretanto, a genealogia indica que essas duas espécies podem ser geneticamente muito próximas. Como diferenças na genitália podem não ser um indicativo de limites entre espécies, devido, por exemplo, à presença de polimorfismo (Huber 2004), a terceira hipótese (H3) considera *P. keyserlingi* e *P. pertyi* como uma mesma linhagem evolutiva. Nesta hipótese, *P. nigriventer* e *P. eickstedtae* são mantidas como linhagens distintas, novamente compondo três espécies no grupo *nigriventer*. Por último, considerou-se outra hipótese (H4) em que haveria apenas duas linhagens evolutivas dentro do grupo *nigriventer*: uma composta por *P. keyserlingi* e *P. pertyi* e outra por *P. nigriventer* e *P. eickstedtae*.

A análise do fator bayesiano favorece significativamente H2 acima das outras duas hipóteses, como mostra a Tabela 1. Portanto, os dados genéticos indicam que seria mais plausível considerar três espécies válidas dentro do grupo *nigriventer* como linhagens evolutivas independentes. A árvore de espécies de maior probabilidade posterior encontrada em H2 é muito similar às genealogias observadas (Fig. 1.8). A principal diferença entre elas é que na árvore de espécies *P. keyserlingi* apresenta-se como espécie irmã de *P. nigriventer* com uma probabilidade posterior de 92%, enquanto que, nas genealogias, *P. keyserlingi* parece ser mais próximo de *P. pertyi* (embora essa relação apresente suporte de apenas 0,59%). A árvore de espécies também mostra *P. fera* e *P. reidi* como irmãs, com alto suporte (99%).

Tabela 1.1: Fatores Bayesianos ($B_{01}=M_0/M_1$) para comparações entre as hipóteses de limites de espécie e o logaritmo da verossimilhança de cada modelo. Valores maiores que 4 indicam evidência significativa contra M_1 .

$M_1 \backslash M_0$	H1	H2	H3	H4	Ln P(modelo dados)
H1	-	0.007	8.78	0.029	-5065.714
H2	151.52	-	1330.4	4.353	-5060.693
H3	0.114	0.001	-	0.003	-5067.887
H4	34.808	0.23	305.62	-	-5062.164

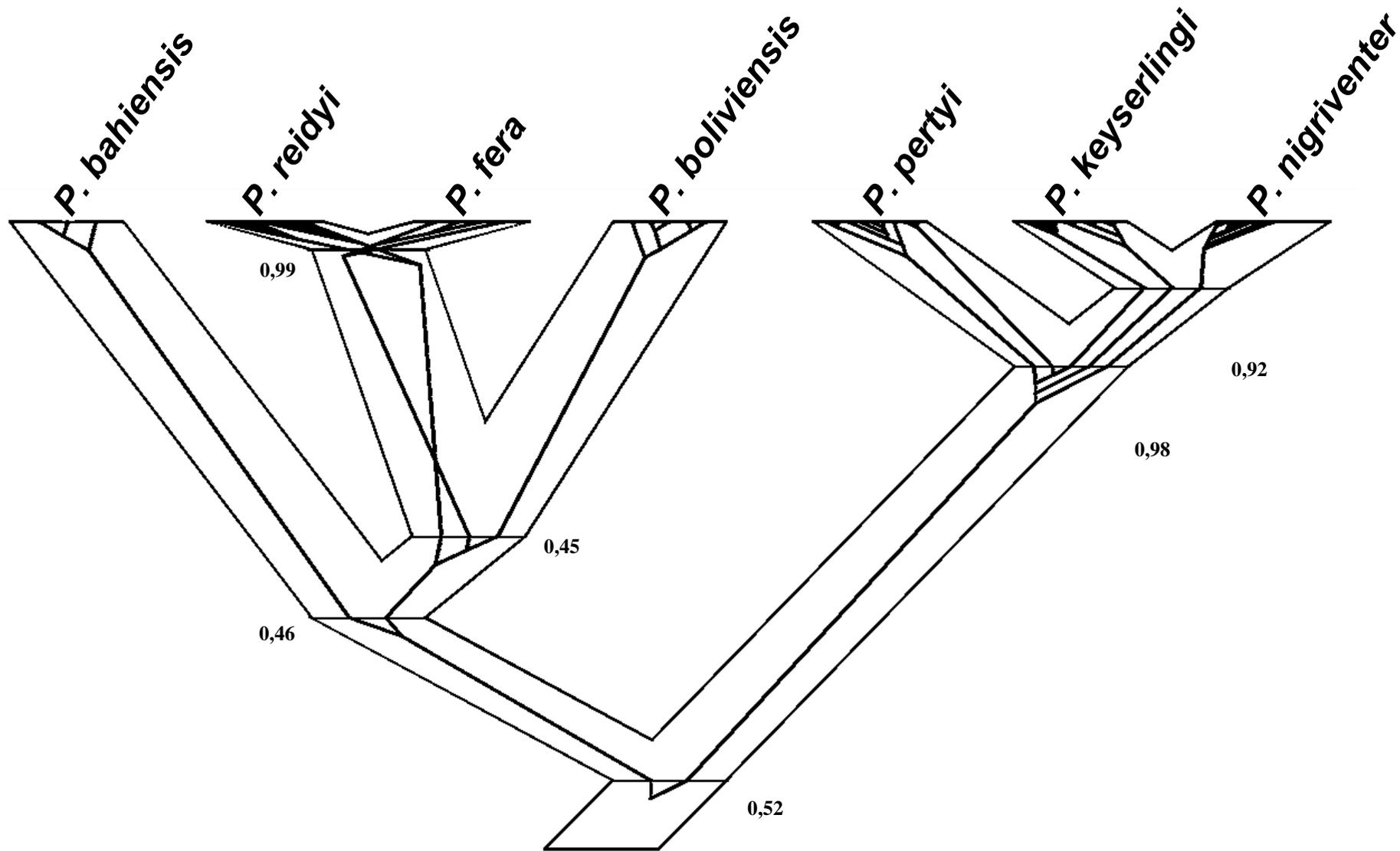


Figura 1.8: Filogenia de *Ponetria* estimada a partir de abordagem coalescente multi-espécies. Árvore do gene mitocondrial COI representada dentro da árvore de espécies. Números nos nós representam a probabilidade posterior do clado da árvore de espécies.

DISCUSSÃO

Limites de Espécies

Embora as características nos órgãos genitais tenham, atualmente, grande importância na sistemática de aranhas, sua importância como critério decisivo na delimitação de espécies tem sido questionada (Huber 2004). Isso se deve basicamente a dois fatores. Por um lado, temos descrição de alguns exemplos de polimorfismos genitálicos (Joqué 2002). Por outro lado, temos a descoberta de espécies irmãs que possuem órgãos copulatórios indistintos, mas se diferenciam em outros aspectos da biologia (e.g. Bond & Stockman 2008, Huber *et al.* 2005). Não se sabe ao certo o quão frequente esses fenômenos podem ser, mas é fato que eles podem dificultar a delimitação de espécies.

Baseados nessas ideias, portanto, testamos diferentes cenários evolutivos de divergência entre espécies a partir de uma abordagem coalescente (Knowles & Carstens 2007) para tentar resolver a taxonomia de *Phoneutria*. *Phoneutia nigriventer* e *P. eickstedtae* não apresentam diferenças quanto à genitália masculina e feminina, e distinguem-se apenas pelo padrão de coloração ventral do abdômen. A genealogia do mtDNA também mostra uma relação evolutiva muito próxima entre essas duas espécies. Poderíamos então, imaginar um cenário de divergência recente entre elas, sem diferenciação da genitália, mas com diferenciação da coloração do abdômen. Isso iria contra a hipótese de rápida evolução da genitália de artrópodes, quando comparada a outros caracteres (Eberhard 2010). Huber (2003) sugere a partir de exemplos com aranhas da família Pholcidae que esse fenômeno pode ser mais comum do que imaginamos. Entretanto, esse cenário foi refutado pelo teste de hipóteses de limites de espécies aqui empregados. Um modelo que considera as duas formas de coloração do abdômen como pertencentes a uma mesma linhagem evolutiva tem maior probabilidade, segundo os nossos dados. Assim, *P. nigriventer* e *P. eickstedtae* podem ser considerados sinônimos, e a coloração do abdômen seria apenas uma variação morfológica de uma mesma espécie.

Phoneutria nigriventer (delimitada como propomos a cima) apresenta genitália muito diferente de *P. pertyi* e *P. keyserlingi*. Essas duas últimas apresentam morfologia da genitália masculina com certa semelhança entre si, mas não ao ponto de serem indistinguíveis. Entretanto, as diferenças entre a genitália das fêmeas não são tão claras assim. Uma vez que a genealogia mostra que essas espécies são geneticamente muito próximas e que não há monofiletismo recíproco, poderíamos imaginar que essas duas formas são mais um exemplo de uma única espécie com polimorfismo genal. Entretanto, essa hipótese foi refutada pelos nossos testes. O modelo mais provável sugere que essas duas espécies sejam mesmo linhagens evolutivas diferentes e que a falta de monofiletismo recíproco seria devido a um polimorfismo ancestral. Ao longo da divergência de duas espécies, elas passam por uma fase de polifiletismo, depois por um momento em que apenas uma é monofilética e a outra é parafilética, para então atingir o monofiletismo recíproco (Avice *et al.* 1987). Um *locus* mitocondrial, segundo a teoria coalescente, teria 95% de chance de atingir o monofiletismo em $2.20 N_e$ gerações (Hudson & Coyne 2002). Assim, retenção de polimorfismo ancestral pode ser comum, principalmente em espécie de divergência recente e tamanho efetivo da população grande. Exemplos de retenção de polimorfismo ancestral entre espécies próximas já foram observados em gafanhotos, grilos, golfinhos, lagartos e lêmures (Carstens & Knowles 2007; Cummings *et al.* 2008; Leaché *et al.* 2009; Weisrock *et al.* 2010).

Os modelos aqui utilizados para testar as hipóteses levam em consideração como causa de discordância entre árvores de espécies e árvores gênicas apenas a existência de polimorfismo ancestral (Knowles & Carstens 2007). A transferência horizontal de genes, através, por exemplo, de hibridação, também pode ser fonte de confusão entre a filogenia e genealogia, principalmente entre espécies próximas (Maddison 1997). Uma vez que dois dos os indivíduos de *P. keyserlingi* (UFMG4895 e IBSP99099) que apresentam haplótipos mais relacionados com indivíduos de *P. pertyi* estão localizados na área de contato entre as duas espécies, e os outros dois (UFMG3629 e MNRSst1) representam novos registros muito mais ao norte da distribuição conhecida até então para *P. keyserlingi*, não podemos descartar a possibilidade de ter ocorrido introgressão em algum momento da evolução dessas duas linhagens. Seria interessante por

tanto, aumentar a amostragem dessas duas espécies, de formar a abranger bem a área de distribuição e explorar o fluxo gênico entre elas para saber se ele realmente é desprezível (Carstens & Dewey 2010). Outra maneira de aprimorar os modelos para testes de limites de espécies baseados na história coalescente das populações seria aumentando o número de *loci* amostrados (Knowles & Carstens 2007). De qualquer maneira, os resultados apresentados aqui fornecem informações adicionais importantes a cerca da evolução das linhagens de *Phoneutria* e nos permite fazer inferências confiáveis a respeito dos limites entre essas espécies.

Morfologia

Nossos resultados morfométricos revelam que os machos de *P. nigriventer*, *P. pertyi* e *P. keyserlingi* apresentam diferenças evidentes quanto à morfologia da genitália. A morfometria geométrica do êmbolo mostra que a forma dessa estrutura apresenta uma clara descontinuidade entre essas espécies. Segundo essa análise, a principal diferença entre elas está relacionada com a curvatura da margem pró-lateral do êmbolo, caráter esse que já havia sido mencionado como distintivo entre *P. nigriventer* e *P. keyserlingi*, sendo reto na primeira (Eickstedt 1979, Martins e Bertani 2007). Martins e Bertani (2007) argumentam que *P. pertyi* se diferencia pela ponta do êmbolo em forma de gancho, o que não é mostrado pela morfometria. Entretanto, *P. pertyi* apresenta curvatura mais acentuada na região basal do êmbolo, enquanto que em *P. keyserlingi* a curvatura se concentra na região superior.

Ao contrário dos machos, a genitália das fêmeas apresenta grande variação intraespecífica no formato, o que parece superar as diferenças entre as espécies. Infelizmente, alguns caracteres não podem ser quantificados através de métodos de morfometria. Esses caracteres são, em trabalhos taxonômicos, analisados qualitativamente e classificados em categorias que possam ser capazes de diferenciar espécies. Quando caracteres apresentam certa variação, geralmente levam autores diferentes a discordarem quanto à utilidade de um determinado caráter para distinguir espécies. Entretanto, mesmo com certa variação, eles podem, em conjunto com outros caracteres, ajudar a discriminar as espécies.

O formato da guia lateral do epígino em *Phoneutria* é considerado por alguns autores como um caráter capaz de diferenciar *P. nigriventer* de *P. keyserlingi* (Eickstedt 1979, Martins e Bertani 2007), enquanto que para outros, a guia lateral é um caráter que poderia representar uma variação intraespecífica (Simó & Brescovit 2001). Embora um pouco variável, esse caráter parece ajudar a distinguir essas duas espécies. Em *P. keyserlingi* a guia lateral é, frequentemente, comprimida lateralmente, principalmente na região posterior (Fig. 1.9D). Algumas vezes ela pode se apresentar mais cilíndrica na região anterior, enquanto que em *P. nigriventer* ela é cilíndrica ao longo de toda a sua extensão (Fig. 1.9A). *Phoneutria keyserlingi* também se diferencia pela região posterior da concavidade da abertura copulatória frequentemente mais dilatada e envolvendo parte da base da espermateca (Fig. 1.10D). Esse caráter pode algumas vezes ser observado em *P. pertyi*, porém não é tão evidente (Fig. 1.10C).

Phoneutria pertyi pode apresentar tanto guia lateral mais cilíndrica, lembrando *P. nigriventer*, quanto mais laminar, lembrando *P. keyserlingi*. Porém, *P. pertyi* apresenta a região posterior do campo médio, próximo ao lobo posterior, mais elevada e quase contígua com a guia lateral (Fig. 1.9C). Martins & Bertani (2007) mencionam uma projeção lateral da espermateca como um caráter que diferenciaria *P. pertyi* das demais espécies. Embora alguns espécimes de *P. keyserlingi* aparentam apresentar uma leve projeção, esse caráter é bem mais evidente em *P. pertyi*, e poderia realmente ser usado como diagnóstico (Fig. 1.10C).

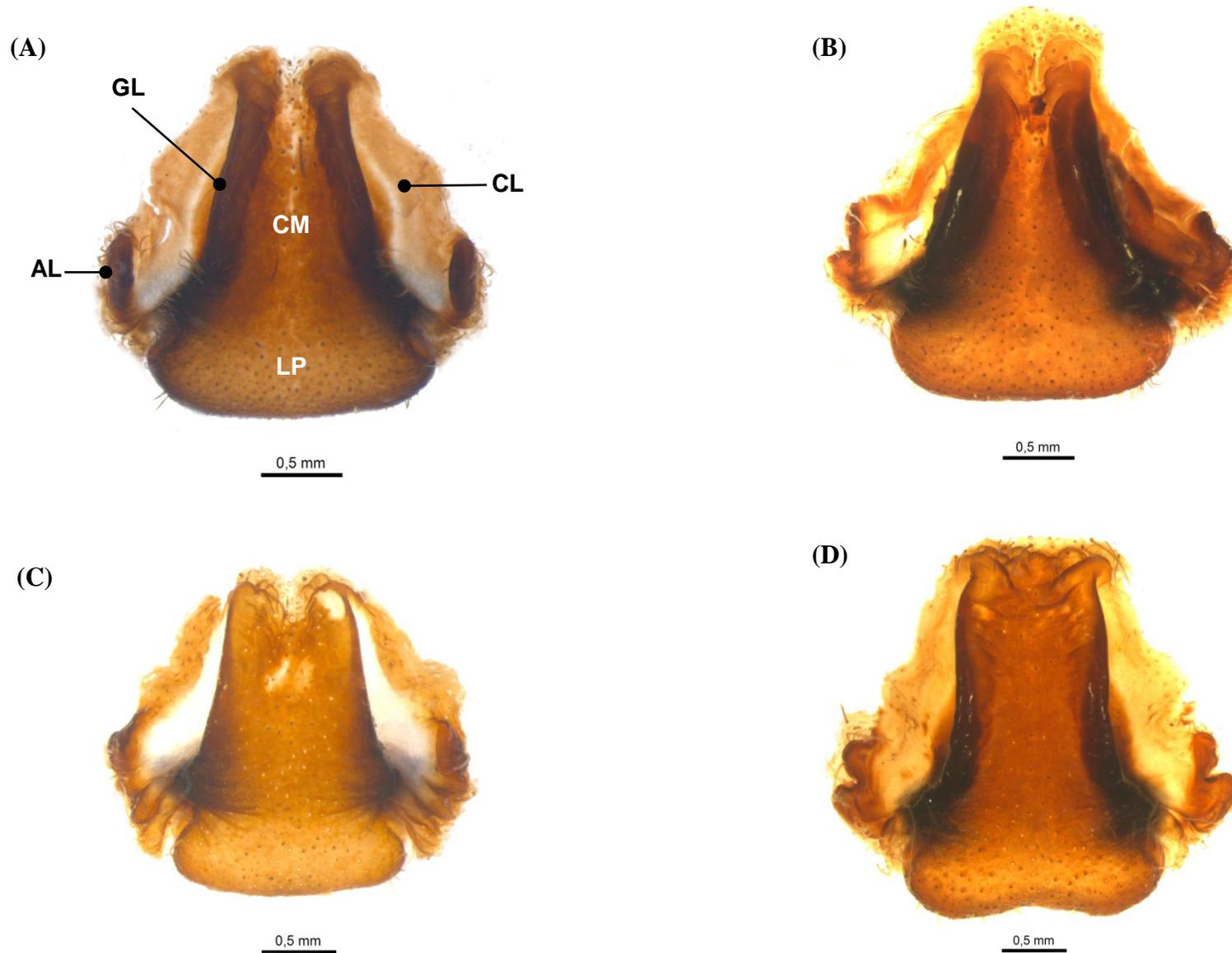


Figura 1.9: Epígino, vista ventral. (A) *Phoneutria nigriventer* UFMG4168; (B) *P. eickstedtae* UFMG3614; (C) *P. pertyi* IBSP3402; (D) *P. keyserlingi* IBSP2186. AL= Apófise lateral; CL= Campo lateral; CM= Campo médio; GL= Guia lateral; LP= Lobo posterior.

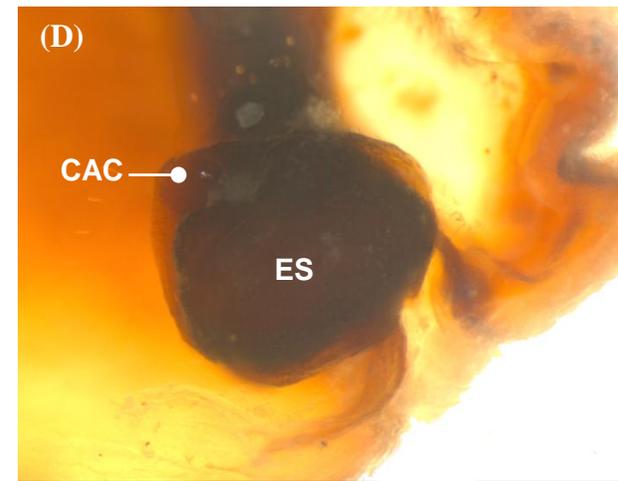
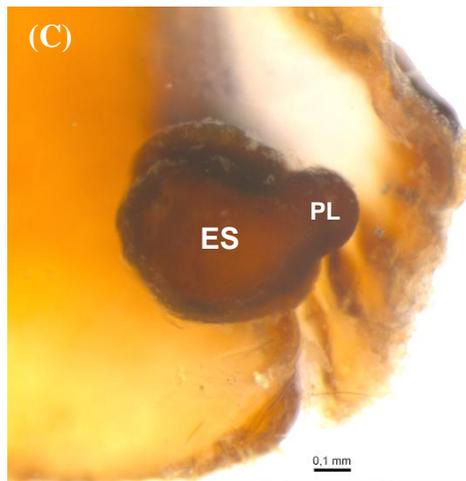
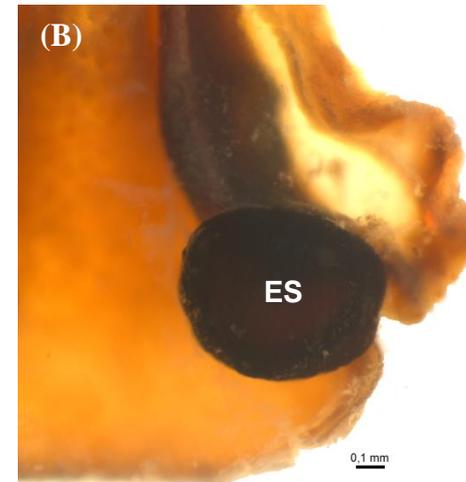
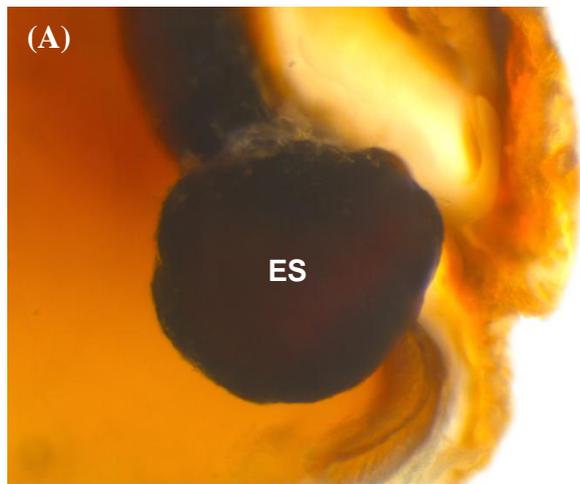


Figura 1.10: Espermateca vista dorsal. **(A)** *Phoneutria nigriventer* UFMG4168; **(B)** *P. eickstedtae* UFMG3614; **(C)** *P. pertyi* IBSP3402; **(D)** *P. keyserlingi* IBSP2186. **ES**= Espermateca; **CAC**= Região posterior da concavidade da abertura copulatória; **PL**= Projeção lateral da espermateca.

O último trabalho de revisão de *Phoneutria* (Martins & Bertani 2007) conta com a descrição de *P. eickstedtae*, a qual poderia ser diferenciada de *P. nigriventer* pela forma do êmbolo, lobo posterior do epígino, número de sulcos na base da apófise lateral do epígino e coloração do abdômen. Entretanto, os resultados aqui apresentados sugerem que essas espécies não seriam linhagens evolutivas independentes. As análises morfométricas não mostram nenhuma diferença na forma do êmbolo e do lobo posterior do epígino. O número de sulcos na base da apófise lateral do epígino varia bastante entre as espécies e não indica claramente um limite entre elas. Apenas o padrão de coloração do abdômen parece apresentar duas formas um pouco menos variáveis. Entretanto apenas a coloração do abdômen não parece ser evidência suficiente, comparada às demais informações que levantamos, para indicar limite entre espécies. Isso só mudaria caso fosse demonstrado que esse caráter pode ter passado por uma pressão seletiva extremamente forte, a ponto de evoluir tão rapidamente que os sinais em outros aspectos biológicos, como mtDNA e morfologia da genitália, não teriam aparecido. Uma vez que a cópula em *P. nigriventer* não apresenta um ritual de cortejo elaborado, envolvendo apenas movimentos dos palpos (Folly-Ramos *et al.* 2002), pode-se descartar seleção sexual como uma pressão que levaria à divergência da coloração do abdômen. Portanto, essas duas espécies poderiam ser consideradas sinônimas.

De uma maneira geral, a genitália dos machos apresentou divergência muito mais acentuada do que a das fêmeas. Crews (2009), em um estudo com morfometria de aranhas do gênero *Homalonychus* Marx, 1891 (Homalonychidae) também observou maior divergência na forma em estruturas da genitália masculina do que em femininas. Machos de espécies de *Trochosa* (C.L. Koch, 1848) (Lycosidae) podem ser distinguidos visualmente pela morfologia do palpo, mas as fêmeas apresentam pouca diferenciação e apenas algumas espécies podem ser separadas por análises morfométricas da genitália (Milasowszky *et al.* 1998; Hepner & Milasowsky 2006). Maior diferenciação da genitália masculina parece ser comum em vários grupos e várias teorias existem para explicar a rápida evolução da genitália (Hosken & Stockley 2004; Eberhard 2010). Embora nem sempre as teorias sejam exclusivas, evidências sugerem que a seleção sexual por escolha críptica das fêmeas seja o mecanismo mais comum envolvido na evolução da genitália

(Eberhard 2010). Recentemente, um estudo com Mantodea revelou uma correlação entre o sucesso de transferência de esperma e a forma da genitália, sugerindo que a competição entre machos pode ter um papel importante na seleção da morfologia genital (Holwellet *al.* 2010). O formato da genitália masculina e feminina em *Phoneutria* pode ser um interessante campo para estudos futuros sobre evolução sexual e divergência dos órgãos copulatórios.

Filogenia

Há apenas uma única análise cladística, utilizando caracteres morfológicos e de comportamento, voltada para resolver as relações filogenéticas do gênero *Phoneutria* (Simó & Brecovit 2001). Nela, *P. boliviensis* aparece como grupo-irmão de *P. nigriventer* (que foi considerado sinônimo-sênior de *P. pertyi* e *P. keyserlingi*) e *P. reidyi* aparece como irmã do clado formado por *P. bahiensis* + *P. fera*. A filogenia aqui obtida, baseada em dados moleculares, não recupera essas relações. Aqui observamos que as espécies amazônicas *P. fera*, *P. reidyi* e *P. boliviensis* formam um grupo monofilético com baixo suporte, sendo que *P. fera* e *P. reidyi* são espécies irmãs fortemente sustentadas. *P. bahiensis* por sua vez, apresenta-se como irmão desse grupo amazônico. Essa relação entre *P. fera* e *P. reidyi* também é observada em uma análise cladística recente da subfamília Cteninae, na qual foram amostradas seis espécies de *Phoneutria* (Polotow 2011).

Embora as análises morfológicas recuperem *Phoneutria* como monofilético, a filogenia obtida com os dados moleculares apresenta baixo suporte para esse grupo (52%). Além disso, algumas genealogias obtidas a partir de ML e IB sem assumir relógio molecular mostram *Phoneutria* como parafilético. Entretanto, as análises aqui empregadas foram baseadas em um gene mitocondrial com elevada taxa de mutação e, portanto, não é de se esperar que ele resolva claramente relações mais profundas na filogenia (Avice *et al.* 1987). De qualquer forma, seria interessante que houvesse outras análises voltadas para testar o monofiletismo de *Phoneutria* e esclarecer as relações filogenéticas dentro do gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D., Rohlf, F. & Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* **71**: 5–16.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics* **18**: 489–522.
- Bond, J. & Stockman, A. 2008. An integrative method for delimiting cohesion species: finding the population-species interface in a group of Californian trapdoor spiders with extreme genetic divergence. *Systematic Biology* **57**: 628–646.
- Bookstein, F.L. 1997. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical image analysis* **1**: 225–43.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 6491–6495.
- Bücherl, W. 1952. Aranhas do Rio Grande do Sul. *Memórias do Instituto Butantan* **24**: 127–155.
- Bücherl, W. 1968. Brazilian scorpions and spiders: I. Biology of scorpions and effects of their venoms. II. The poisonous spiders of the genus *Phoneutria* Perty, 1833. *Revista brasileira de Pesquisas médicas e biológicas* **1**(3/4): 181–190.
- Carstens, B.C. & Dewey, T.A. 2010. Species delimitation using a combined coalescent and information-theoretic approach: an example from North American *Myotis* bats. *Systematic Biology* **59**: 400–414.
- Carstens, B.C. & Knowles L.L. 2007. Estimating species phylogeny from gene-tree probabilities despite incomplete lineage sorting: an example from *Melanoplus* grasshoppers. *Systematic Biology* **56**: 400–411.
- Chang, J., Song, D. & Zhou, K. 2007. Incongruous nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. *Molecular phylogenetics and evolution* **42**: 104–121.
- Costa-Schmidt, L.E. & Araújo, A.M. 2010. Genitalic variation and taxonomic discrimination in the semi-aquatic spider genus *Paratrechalea* (Araneae: Trechaleidae). *Journal of Arachnology* **38**: 242–249.
- Crews, S.C. 2009. Assessment of rampant genitalic variation in the spider genus *Homalonychus* (Araneae, Homalonychidae). *Invertebrate Biology* **128**: 107–125.
- Crews, S.C. & Hedin, M. 2006. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: *Homalonychus*) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 470–487.
- Cummings, M.P., Neel, M.C. & Shaw, K.L. 2008. A genealogical approach to quantifying lineage divergence. *Evolution* **62**: 2411–2422.
- Darwin, C. 1959. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. Oxford University Press.
- Drummond, A. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* **7**: 214.

- Drummond, A., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J. & Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* **4**: e88.
- Dunlop, J.A., Penney, D. & Jekel, D. 2012. A summary list of fossil spiders and their relatives. In Platnick, N. I.(ed.) *The World Spider Catalog, version 12.5*. American Museum of Natural History, on-line em <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
- Eberhard, W.G. 2010. Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica* **138**: 5–18.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**: 1792–1797.
- Eickstedt, V.R.D. von. 1979. Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) (Araneae; Labidognatha; Ctenidae). *Memórias do Instituto Butantan*, **42/43**: 95–126.
- Ence, D.D. & Carstens B.C. 2011. spedeSTEM: A rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources* **11**: 473–480.
- Evin, A., Horáček, I. & Hulva, P. 2011. Phenotypic diversification and island evolution of pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus* group) in the Mediterranean region inferred from geometric morphometrics and molecular phylogenetics. *Journal of Biogeography*: 1–15.
- Ewing, B. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. error probabilities. *Genome research*: 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* **8**: 175–85.
- Framenau, V.W., Dupérré, N., Blackledge, T.A. & Vink, C. 2010. Systematics of the new Australasian orb-weaving spider genus *Backbourkia* (Araneae: Araneidae: Araneinae). *Arthropod Systematics and Phylogeny* **68**: 79–111.
- Folly-Ramos, E., Almeida, C.E., Carmo-Silva, M. & Costa, J. 2002. Natural history of *Ctenus medius* Keyserling, 1891 (Araneae, Ctenidae). II: Life cycle and aspects of reproductive behavior under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Biologia* **62**: 787–93.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294–299.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research* **8**: 195–202.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95–98.
- Hedin, M.C. 2001. Molecular insights into species phylogeny, biogeography, and morphological stasis in the ancient spider genus *Hypochilus* (Araneae: Hypochilidae). *Molecular phylogenetics and evolution* **18**: 238–251.
- Heinemann, S. & Uhl, G. 2000. Male dimorphism in *Oedothorax gibbosus* (Araneae, Linyphiidae): a morphometric analysis. *Journal of Arachnology* **28**: 23–28.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 570–580.
- Hepner, M. & Milasowszky, N. 2006. Morphological separation of the Central European *Trochosa* females (Araneae, Lycosidae). *Arachnologische Mitteilungen* **31**: 1–7.

- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 291–301.
- Holwell, G.I., Winnick, C., Tregenza, T. & Herberstein, M.E. 2009. Genital shape correlates with sperm transfer success in the praying mantis *Ciulfina klassi* (Insecta: Mantodea). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**: 617–625.
- Hosken, D.J. & Stockley, P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 87–93.
- Huber, B.A. 2003. Rapid evolution and species-specificity of arthropod genitalia: fact or artifact? *Organisms Diversity & Evolution* **3**: 63–71.
- Huber, B.A. 2004. The significance of copulatory structures in spider systematics. *Studien zur Theorie der Biologie* **5**: 89–100.
- Huber, B.A., Rheims, C.A. & Brescovit, A.D. 2005. Speciation without changes in genital shape: a case study on Brazilian pholcid spiders (Araneae: Pholcidae). *Zoologischer Anzeiger* **243**: 273–279.
- Hudson, R.R. & Coyne, J.A. 2002. Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution* **56**: 1557–1565.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754–755.
- Jocqué, R. 2002. Genital polymorphism—a challenge for taxonomy. *Journal of Arachnology* **30**: 298–306.
- Knowles, L.L. 2009. Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **40**: 593–612.
- Knowles, L.L. & Carstens, B.C. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* **56**: 887–895.
- Kubatko, L.S., Carstens, B.C. & Knowles, L.L. 2009. STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics* **25**: 971–973.
- Leaché, A.D., Koo, M.S., Spencer, C.L., Papenfuss, T.J., Fisher, R.N. & McGuire, J.A. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 12418–12423.
- Leaché, A.D. & Fujita, M.K. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* **277**: 3071–3077.
- Liu, L. 2008. BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics* **24**: 2542–2543.
- Macías-Hernández, N., Oromí, P. & Arnedo, M.A. 2010. Integrative taxonomy uncovers hidden species diversity in woodlouse hunter spiders (Araneae, Dysderidae) endemic to the Macaronesian archipelagos. *Systematics and Biodiversity* **8**: 531–553.
- Maddison, W.P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* **46**: 523–536.
- Mallet, J. 2007. Species, concepts of. In S.A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*. Oxford: Elsevier (pp. 1–15).
- Martins, R. & Bertani, R. 2007. The non-Amazonian species of the Brazilian wandering spiders of the genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae: Ctenidae), with the description of a new species. *Zootaxa* **1526**: 1–36.
- Mayden, R.L. 1999. Consilience and a hierarchy of species concepts: advances toward closure on the species puzzle. *Journal of Nematology* **31**: 95–116.
- Milasowszky, N., Herberstein, M.E., Zulka, K.P. & Selden, P. 1997. Morphological separation of *Trochosa robusta* (Simon, 1876) and *Trochosa ruricola* (De Geer, 1778) females (Araneae: Lycosidae). In *Proceedings of the 17th European Colloquium of Arachnology, Edinburgh*. (pp. 91–96).

- Mitteroecker, P. & Gunz, P. 2009. Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology* **36**: 235–247.
- Platnick, N.I. 2012. *The World Spider Catalog, version 12.5*. American Museum of Natural History, on-line em <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>. DOI: 10.5531/db.iz.0001
- Polotow, D. 2011. Análise cladística da subfamília Cteninae e revisão do gênero *Calatychicus* Simon (Araneae, Ctenidae). Tese (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. 194pp.
- Posada, D. & Crandall, K. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* **50**: 580–601.
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In J. Howard & S.H. Berlocher (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. New York: Oxford University Press (pp. 57–75).
- de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* **56**: 879–886.
- Raxworthy, C.J., Ingram, C.M., Rabibisoa, N. & Pearson, R.G. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology* **56**: 907–923.
- Rissler, L.J. & Apodaca, J. 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology* **56**: 924–942.
- Rix, M.G. & Harvey, M.S. 2012. Phylogeny and historical biogeography of ancient assassin spiders (Araneae: Archaeidae) in the Australian mesic zone: Evidence for Miocene speciation within Tertiary refugia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62**: 375–396.
- Rohlf, F.J. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 299–316.
- Rohlf, F.J. 2008a. *tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.16*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. 2008b. *tpsRelw, relative warps analysis, version 1.46*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. 2009. *tpsUtil, file utility program, version 1.44*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Schiapelli, R. & Gerschman De Pikelin, B.S. 1966. Estudio comparativo de *Phoneutria fera* Perty, 1833 y *Phoneutria nigriventer* (Keyserling), 1891 (Araneae: Ctenidae). *Memórias do Instituto Butantan* **33**: 675–682.
- Silva-Davila, D. 2003. Higher-level relationships of the spider family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **274**: 1–86.
- Simó, M. & Brescovit, A.D. 2001. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. *Bulletin of the British Arachnological Society* **12**: 67–82.
- Sites, J.W. & Marshall, J.C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 462–470.
- Stockman, A. & Bond, J. 2007. Delimiting cohesion species: extreme population structuring and the role of ecological interchangeability. *Molecular Ecology* **16**: 3374–3392.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Weisrock, D.W., Rasoloarison, R.M., Fiorentino, I., Ralison, J.M., Goodman, S.M., Kappeler, P.M. & Yoder, A.D. 2010. Delimiting species without nuclear monophyly in Madagascar's mouse lemurs. *PLoS One* **5**: e9883.

Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. & Fink, W.L. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. London: Elsevier Academic Press.

CAPÍTULO II

**Filogeografia, evolução do nicho e diversificação de aranhas do gênero *Phoneutria*
(Araneae: Ctenidae)**

RESUMO

Muitas das hipóteses propostas para explicar a diversidade neotropical envolvem a participação de fatores ambientais, o que implica em diferentes previsões a respeito da evolução do nicho. Entretanto, poucos estudos abordam o papel do nicho nos processos de diversificação das linhagens. O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma visão geral sobre a participação de fatores ambientais e possíveis eventos históricos envolvidos na diversificação das aranhas do gênero *Phoneutria*. Para isso, utilizamos informações obtidas a partir de análises filogeográficas, datas de divergência e evolução do nicho dessas aranhas. A filogenia e genealogia foram obtidas a partir de análise bayesiana do gene mitocondrial COI de indivíduos de diversas regiões, e as divergências foram datadas utilizando relógio molecular relaxado. Dados ambientais obtidos a partir de ocorrência das espécies foram utilizados para modelagem do nicho das espécies atuais e para a reconstrução do nicho das espécies ancestrais a partir de abordagem bayesiana. Os resultados mostram que uma divergência ecológica ocorreu em três momentos da evolução do gênero. O primeiro momento ocorreu há cerca de 8 Ma, logo na divergência inicial que divide o gênero em dois grandes grupos. A segunda divergência ambiental ocorreu no final do Mioceno e marca a separação de *P. bahiensis* das demais espécies amazônicas. Por último temos uma diferenciação ecológica que acompanha a diferenciação de *P. pertyi* em relação a um clado formado por *P. nigriventer*/*P. keyserlingi*, a qual ocorreu no início do Pleistoceno. A divergência entre *P. boliviensis* e o clado formado por *P. fera*/*P. reydi* e entre essas duas últimas ocorreu no Plioceno e no Pleistoceno, respectivamente, e são acompanhados por conservação de nicho. O nicho também é conservado entre *P. keyserlingi* e *P. nigriventer*, cuja separação ocorreu no Pleistoceno. Os possíveis eventos envolvidos na diversificação de *Phoneutria* são discutidos com base nas principais hipóteses propostas para explicar a diversidade neotropical e levando em consideração a evolução do nicho, a distribuição geográfica e a data de divergência das espécies.

ABSTRACT

Many of the hypotheses proposed to explain the Neotropical diversity involve the participation of environmental factors, which implies different predictions about niche evolution. However, few studies address the role of the niche in the process of diversification of lineages. The aim of this study was to establish an overview of the role of environmental factors and possible historical events involved in the diversification of the spider genus *Phoneutria*. We used information obtained from phylogeographic analysis, dates of divergence and evolution of the niche of these spiders. The phylogeny and genealogy were obtained from Bayesian analysis of mitochondrial COI gene of individuals from different regions, and divergences were dated using relaxed molecular clock. Environmental data obtained from species occurrence were used for modeling the niche of the current species and for reconstructing the niche of ancestral species through a Bayesian approach. The results show that ecological divergence has occurred three times in the evolution of the genus. The first event occurred about 8 Ma, right in the initial divergence that divides the genus into two major groups. The second environmental divergence occurred in the late Miocene and marks the separation of *P. bahiensis* from the Amazon species. Finally we observed an ecological differentiation that follows the divergence of *P. pertyi* from a clade formed by *P. nigriventer* / *P. keyserlingi*, which occurred in the early Pleistocene. The divergence between the latter species and *P. boliviensis* and the clade formed by *P. fera* / *P. reidyi* and between the later species occurred in the Pliocene and Pleistocene, respectively, and are accompanied by niche conservatism. The niche is also conserved between *P. keyserlingi* and *P. nigriventer*, whose separation occurred in the Pleistocene. The possible events involved in the diversification of *Phoneutria* are discussed based on the main hypotheses proposed to explain the Neotropical diversity and taking into account the evolution of the niche, geographical distribution and divergence date of species.

INTRODUÇÃO

Entender os processos geradores da diversidade biológica é um dos principais objetivos da ecologia e biologia evolutiva, especialmente em regiões que possuem grande riqueza de espécies (Rull 2011). Várias hipóteses foram propostas para explicar padrões de riqueza e distribuição geográfica observados na Amazônia e na Floresta Atlântica (revisados em Batalha-Filho & Miyaki 2011; Dantas *et al.* 2011; Lica *et al.* 2011). Muitas dessas hipóteses invocam a participação de fatores ambientais nos processos de diversificação de linhagens. Uma hipótese bastante discutida propõe que as flutuações climáticas do pleistoceno poderiam isolar populações devido à redução do hábitat disponível em pequenas ilhas (refúgios), promovendo especiação alopátrica (Haffer 1969). Alternativamente, a hipótese do gradiente postula que a heterogeneidade do hábitat promoveria divergência ambiental e especiação parapátrica devido a regimes seletivos distintos nos diferentes ambientes ocupado pela população (Smith *et al.* 1997). As duas hipóteses levam a diferentes previsões a respeito da evolução do nicho. Enquanto que a conservação de nicho é esperada para situações de especiação como na primeira hipótese (e.g.: Kozak & Wiens 2006), ela seria incompatível com a segunda (e.g.: Smith *et al.* 1997).

Conservação de nicho é a tendência à retenção de caracteres relacionados ao nicho ao longo da evolução de um grupo (Wiens *et al.* 2010). Recentemente, tem se discutido na literatura se a conservação de nicho seria um padrão observado entre muitos táxons (Losos 2008; Wiens 2008, Wiens *et al.* 2010; Peterson 2011). Entretanto, a conservação do nicho é dependente da escala de estudo (nível taxonômico e variáveis utilizadas) e seria mais construtivo tentar entender o nicho como um elemento envolvido no processo de diversificação dos organismos e inferir como a sua conservação (ou divergência) poderia explicar padrões de diversidade e distribuição geográfica, ao invés de apenas descrevê-lo como conservado ou não (Wiens & Graham 2005). Há várias maneiras de se estudar a evolução do nicho (Cooper *et al.* 2010; Wiens *et al.* 2010), mas poucos estudos focam a sua reconstrução e sua história evolutiva ao longo do tempo. A reconstrução da história do nicho permitir inferir o nicho ancestral e

como ele se modificou desde a origem do táxon até as espécies recentes, possibilitando entender melhor a participação de fatores ambientais nos processos que geram a diversidade biológica (e.g. Graham *et al.* 2004; Evans *et al.* 2009; Vieites *et al.* 2009; Jakob 2010).

Para reconstruir a história do nicho e propor hipóteses sobre eventos envolvidos na diversificação de um grupo de organismo é necessário saber as relações evolutivas das linhagens, as datas de divergências, a distribuição espacial das espécies e obter informações sobre variáveis ambientais dos locais onde elas vivem. Através da filogeografia é possível descrever os padrões da estrutura genética/geográfica e as relações evolutivas de populações (ou espécies próximas) (Avice 2009; Hickerson *et al.* 2010). Métodos recentes baseados em relógio molecular relaxado permitem a inferência de datas de divergência com certa confiança (Drummond *et al.* 2006). As ferramentas de Sistemas de Informação Geográficas (GIS) permitem que se obtenham informações confiáveis a respeito da localização geográfica de cada espécime e sobre valores de variáveis ambientais naquele determinado ponto. Com isso é possível modelar o nicho das espécies e fazer inferências sobre sua distribuição no passado, presente e no futuro (Elith & Leathwick 2009).

A integração dos métodos listados acima pode ajudar a propor hipóteses mais robustas sobre a evolução de um determinado grupo (Carstens & Richards 2007; Richards *et al.* 2007; Chan *et al.* 2011;) e isso tem ajudado a levantar informações importantes a respeito da diversidade e processos envolvidos na diversificação de linhagens neotropicais (e.g. Graham *et al.* 2004; Carnaval *et al.* 2009; Thomé *et al.* 2010;). Embora muito progresso tenha sido feito até o momento, a maioria dos estudos foram realizados com vertebrados (Moritz *et al.* 2002). Além disso, os estudos que utilizam paleomodelagem se baseiam no pressuposto de que o nicho se manteve inalterado ao longo do tempo estudado, não considerando sua possível dinâmica (Pearman *et al.* 2008). Entretanto, poucos deles abordam a evolução do nicho e como este poderia estar envolvido na diversificação das linhagens (e.g. Graham *et al.* 2004).

Neste estudo utilizamos as aranhas do gênero *Phoneutria* Perty, 1883 (Araneae: Ctenidae) como um modelo para estudo filogeográfico e de evolução do nicho. As sete espécies desse gênero estão

distribuídas pela região Neotropical, sendo facilmente encontradas na Amazônia, Floresta Atlântica e matas de galeria do Cerrado. Entender como foi a evolução desse gênero pode fornecer informações adicionais sobre a diversidade nesses biomas brasileiros. O objetivo desse trabalho foi, portanto, estabelecer uma primeira visão geral sobre a participação de fatores ambientais e possíveis eventos históricos envolvidos na diversificação de *Phoneutria*. Para isso, utilizamos informações obtidas a partir de análises filogeográficas, datas de divergência e evolução do nicho dessas aranhas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Filogenia e Filogeografia

Os espécimes utilizados nesse estudo foram obtidos de duas maneiras: (1) através de coletas durante os anos de 2009 a 2011, cujo material foi armazenado em álcool 96% e em local refrigerado, e (2) através de material de coleções científicas armazenado em álcool 70-80%. O material testemunho está depositado nas seguintes coleções (abreviações e curadores entre parênteses): Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (UFMG, Adalberto J. Santos); Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo (IBSP, Irene Knysak); Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia (UFBA, Tânia K. Brasil), Museu Nacional, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (MNRJ, Adriano B. Kury). A lista dos espécimes utilizados com respectivas instituições em que estão depositados, número de tombo, localidade de procedência e coordenadas geográficas estão dispostas no Anexo 2. A localização geográfica dos espécimes pode ser visto na Figura 2.1.

O DNA foi extraído a partir do músculo do fêmur de uma das pernas utilizando kits de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Protocolos e reagentes padrões para reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados para amplificar fragmentos de DNA mitocondrial de aproximadamente 700pb, compreendendo a região do gene Citocromo C Oxidase I (COI), com os *primers* universais LCO1490 (5'-ggcaacaatacataaagatattgg-3') e HC02198 (5'-

taaacttcagggtgaccaaaaaatca-3) (Folmer *et al.* 1994). As condições de amplificação para espécimes armazenados em álcool 96% consistiram de uma fase de desnaturação inicial de 95°C por 4min e 30seg, seguidos por 37 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, hibridização dos iniciadores por 1min a 56°C e dois minutos de extensão da cadeia a 72°C. Indivíduos armazenados em álcool 70% foram submetidos a condições um pouco diferentes, envolvendo seis ciclos iniciais com temperatura de hibridização dos iniciadores de 50°C por um minuto e mais 34 ciclos com temperatura de 56°C. Os fragmentos amplificados foram purificados através de protocolo de limpeza com Polietilenoglicol (Polietilenoglicol 20% e NaCl 2,5M) e sequenciados utilizando kits Dynamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) em um sequenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham/Pharmacia). A qualidade das sequências e sequências-consenso para cada indivíduo foram obtidas utilizando os programas phredPHrap e Consed (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998; Gordon *et al.* 1998). Um total de 96 indivíduos foi sequenciado, sendo que 87 pertencem ao gênero *Phoneutria* e oito compõem o grupo externo (cinco espécies de *Ctenus*, uma de *Isoctenus*, uma de *Cupiennius* e uma de *Nothroctenus*). Uma sequência adicional de *Phoneutria fera* proveniente da Guiana Francesa (HM575999.1) foi obtida do GenBank. A escolha do grupo externo foi baseada em trabalhos recentes com a família Ctenidae (Simó & Brecovit 2001; Silva-Davila 2003; Polotow 2011) e feita de maneira a abranger espécies de diferentes subfamílias, mas com maior amostragem de exemplares de Cteninae, subfamília a qual pertence o gênero *Phoneutria*.

As sequências foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE v. 3.8.31 (Edgar 2004) com os parâmetros-padrão determinados pelo programa (o alinhamento convergiu após cinco iterações). A edição e correções manuais do alinhamento foram feitas utilizando o programa BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall 1999), resultando em um alinhamento final de 593 bases com eventos de inserção/deleção.

Cinquenta e seis modelos de evolução molecular foram comparados através de um teste de razão de verossimilhança (Likelihood Ratio Test, LRT) no programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 2001). O modelo mais adequado aos dados e utilizado para as análises posteriores foi o *General Time Reversible* com heterogeneidade de taxas entre sítios (GTR + Γ).

Para estimar a árvore gênica e a filogenia, foi utilizado o programa *BEAST (Heled & Drummond 2010), disponível junto com o pacote BEAST v. 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007). Foi utilizado um modelo de relógio molecular relaxado (Drummond *et al.* 2006) não-correlacionado, com distribuição log-normal das taxas em cada ramo. Uma vez que há apenas um registro fóssil de Ctenidae e sua posição filogenética não é conhecida (Dunlop *et al.* 2012) foi necessário fornecer informações *a priori* sobre a média da taxa de mutação. Esse *prior* foi determinado por uma distribuição log-normal, com média de 0,0115 e Log (desvio padrão) igual 0,01 (para o parâmetro *uclid.mean*). Dessa forma é possível acrescentar incertezas a respeito da taxa, mas assumindo que o valor esteja próximo de 0,0115 mutações por milhão de anos. Esse valor foi baseado na taxa proposta por Brower (1994) a partir da comparação de dados de sequencias mitocondriais e datas de divergências (inferidas através de eventos geológicos) de diferentes grupos de Arthropoda. Essa taxa tem sido utilizada em alguns estudos recentes com aranhas (Hedin 2001; Chang *et al.* 2007; Framenau *et al.*, 2010; Rix & Harvey 2012). Todos os outros *priors* foram mantidos como no padrão do programa. Foram utilizadas, para cada hipótese, duas corridas de 10.000.000 de gerações, amostrando com uma frequência de 1.000, e utilizando um *burn in* de 25%. O programa LogCombiner v. 1.6.2 foi utilizado para combinar o arquivo de saída das duas corridas, o programa Tracer v. 1.5 foi utilizado para avaliar a performance das corridas e as árvores (gênicas e de espécies) com a maior probabilidade posterior foram sumarizadas através do programa TreeAnnotator v. 1.6.2. Todos esses programas são distribuídos junto com o pacote do BEAST (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>).

Nicho das Espécies Atuais

A inferência do nicho para cada uma sete espécies atuais de *Phoneutria* foi feita a partir de Modelos de Nicho Ecológico através do algoritmo MAXENT (Phillips *et al.* 2006). Embora tenha sido discutido recentemente o que realmente é calculado com esses modelos (Soberón & Peterson 2005; Soberón 2007; Jiménez-Valverde *et al.* 2008), eles podem trazer boas informações a respeito das tolerâncias ambientais em ampla escala dos organismos. Portanto, eles podem ser utilizados para estimar

e comparar o nicho Grinnelliano fundamental de espécies (Hirzel & Lay 2008; veja Soberón 2007 para definições de nicho).

Foram utilizados para os dados de ocorrência das espécies, além das informações dos espécimes analisados nos dois capítulos desta dissertação, os registros publicados em artigos recentes sobre o gênero (Simó & Brescovit 2001; Martins & Bertani 2007; Dias *et al.* 2011). Uma vez que a revisão de Simó & Brescovit (2001) considera *P. keyserlingi* e *P. pertyi* como sinônimos de *P. nigriventer*, as ocorrências dessa espécie presentes nesse trabalho não foram utilizadas. Ocorrências duplicadas (ou seja, que ocorrem em um mesmo pixel) foram removidas utilizando o programa EMNtools v. 1.3 (Warren *et al.* 2010). Após esse processo restaram 241 registros, sendo que as espécies com menor e maior número de registros não duplicados foram *P. bahiensis* (15) e *P. nigriventer* (182), respectivamente.

Foram utilizadas sete variáveis ambientais disponíveis no site do projeto WorldClim (<http://www.worldclim.org/>): temperatura média anual (BIO1), temperatura máxima no mês mais quente (BIO5), temperatura mínima no mês mais frio (BIO6), precipitação anual (BIO12), precipitação no mês mais úmido (BIO13), precipitação no mês mais seco (BIO14) e altitude.

A sobreposição de nicho de espécies-irmãs foi calculada a partir do índice *I* (Warren *et al.* 2008). Esse índice é calculado a partir da saída do MAXENT utilizando os valores de adequabilidade de cada pixel, sem a necessidade de aplicação de pontos de corte. Assim, quanto maior a sobreposição em áreas de adequabilidade alta, maior a similaridade do nicho. Um teste de aleatorização, com 1.000 pseudoréplicas, foi empregado então para testar se a similaridade encontrada seria maior ou menor que o esperado ao acaso, assim como proposto por Warren *et al.* (2008). Valores de similaridade de nicho significativamente menores ou maiores que o esperado ao acaso mostram diferenciação ecológica ou conservação de nicho, respectivamente, entre as espécies (*e.g.* Pyron & Burbrink 2009; Dennis & Helberg 2010; Nakazato *et al.* 2010)

Reconstrução do Nicho Ancestral

Muitos dos métodos utilizados para reconstrução do estado ancestral assumem um modelo de movimento browniano dos caracteres ao longo da filogenia (Webster & Purvis 2002). Entretanto, quando alguns processos evolutivos estão envolvidos na evolução dos caracteres analisados o modelo browniano pode não ser adequado (Pagel 1998; Freckleton & Harvey 2006). Verificamos então, se as variáveis evoluíram segundo um modelo browniano de evolução, utilizando o programa BayesTraits v. 2.0 (M. Pagel & A. Meade, disponível em www.evolution.rdg.ac.uk). Para isso, comparamos através de LRT um modelo em que os parâmetros de correções da filogenia δ , κ e λ são iguais a 1 (modelo browniano) com um modelo em que eles podem variar e atingir o valor de máxima verossimilhança (não-browniano)(Pagel 1999). O teste revelou que um modelo não-browniano se adequa melhor aos dados (LR=10,72; 3 graus de liberdade, p=0,01). Portanto esses parâmetros foram incorporados nas análises para possibilitar uma estimativa mais confiável dos estados ancestrais (Pagel 1999).

Para reconstruir o estado ancestral é necessário ter valores das variáveis ambientais para cada espécie. Para isso, poderíamos utilizar a média a partir dos pontos de ocorrência. Porém, como a maioria das espécies apresenta poucos pontos, proporcionalmente à área de distribuição, e a maioria deles está concentrada em algumas áreas, esses dados estariam muito enviesados e não seria uma boa representação do nicho das espécies. Portanto, utilizamos uma abordagem diferente para diminuir esse viés. A partir dos modelos de nicho gerados para as espécies atuais, foi aplicado um ponto de corte de mínima presença e sorteados 200 pontos, ponderados pelo valor de adequabilidade. A partir desses pontos, extraiu-se o valor das sete variáveis ambientais e a média foi calculada para cada uma das espécies. Essas médias foram utilizadas para estimar o estado ancestral em cada nó da filogenia a partir de uma abordagem bayesiana (Pagel *et al.* 2004). Muitos trabalhos que em que se reconstróem estados ancestrais utilizam, além da média, os valores máximo e mínimo (ou o intervalo de confiança), para estimar a variabilidade nas variáveis (*e.g.* Graham *et al.* 2004; Vieites *et al.* 2009). Aqui, como empregamos um método bayesiano,

acessamos a variabilidade através da distribuição posterior dos valores obtidos para as espécies ancestrais durante a fase estacionária da MCMC, calculando a média e o desvio-padrão.

O estado ancestral foi estimado no programa BayesTraits v. 2.0 (M. Pagel & A. Meade, disponível em www.evolution.rdg.ac.uk) através de MCMC de 20.050.000 gerações e *burn in* de 50.000. Os *priors* para os estados ancestrais foram uniformes, variando entre os valores mínimos e máximos das variáveis ambientais observados nas espécies atuais. Como um modelo não-browniano foi o mais adequado, os parâmetros δ , κ e λ também foram estimados.

Evolução do Nicho ao Longo do Tempo

Baseado na distribuição posterior das variáveis ambientais das espécies ancestrais sortearam-se 200 valores que, juntamente com os valores sorteados anteriormente para as espécies recentes, foram utilizados em uma Análise de Componentes Principais (PCA). Dessa forma, então, o nicho, que antes era representado de uma maneira multidimensional, foi resumido em poucas variáveis, tornado mais fácil sua visualização.

Através da filogenia datada, nós plotamos os valores de nicho estimado, representado pelo primeiro eixo da PCA, para cada nó e espécies viventes ao longo do tempo. A abordagem aqui empregada foi baseada no método proposto por Evans *et al.* (2009), embora esses autores tenham plotado a evolução de cada variável separadamente. Uma vez que espécies próximas podem apresentar nichos similares, mas raramente idênticos, a conservação do nicho depende de quão similar o nicho deve ser entre as espécies para ser considerado conservado (Wiens & Graham 2005). Utilizando as variáveis separadamente, pode-se facilmente encontrar algumas diferenças. Portanto, achamos mais interessante representar essas variáveis em termos de variância proporcional entre elas através da PCA.

RESULTADOS

Filogenia e Filogeografia

Uma dicotomia basal separa as espécies de *Phoneutria* em dois grandes grupos que divergiram há cerca de 8Ma (milhões de anos atrás, Figs. 2.1; 2.2). Um deles, o qual aqui será tratado como gr. *fera*, apresenta suporte de 46% e compreende as espécies amazônicas mais *P. bahiensis*. Essa, que ocorre na mata atlântica do litoral do nordeste brasileiro, divergiu do subgrupo amazônico por volta de 6Ma. Dentro desse subgrupo amazônico, o qual apresenta suporte de 45%, *P. boliviensis* é a espécie que divergiu primeiro, há aproximadamente 4,5Ma. As espécies irmãs *P. fera* e *P. reidyi* são as mais recentes dentro do gr. *fera* (0,39Ma) e a relação entre elas é fortemente suportada (99%).

O outro grande grupo, chamado aqui de gr. *nigriventer* (Fig. 2.1), por sua vez, é fortemente suportado, com 98% de probabilidade posterior. A espécie *P. pertyi* é a mais antiga no grupo, divergindo por volta de 2Ma (Fig. 2.2). Um alto valor de probabilidade posterior (92%) suporta a relação de espécies irmãs entre *P. nigriventer* e *P. keyserlingi*, as quais divergiram a 0,93Ma (Figs. 2.1; 2.2).

Apenas *P. nigriventer* apresentou uma amostragem que possibilita a análise filogeográfica a um nível intraespecífico. Embora as populações não apresentem forte diferenciação e estruturação geográfica, que pode ser observado pelos ramos curtos e o baixo suporte da maioria do cladus, é possível observar alguns padrões (Fig. 2.3). Três agrupamentos principais podem ser percebidos: um formado por indivíduos do norte de Minas Gerais e leste da Bahia (clado *P. nigriventer* Nordeste, Fig. 2.3), um formado por indivíduos de Belo Horizonte e localidades próximas (haplogrupo *P. nigriventer* BH, Fig. 2.3) e outro incluindo indivíduos do Rio Grande do Sul, São Paulo, Goiás e Minas Gerais (haplogrupo *P. nigriventer*Sudoeste, Fig. 2.3).

É interessante notar também que alguns indivíduos de *P. keyserlingi* (haplogrupo *P. keyserlingi* Norte) provenientes da região de contato com *P. pertyi* são mais relacionados com indivíduos dessa última (haplogrupo *P. pertyi* Sul), indicando polimorfismo ancestral ou introgressão (Fig. 2.3). Doi

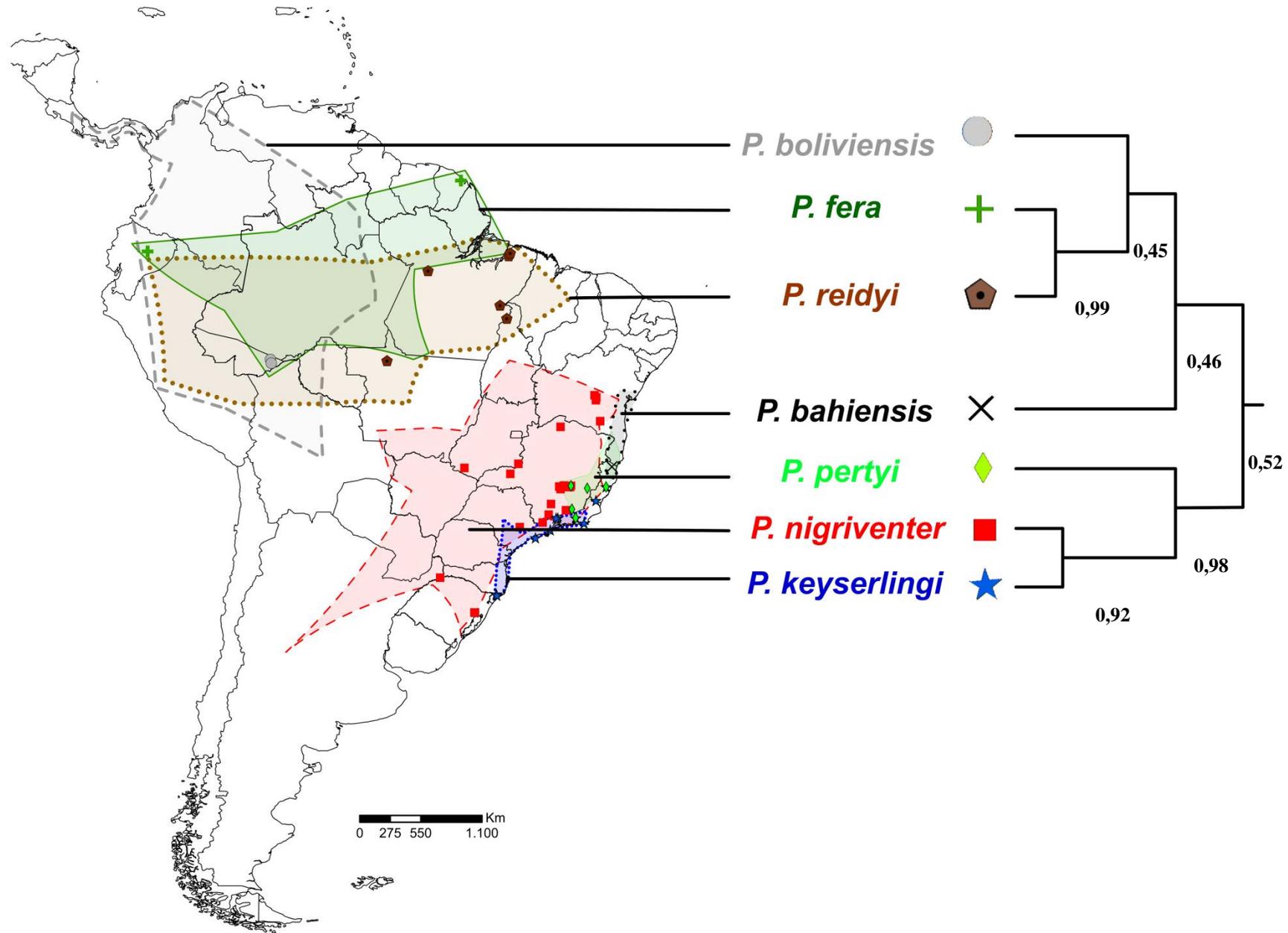


Figura 2.1: Filogenia, distribuição geográfica e localidades amostradas para as espécies de *Phoneutria*. Números nos ramos indicam a probabilidade posterior dos clados. Grupo externo não representado.

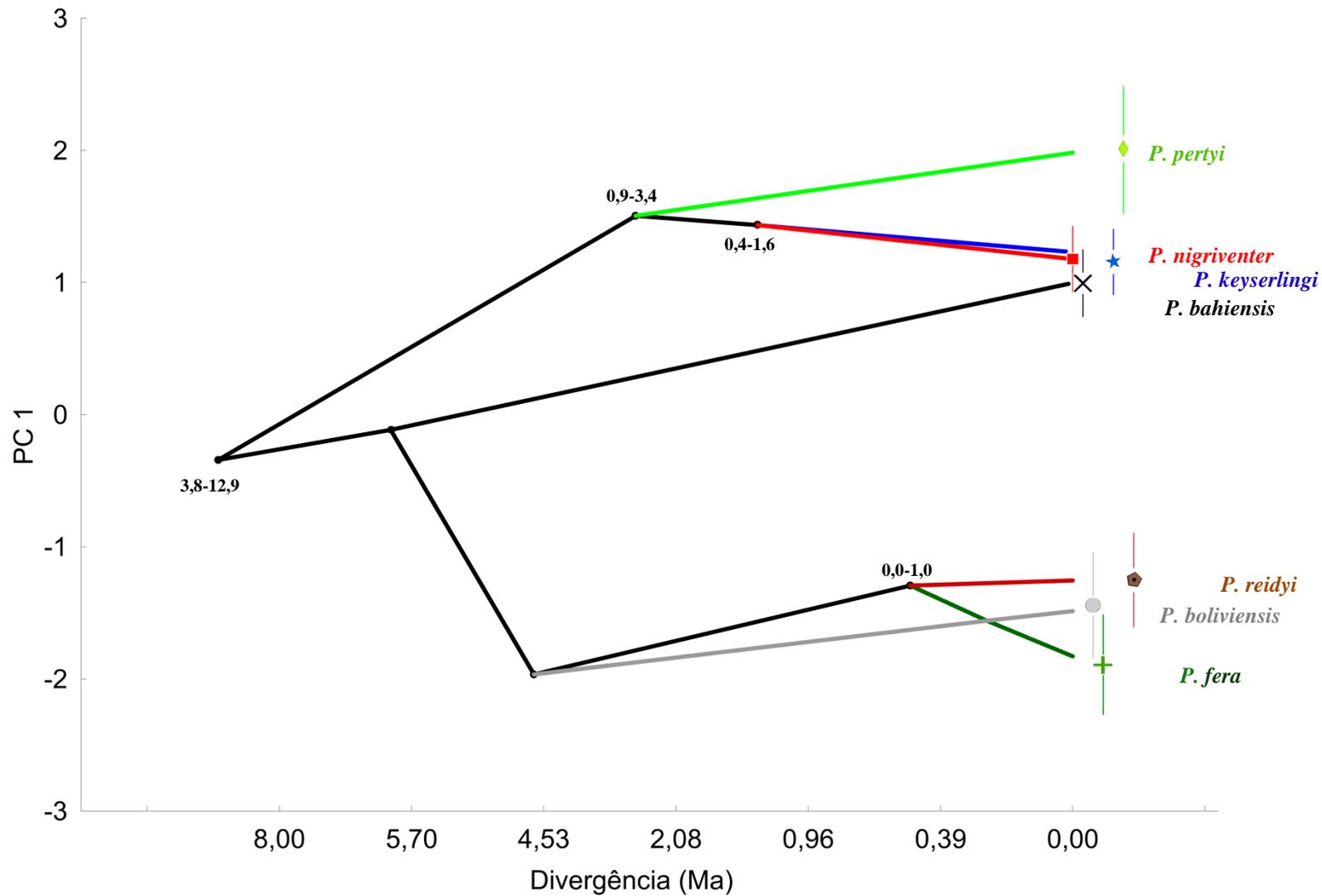


Figura 2.2: Evolução do nicho em *Phoneutria*. Árvore de máxima probabilidade posterior com datas de divergência (eixo x) projetada no primeiro componente principal (eixo y) da PCA feita com as tolerâncias ambientais das espécies recentes e com as estimadas para as espécies ancestrais. Os nós estão representados pelas médias da divergência e do espaço ambiental (nicho) dos ancestrais comuns mais recentes. Barras verticais representam o intervalo de confiança de 95% do espaço ocupado pelas espécies atuais no primeiro componente principal. Números nos nós representam o intervalo de 95% de maior densidade posterior da data de divergência.

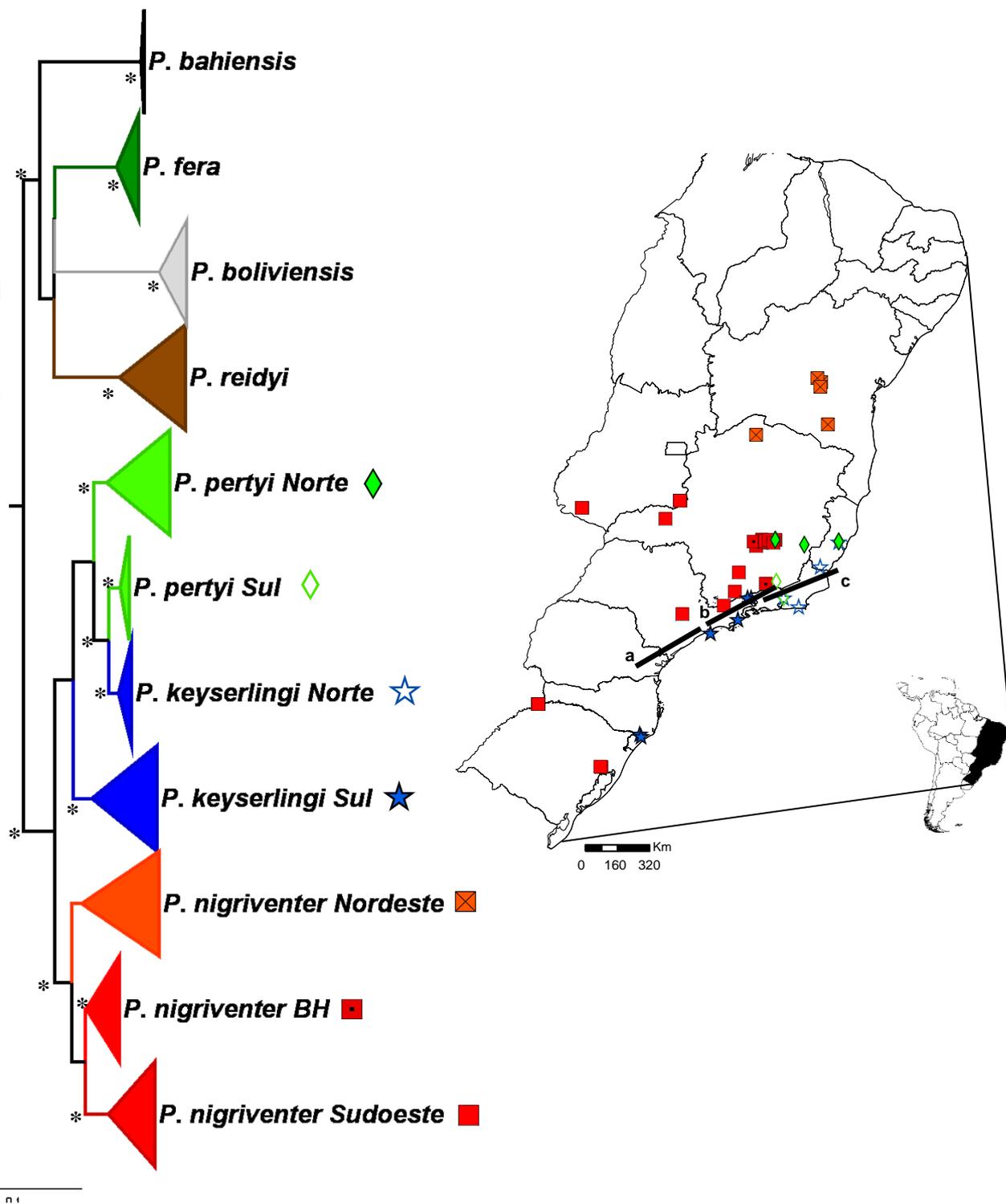


Figura 2.3: Genealogia do gene mitocondrial COI para as espécies de *Phoneutria* e localização geográfica dos indivíduos do gr. *nigriventer* amostrados. Nós com probabilidade posterior igual ou maior que 90% estão indicados com *. **a**= zona de cisalhamento de Cubatão; **b**=descontinuidade crustal do Rio Paraíba do Sul; **c**= zona de falhas do Além Paraíba.

desses indivíduos representam registros novos muito mais ao norte da distribuição conhecida para *P. keyserlingi* (MRJst1: Santa Teresa, ES e UFMG3629: Mimoso do Sul, ES; Fig. 2.3).

Evolução do Nicho

O modelo de nicho foi utilizado apenas para sumarizar as tolerâncias ambientais das espécies para utilização em análises posteriores e para verificar a sobreposição do nicho entre espécies irmãs. Portanto, não mostramos aqui os mapas de distribuição potencial resultantes dos modelos.

O teste de similaridade de nicho revelou que a sobreposição de nichos entre *P. fera* e *P. reidyi* é significativamente maior que o esperado ao acaso (Fig. 2.4A). Portanto, pode-se considerar os nichos destas espécies conservado em relação ao seu ancestral comum mais recente. Esse teste também revela nicho mais similar do que o acaso para *P. nigriventer* e *P. keyserlingi* (Fig. 2.4 B).

O primeiro eixo da PCA explica 41,5% da variância total, e as variáveis que mais contribuíram foram a temperatura média anual, temperatura máxima no mês mais quente, precipitação anual e precipitação no mês mais úmido. Todas as variáveis foram negativamente correlacionadas com os escores do primeiro eixo.

Seguindo a história do nicho ao longo do tempo (Fig. 2.2), observa-se que a divergência inicial da filogenia de *Phoneutria* (± 8 Ma), a qual separa o gr. *nigriventer* do gr. *fera*, é acompanhada por pouca diferenciação ecológica. Essa diferenciação ecológica se torna muito evidente há cerca de 6Ma, quando as espécies amazônicas (*P. fera*, *P. reidyi* e *P. boliviensis*) divergem de *P. bahiensis*. O nicho, porém, é conservado entre as espécies amazônicas. Embora apareça uma diferença entre as médias de *P. fera* e *P. reidyi* (como mostrado pela pequena sobreposição do intervalo de confiança), a sobreposição do nicho ocorre em áreas de alta adequabilidade e é significativamente maior do que esperado ao acaso, como mostrado anteriormente pelo teste de similaridade. Aos 2Ma, quando *P. pertyi* se especia, nota-se divergência do nicho, que é seguida por conservação durante a segregação de *P. nigriventer* e *P. keyserlingi* ($\pm 0,9$ Ma).

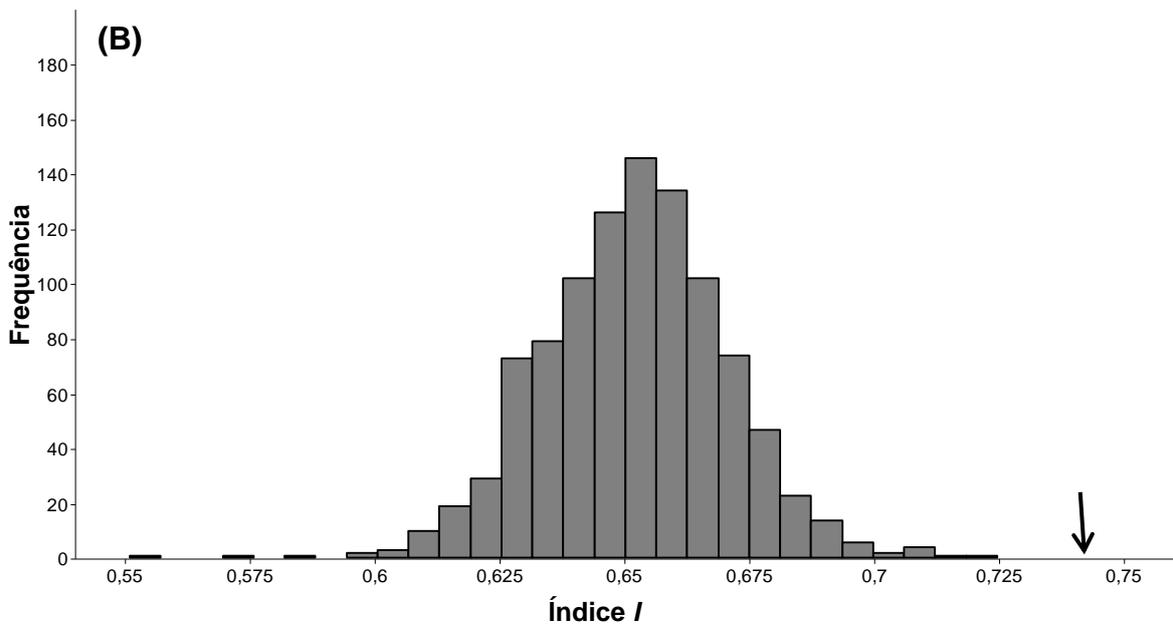
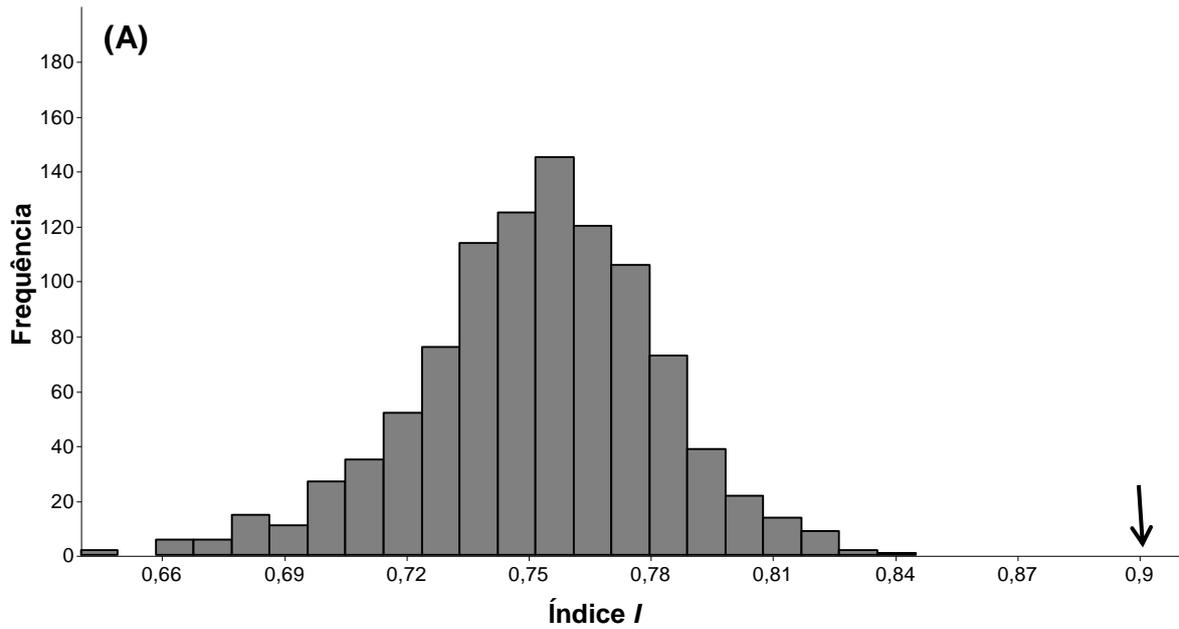


Figura 2.4: Teste de similaridade de nicho: (A) *Phoneutria fera* X *P. reidy*; (B) *P. nigriventer* X *P. keyserlingi*. Histogramas mostram a distribuição de frequência do índice de sobreposição para 1.000 pseudoréplicas geradas a partir de pontos aleatórios dentro da distribuição das espécies. Setas indicam o valor real de sobreposição dos modelos gerados pelo MAXENT. Em ambos os casos o nicho é mais similar do que o esperado ao acaso.

É possível notar também uma convergência entre os nichos de *P. bahiensis* e de *P. nigriventer* + *P. keyserlingi*.

DISCUSSÃO

Uma vez que as espécies mais basais nos dois grandes grupos de *Phoneutria*, gr. *nigriventer* e gr. *fera*, se encontram no litoral Nordeste e Sudeste do Brasil, pode-se supor que o ancestral do gênero estava distribuído entre o leste da Amazônia e o norte da Floresta Atlântica. A divergência inicial em *Phoneutria*, que separa esses dois grupos, apresenta certa coincidência geográfica com descontinuidades genéticas em outros grupos, com uma área de contato na região do Rio Doce (Cabanne *et al.* 2007, 2008; Carnaval *et al.* 2009; Martins 2011; Thomé *et al.* 2010). Por exemplo, Thomé *et al.* (2010) sugeriram que a neotectônica das complexas formações geológicas da bacia do Rio Doce poderia estar relacionada com a divergência de haplogrupos de sapos do gênero *Rhinella*. Entretanto, esse não parece ser o caso de *Phoneutria*. Os movimentos mais recentes da bacia são inferidos para menos de 1.6Ma (Saadi *et al.* 2002), bem mais recente do que a divergência observada aqui (8Ma). Por sua vez, a formação do Rio Doce é bem mais antiga (cerca de 500Ma; Campos Neto & Figueiredo 1995). O Rio Doce em si não parece ser uma barreira para essas espécies, já que é possível observar espécies dos dois grupos nos dois lados do rio. Uma vez que a cladogênese inicial em *Phoneutria* é acompanhada por certa diferenciação do nicho, a divergência entre os grupos *nigriventer* e *fera* poderia ter sido ocasionada por diferentes pressões seletivas ambientais atuando ao longo da distribuição do ancestral dos dois grupos, causando uma especiação parapátrica.

A relação entre *P. bahiensis* e as espécies amazônicas indica uma conexão entre o norte da Floresta Atlântica e o leste da Amazônia, também observada para outros grupos (Costa 2003; Martins *et al.* 2011). Aqui, a divergência estimada entre *P. bahiensis* e o grupo amazônico data do final do Mioceno (5,7Ma), e é acompanhada por grande diferenciação ecológica. Entretanto, como essas espécies apresentam distribuição disjunta, é difícil determinar se a diferenciação do nicho ocorreu antes ou depois

do evento vicariante. O final do Mioceno e início do Pleistoceno foram marcados pela predominância de vegetação aberta e xérica na América do Sul (Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006). A expansão desses ambientes pode ter reduzido a área de floresta úmida no nordeste brasileiro que conectava a atual Floresta Atlântica com a Amazônia, reduzindo assim o fluxo gênico entre as populações que ficaram restritas a esses dois biomas. De qualquer forma, os dois eventos, vicariância e diferenciação ecológica, podem ter tido papéis igualmente importante na divergência entre *P. bahiensis* e o ancestral das espécies amazônicas.

Uma das hipóteses propostas para justificar a diversidade amazônica é hipótese de gradiente, a qual postula que a heterogeneidade do habitat seria responsável pela diferenciação dos organismos devido a diferentes pressões ambientais, o que resultaria em espécies-irmãs que ocupam habitats distintos (Moritz *et al.* 2002). Essa hipótese não poderia explicar, no entanto, a divergência de *P. boliviensis* do clado *P. fera/P. reidyi*, uma vez que o nicho, na escala em que estudamos, é conservado entre elas. Outra hipótese bastante utilizada para explicar a diversidade da Amazônia envolve a existência de refúgios pleistocênicos: áreas de florestas fragmentadas por vegetação aberta durante períodos secos das oscilações climáticas dessa época (Haffer 1969). Entretanto, a especiação de *P. boliviensis* é estimada para o início do Plioceno, impossibilitando atribuir como causa de sua divergência as oscilações climáticas do Pleistoceno.

Eventos de tectonismo envolvidos na formação dos Andes provavelmente causaram a formação de um sistema sedimentar complexo na Amazônia ocidental, com lagos rasos, rios e florestas inundáveis, o qual foi muito mais instável do que regiões adjacentes durante o Mioceno superior e o Plioceno (Rossetti *et al.* 2005; Latrubesse *et al.* 2007). Baseado nisso, e no exemplo de diversos estudos filogeográficos, Aleixo & Rossetti (2007) propuseram dois modelos para explicar a diversidade de aves na Amazônia. Um deles se aplicaria à evolução de linhagens de terra firme e sugere que as populações teriam ficado isoladas nas áreas mais estáveis. Uma vez que a distribuição de *P. boliviensis* não alcança a região oriental da Amazônia, uma população poderia ter ficado isolada na área estável localizada na vertente leste da

cordilheira dos Andes, e se espalhado posteriormente, conforme o modelo proposto por esses autores (Fig. 1b em Aleixo & Rossetti 2007). Vários exemplos apresentados nesse trabalho apresentam topologia e datas de divergência congruente com o observado neste trabalho para as espécies de *Phoneutria* presentes na Amazônia. Entretanto, *P. boliviensis* pode ser comum em florestas inundadas, mas incomum de florestas de “terra-firme” (observação pessoal de T.R. Gasnier em Torres-Sánchez & Gasnier 2007), sugerindo uma possível adaptação a esses ambientes. Isso pode indicar divergência do nicho desta espécie em uma escala mais refinada do que a empregada aqui. *Phoneutria boliviensis* então poderia ter se diferenciado parapatricamente ao ancestral de *P. fera*/*P. reidyi*, devido a pressões seletivas do ambiente alagado das áreas baixas da Amazônia ocidental. Após a especiação, as populações de *P. boliviensis* teriam então se espalhado pela Amazônia segundo o cenário para espécies de terras inundáveis, sugerido por Aleixo & Rossetti (2007). Essas hipóteses poderiam ser testadas com estudos de história natural e genética de populações com maior amostragem ao longo da distribuição dessa espécie.

Embora na maioria dos casos avaliados por Moritz *et al.* (2002) as diferenciações entre vários grupos na Amazônia tenham ocorrido antes do Pleistoceno, aqui observamos que as espécies mais recentes do grupo amazônico, *P. fera* e *P. reidyi*, apresentam divergência que data dessa época. A grande semelhança do nicho e sobreposição de sua distribuição geográfica indica que essas espécies não vivem em áreas adjacentes com diferenças ambientais capazes de terem levado a divergência entre elas, como seria esperado segundo um modelo de gradiente (Moritz *et al.* 2002). As flutuações climáticas do Pleistoceno, portanto, poderiam ter levado à diferenciação de *P. fera* e *P. reidyi* através da formação de áreas de florestas isoladas que levaram à especiação alopátrica e posterior expansão da área de distribuição, como postulado por modelos de refúgios.

Com relação às espécies do gr. *nigriventer*, *P. pertyi* é a mais antiga e se separou das demais há cerca de 2Ma, no início do Pleistoceno. A divergência dessa espécie é acompanhada por grande divergência ecológica, relacionada às diferenças na precipitação e na temperatura ao longo da distribuição no sudeste do Brasil. Essas diferenças ambientais podem ter resultado em pressões seletivas diferenciadas

que levaram à especiação e à ocupação de habitats distintos e adjacentes. Esse padrão é previsto por dois modelos de diversificação: o modelo de gradiente e o modelo de desaparecimento de refúgio (*Vanishing refuges*). Segundo esse último, uma seleção direcional levaria à diferenciação das espécies à medida que os refúgios se tornem incapazes de suportar a população (Moritz *et al.* 2002). Uma vez que a divergência de *P. pertyi* data do Pleistoceno, não se pode descartar essa possibilidade. Entretanto, uma das principais diferenças entre eles é que o modelo de gradiente não requer interrupção do fluxo gênico durante a especiação (Moritz *et al.* 2002). Como vimos, há uma discordância entre a árvore gênica e a árvore de espécies, a qual pode ser causada, entre outras coisas, por polimorfismo ancestral ou transferência horizontal (Maddison 1997). Essa discordância ocorre em áreas de contato entre as espécies. Embora o modelo para estimar a filogenia assuma que não houve fluxo gênico entre as espécies, seria interessante verificar mais detalhadamente a possibilidade de introgressão, o que poderia fornecer uma informação a favor da hipótese de gradiente (Moritz *et al.* 2002). Um sinal de expansão populacional recente, por sua vez, poderia favorecer a hipótese do desaparecimento de refúgios.

As espécies *P. nigriventer* e *P. keyserlingi* divergiram há 0,95Ma e não apresentam diferenciação ecológica. Poderíamos, portanto, pensar na possibilidade do modelo de refúgio para explicar a divergência dessas duas espécies. Outra hipótese também levantada para explicar padrões de diversidade na Floresta Atlântica é a neotectônica, como proposto por Thomé *et al.* (2010) para haplogrupos de *Rhinella crucifer*. Existem três falhas geológicas com movimentos recentes que poderiam estar envolvidas na divergência dessas duas espécies de *Phoneutria*: zona de falhas do Além Paraíba, Zona de cisalhamento de Cubatão e a descontinuidade crustal do Rio Paraíba do Sul (Saadi *et al.* 2002)(Fig. 2.3). Uma melhor amostragem das espécies seria necessária para testar essas hipóteses, sendo que um sinal de expansão populacional favoreceria a primeira.

O balonismo, ato de dispersão de juvenis por correntes de ar através de fios de seda, fornece grande mobilidade para o organismo e é documentado para várias aranhas, incluindo espécies da família Ctenidae (Bell *et al.* 2005). A fraca estruturação geográfica das populações de *Phoneutria nigriventer*

pode ser, portanto, devido à grande capacidade de dispersão suposta para esses organismos. De qualquer forma agrupamentos gerais podem indicar certos padrões. Indivíduos do norte de Minas Gerais-Bahia e os indivíduos de dos arredores de Belo Horizonte são os mais basais na filogenia, enquanto que os indivíduos das outras regiões são mais derivados. Isso poderia indicar uma colonização sentido Nordeste-Sudoeste da distribuição de *P. nigriventer*.

Embora ainda não seja possível determinar ao certo os eventos que causaram a diversificação de *Phoneutria*, as predições das hipóteses propostas aqui para cada evento de divergência podem ser testadas através de métodos de filogeografia estatística (Knowles & Maddison 2002; Nielsen & Beaumont 2009), baseada em uma amostragem adequada. Hipóteses que envolvem refúgio como explicação para a cladogênese, por exemplo, requerem que seja demonstrada a existência de expansão populacional recente (e.g. Cabanne *et al.* 2007, 2008; Martins 2011), o que exigiria amostragem de populações em possíveis refúgios e fora deles. Assim seria possível compreender melhor a história evolutiva do gênero *Phoneutria*. Além do mais, uma vez que o progresso a respeito do conhecimento dos processos e padrões de diversidade tem sido feito basicamente com vertebrados, esses dados podem fornecer importante contribuição e motivação para estudos filogeográficos com invertebrados nos biomas da América do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixo, A. & Rossetti, D. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithologie* **148**: 443-453.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3-15.
- Batalha Filho, H. & Miyaki, C.Y. 2011. Filogeografia da Mata Atlântica. *Revista da Biologia* **7**: 31-34.
- Bell, J.R., Bohan, D.A., Shaw, E.M. & Weyman, G.S. 2005. Ballooning dispersal using silk: world fauna, phylogenies, genetics and models. *Bulletin of Entomological Research* **95**: 69-114.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 6491-6495.
- Cabanne, G., Santos, F. & Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 73-84.

- Cabanne, G.S., d'Horta, F.M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 760-773.
- Campos Neto, M. & Figueiredo, M. 1995. The Rio Doce orogeny, southeastern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences* **8**: 143-162.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* **323**: 785-789.
- Carstens, B.C. & Richards, C.L. 2007. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution* **61**: 1439-1454.
- Chan, L.M., Brown, J.L. & Yoder, A.D. 2011. Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**: 523-537.
- Chang, J., Song, D. & Zhou, K. 2007. Incongruous nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**: 104-121.
- Cooper, N., Jetz, W. & Freckleton, R.P. 2010. Phylogenetic comparative approaches for studying niche conservatism. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2529-2539.
- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* **30**: 71-86.
- Dantas, G.P.M., Cabanne, G.S. & Santos, F.R. 2011. How Past Vicariant Events Can Explain the Atlantic Forest Biodiversity? In O. Grillo & G. Venora (Eds.), *Ecosystems Biodiversity*. Rijeka, Croatia: InTech (pp. 429-442).
- Dennis, A.B. & Hellberg, M.E. 2010. Ecological partitioning among parapatric cryptic species. *Molecular Ecology* **19**: 3206-3225.
- Dias, M.A., Simó, M., Castellano, I. & Brescovit, A.D. 2011. Modeling distribution of *Phoneutria bahiensis* (Araneae: Ctenidae): an endemic and threatened spider from Brazil. *Zoologia* **28**: 432-439.
- Drummond, A. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214.
- Drummond, A., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J. & Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* **4**: e88.
- Dunlop, J.A., Penney, D. & Jekel, D. 2012. A summary list of fossil spiders and their relatives. In Platnick, N. I.(ed.) *The World Spider Catalog, version 12.5*. American Museum of Natural History, on-line em <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**: 1792-1797.
- Elith, J. & Leathwick, J.R. 2009. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **40**: 677-697.
- Evans, M.E.K., Smith, S.A., Flynn, R.S. & Donoghue, M.J. 2009. Climate, niche evolution, and diversification of the "bird-cage" evening primroses (*Oenothera*, sections *Anogra* and *Kleinia*). *The American naturalist* **173**: 225-240.
- Ewing, B. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. error probabilities. *Genome research* **8**: 186-194.

- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* **8**: 175–185.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294–299.
- Framenau, V.W., Dupérré, N., Blackledge, T.A. & Vink, C. 2010. Systematics of the new Australasian orb-weaving spider genus *Backbourkia* (Araneae: Araneidae: Araneinae). *Arthropod Systematics and Phylogeny* **68**: 79–111.
- Freckleton, R.P. & Harvey, P.H. 2006. Detecting non-Brownian trait evolution in adaptive radiations. *Plos Biology* **4**: 2104–2111.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research* **8**: 195–202.
- Graham, C., Ron, S., Santos, J., Schneider, C. & Moritz, C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution* **58**: 1781–1793.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Hedin, M.C. 2001. Molecular insights into species phylogeny, biogeography, and morphological stasis in the ancient spider genus *Hypochilus* (Araneae: Hypochilidae). *Molecular phylogenetics and evolution* **18**: 238–251.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 570–580.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 291–301.
- Hirzel, A.H. & Le Lay, G. 2008. Habitat suitability modelling and niche theory. *Journal of Applied Ecology* **45**: 1372–1381.
- Jakob, S.S., Heibl, C., Rödder, D. & Blattner, F.R. 2010. Population demography influences climatic niche evolution: evidence from diploid American *Hordeum* species (Poaceae). *Molecular Ecology* **19**: 1423–1438.
- Jiménez-Valverde, A., Lobo, J.M. & Hortal, J. 2008. Not as good as they seem: the importance of concepts in species distribution modelling. *Diversity and Distributions* **14**: 885–890.
- Knowles, L. & Maddison, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* **11**: 2623–2635.
- Kozak, K.H. & Wiens, J.J. 2006. Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution* **60**: 2604–2621.
- Latrubesse, E., Dasilva, S., Cozzuol, M. & Absy, M. 2007. Late Miocene continental sedimentation in southwestern Amazonia and its regional significance: biotic and geological evidence. *Journal of South American Earth Sciences* **23**: 61–80.
- Lica, K., Haseyama, F., José, C. & Carvalho, B.D. 2011. Padrões de distribuição da biodiversidade Amazônica: um ponto de vista evolutivo. *Revista da Biologia* **7**: 35–40.
- Losos, J.B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters* **11**: 995–1003.
- Maddison, W.P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* **46**: 523–536.

- Martins, F.M. 2011. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biological Journal of the Linnean Society* **104**: 499-509.
- Martins, F.M, Gifalli-Iughetti, C., Koiffman, C.P.& Harris, E.E. 2011. Coalescent analysis of mtDNA indicates Pleistocene divergence among three species of howler monkey (*Alouatta* spp.) and population subdivision within the Atlantic Coastal Forest species, *A. guariba*. *Primates* **52**: 77-87.
- Martins, R. & Bertani, R. 2007. The non-Amazonian species of the Brazilian wandering spiders of the genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae: Ctenidae), with the description of a new species. *Zootaxa* **1526**: 1–36.
- Moritz, C., Patton, J. & Schneider, C. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology* **31**: 533-563.
- Nakazato, T., Warren, D.L. & Moyle, L.C. 2010. Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany* **97**: 680-693.
- Nielsen, R. & Beaumont, M.A. 2009. Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology* **18**: 1034–1047.
- Ortiz-Jaureguizar, E. & Cladera, G. 2006. Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments* **66**: 498-532.
- Pagel, M. 1998. Inferring evolutionary processes from phylogenies. *Zoologica Scripta* **26**: 331-348.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**: 877-884.
- Pagel, M., Meade, A. & Barker, D. 2004. Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Systematic Biology* **53**: 673-684.
- Pearman, P., Guisan, A. & Broennimann, O. 2008. Niche dynamics in space and time. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 149-158.
- Peterson, A.T. 2011. Ecological niche conservatism: a time-structured review of evidence. *Journal of Biogeography* **38**: 817-827.
- Phillips, S., Anderson, R. & Schapire, R. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* **190**: 231-259.
- Polotow, D. 2011. Análise cladística da subfamília Cteninae e revisão do gênero *Calaetycheus* Simon (Araneae, Ctenidae). Tese (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. 194pp.
- Posada, D. & Crandall, K. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* **50**: 580-601.
- Pyron, R.A. & Burbrink, F.T. 2009. Lineage diversification in a widespread species: roles for niche divergence and conservatism in the common kingsnake, *Lampropeltis getula*. *Molecular Ecology* **18**: 3443-3457.
- Richards, C.L., Carstens, B.C. & Knowles, L.L. 2007. Distribution modelling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses. *Journal of Biogeography* **34**: 1833–1845.
- Rix, M.G. & Harvey, M.S. 2012. Phylogeny and historical biogeography of ancient assassin spiders (Araneae : Archaeidae) in the Australian mesic zone: Evidence for Miocene speciation within Tertiary refugia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62**: 375396.
- Rossetti, D.F. & Toledo, P.M. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* **63**: 78-89.
- Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **26**: 508-513.

- Saadi, B.A., Machette, M.N., Haller, K.M., Dart, R.L., Bradley, L. & Souza, A.M.P.D.D. 2002. Map and Database of Quaternary Faults and Lineaments in Brazil. *U.S. Geological Survey. Open-File Report 02-230, Version 1.0*. Disponível em <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230/>
- Silva-Davila, D. 2003. Higher-level relationships of the spider family Ctenidae (Araneae: Ctenoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **274**: 1–86.
- Simó, M. & Brescovit, A.D. 2001. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. *Bulletin of the British Arachnological Society* **12**: 67–82.
- Smith, T., Wayne, R. & Girman, D. 1997. A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* **276**: 1855-1857.
- Soberón, J. & Peterson, A.T. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* **2**: 1-10.
- Soberón, J. 2007. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters* **10**: 1115-1123.
- Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B., Baldissera, F.A. & Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**: 1018-1031.
- Torres-Sánchez, M. & Gasnier, T.R. 2010. Patterns of abundance, habitat use and body size structure of *Phoneutria reidyi* and *P. fera* (Araneae : Ctenidae) in a Central Amazonian rainforest. *Journal of Arachnology* **38**: 433-440.
- Vieites, D.R., Nieto-Román, S. & Wake, D.B. 2009. Reconstruction of the climate envelopes of salamanders and their evolution through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 19715-.
- Warren, D.L., Glor, R.E. & Turelli, M. 2010. ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* **33**: 607-611.
- Warren, D.L., Glor, R.E. & Turelli, M. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* **62**: 2868-2883.
- Webster, A.J. & Purvis, A. 2002. Ancestral states and evolutionary rates of continuous characters. In N. McLeod, and P. L. Forey (Eds.), *Morphology, shape and Phylogeny*. CRC Press (Pp. 247-268).
- Wiens, J.J. 2008. Commentary on Losos (2008): niche conservatism déjà vu. *Ecology Letters* **11**: 1004–1005.
- Wiens, J.J., Ackerly, D.D., Allen, A.P., Anacker, B.L., Buckley, L.B., Cornell, H.V., Damschen, E.I., Jonathan Davies, T., Grytnes, J.-A., Harrison, S.P., Hawkins, B.A., Holt, R.D., McCain, C.M. & Stephens, P.R. 2010. Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters* **13**: 1310-1324.
- Wiens, J.J. & Graham, C.H. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **36**: 519-539.

**SISTEMÁTICA E EVOLUÇÃO DE ARANHAS-ARMADEIRAS (CTENIDAE: *PHONEUTRIA*) A
PARTIR DE EVIDÊNCIAS MOLECULARES, MORFOLÓGICAS E ECOLÓGICAS**

ANEXOS

Anexo 1: Lista dos espécimes utilizados na análise de morfometria geométrica com respectivas localidades e coordenadas geográficas. Agrupados por espécie, sensu Martins & Bertani 2007.

Espécie/ Lote	Localidade	Long	Lat
<i>P. eickstedtae</i>			
DZUB3013	Brasília, DF	-47.93	-15.78
DZUB3034	Planaltina, DF	-47.67	-15.62
DZUB3043	Pirenópolis, GO	-48.90	-15.85
DZUB3420	Sobradinho, DF	-47.82	-15.63
DZUB3545	Luziania, GO	-47.95	-16.25
DZUB3554	Brasília, DF	-47.92	-15.77
DZUB3720	Sobradinho, DF	-47.82	-15.63
DZUB3788	Brasília, DF	-47.89	-15.85
DZUB4136	Sobradinho, DF	-47.82	-15.63
DZUB4203	Brasília, DF	-47.89	-15.85
DZUB4229	Brasília, DF	-47.92	-15.77
DZUB4468	Brasília, DF	-47.92	-15.77
DZUB4487	Brasília, DF	-47.89	-15.85
DZUB4615	Brasília, DF	-47.92	-15.77
DZUB4628	Brasília, DF	-47.90	-15.99
DZUB4637	Alexânia, GO	-48.51	-16.08
DZUB4965	Brasília, DF	-47.73	-15.62
DZUB4972-A	Brasília, DF	-47.73	-15.62
DZUB4972-B	Brasília, DF	-47.73	-15.62
DZUB5018	Girassol, GO	-48.78	-15.79
DZUB5106	Cocalzinho, GO	-48.78	-15.79
DZUB5110	Edilândia, GO	-48.78	-15.79
DZUB5157	São Jorge, GO	-47.47	-14.08
DZUB5414	Pirenópolis, GO	-48.95	-15.85
DZUB5825	Brasília, DF	-47.94	-15.90
IBSP161703	Campina Verde, MG	-49.49	-19.54
IBSP39468	Santa Rita do Rio Pardo, MS	-52.82	-21.32
IBSP39509	Santa Rita do Rio Pardo, MS	-52.82	-21.32
IBSP62708	Brasília, DF	-47.94	-15.90
MNRJst2	Jandáia, GO	-50.15	-17.05

MNRJst3	Lajeado, TO	-48.36	-9.75
UFBA2064	Salvador, BA	-41.02	-14.68
UFBA2391	Andaraí, BA	-41.32	-12.80
UFBA2490	Caeté-Açu, BA	-41.48	-12.62
UFBA2526	Caeté-Açu, BA	-41.48	-12.62
UFBA2527	Caeté-Açu, BA	-41.48	-12.62
UFBA2655	Mucugê, BA	-41.37	-13.00
UFMG5368	Serranópolis , GO	-52.00	-18.44
UFMG5369	Serranópolis , GO	-52.00	-18.44
UFMG5370	Serranópolis , GO	-52.00	-18.44
UFMG7074	Itacarambi, MG	-44.24	-15.15
<i>P. keyserlingi</i>			
IBSP11852	Iguape, SP	-47.56	-24.71
IBSP1359	Bertioga, SP	-46.13	-23.85
IBSP14113	Lapa , PR	-49.72	-25.77
IBSP14114	, RJ	(vazio)	(vazio)
IBSP1476	, RJ	(vazio)	(vazio)
IBSP15362	Balneário Barra do Sul, SC	-48.61	-26.46
IBSP176	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP19592	São Paulo , SP	-46.64	-23.55
IBSP2094	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP2098	Guarujá, SP	-46.25	-23.98
IBSP2127	Registro, SP	-47.84	-24.49
IBSP2128	Ubatuba, SP	-45.07	-23.43
IBSP2135	, SC	(vazio)	(vazio)
IBSP2162	Carapicuíba, SP	-46.84	-23.62
IBSP2166	São Pedro da Aldeia, RJ	-42.10	-22.83
IBSP2176	São Sebastião, SP	-45.73	-24.08
IBSP2186	Extrema, MG	-46.32	-22.85
IBSP2240	Paranaguá, PR	-48.50	-25.52
IBSP2248	Angra dos Reis, RJ	-44.32	-23.00
IBSP2445	Adrianópolis, PR	-48.99	-24.66
IBSP2459	Miracatu, SP	-47.45	-24.27
IBSP2461	Angra dos Reis, RJ	-44.32	-23.00
IBSP2494	Cananéia , SP	-47.93	-25.01
IBSP2555	Morretes, PR	-48.83	-25.47
IBSP2594	Cananéia , SP	-47.93	-25.01
IBSP2735	Peruíbe, SP	-46.98	-24.32
IBSP27966	Ubatuba, SP	-45.07	-23.43
IBSP28227	Ilha Marambaia, RJ	-43.97	-23.07
IBSP28283	Guarujá, SP	-46.25	-23.98
IBSP2847	Sete Barras, SP	-47.92	-24.38
IBSP2946	Caraguatatuba, SP	-45.40	-23.62
IBSP310	Iporanga, SP	-48.59	-24.59
IBSP3466	Cananéia , SP	-47.93	-25.01
IBSP3585	Angra dos Reis, RJ	-44.32	-23.00

IBSP36766	Armação de Búzios, RJ	-41.88	-22.75
IBSP36775	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP3750	Ubatuba, SP	-45.07	-23.43
IBSP3774	Angra dos Reis, RJ	-44.32	-23.00
IBSP37814	Ubatuba, SP	-45.07	-23.43
IBSP3783	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP3804	São Sebastião, SP	-45.73	-24.08
IBSP43867	Ilhabela, SP	-45.36	-23.78
IBSP4566	Parati, RJ	-44.70	-23.22
IBSP4568	Miracatu, SP	-47.45	-24.27
IBSP4570	Angra dos Reis, RJ	-44.32	-23.00
IBSP4571	Angra dos Reis, RJ	-44.32	-23.00
IBSP4636	Porto Belo, SC	-48.55	-27.65
IBSP4639	Extrema, MG	-46.32	-22.85
IBSP4913	Florianópolis, SC	-48.55	-27.60
IBSP4918	Belém, PA	-48.50	-1.46
IBSP5053	Florianópolis, SC	-48.55	-27.60
IBSP664	Santos, SP	-46.33	-23.96
IBSP691	Santos, SP	-46.33	-23.96
IBSP72656	Ubatuba, SP	-45.07	-23.43
IBSP7334	Morretes, PR	-48.83	-25.47
IBSP771	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP79838	Siderópolis, SC	-49.43	-28.60
IBSP871	Ilhabela, SP	-45.36	-23.78
IBSP967	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
MNHN	Rio de Janeiro, RJ	-42.76	-21.06
MNRJ34437	Resende, RJ	-44.45	-22.47
MNRJst1	Santa Teresa, ES	-40.53	-19.97
UFMG3629	Mimoso do Sul, ES	-41.37	-21.06
UFMG4895	Teresópolis, RJ	-42.99	-22.46
UFMG4988	Itatiaia, RJ	-44.61	-22.45
UFMG5553	Itatiaia, RJ	-44.61	-22.45
<i>P. nigriventer</i>			
BMNH1890712914	Rio Grande, RS	-52.06	-32.02
DZUB5202	Posse, GO	-46.00	-14.00
FZRSst1	Viamão, RS	-50.89	-30.14
IBSP11552	Candói/Mangueirinha, PR	-52.13	-25.66
IBSP116741	São Lourenço da Serra, SP	-46.93	-23.85
IBSP116758	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP14063	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP14108	Tuparendi, RS	-54.47	-27.75
IBSP14298	Paranaíba, MS	-51.18	-19.67
IBSP161702	Resende, RJ	-44.45	-22.47
IBSP1715	Santa Cruz das Palmeiras, SP	-47.23	-21.82
IBSP2164	Barbacena, MG	-43.77	-21.23
IBSP2237	Capinzal, SC	-51.23	-27.40

IBSP2291	Barra do Piraí, RJ	-43.82	-22.47
IBSP23484	Anaurilândia, MS	-52.72	-22.19
IBSP23553	Itamonte, MG	-44.87	-22.28
IBSP2511	Apiaí, SP	-48.83	-24.50
IBSP2595	Ibiúna, SP	-47.22	-23.48
IBSP27279	Bragança Paulista, SP	-46.53	-22.95
IBSP28275	Santo André, SP	-46.30	-23.78
IBSP33061	Mariana, MG	-43.42	-20.38
IBSP34983	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP36145	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP36316	Curitiba, PR	-49.27	-25.43
IBSP3635	Paranavaí, PR	-52.45	-23.07
IBSP3685	Ponta Grossa, PR	-50.15	-25.08
IBSP42384	Jacutinga, MG	-46.61	-22.29
IBSP42385	Extrema, MG	-46.32	-22.85
IBSP4749	Mirantão, MG	-44.50	-22.25
IBSP4754	Arceburgo, MG	-46.94	-21.36
IBSP489	Curitiba, PR	-49.27	-25.43
IBSP50909	Santa Terezinha de Itapevi, PR	(vazio)	(vazio)
IBSP55130	Salesópolis, SP	-45.85	-23.53
IBSP55822	Agachi, MS	-56.22	-20.28
IBSP56833	Lindóia do Sul, SC	-52.08	-27.05
IBSP57929	Candói, PR	-52.13	-25.66
IBSP57930	Pinhão, PR	-51.65	-25.68
IBSP57931	Pinhão, PR	-51.65	-25.68
IBSP59549	Volta Redonda, RJ	-44.10	-22.52
IBSP62708	Brasília, DF	-47.93	-15.78
IBSP67220	Foz do Iguaçu, PR	-54.58	-25.53
IBSP67222	Foz do Iguaçu, PR	-54.58	-25.53
IBSP67224	Foz do Iguaçu, PR	-54.58	-25.53
IBSP67225	Foz do Iguaçu, PR	-54.58	-25.53
IBSP67226	Foz do Iguaçu, PR	-54.58	-25.53
IBSP71162	Pindamonhangaba, SP	-45.45	-22.92
IBSP714	Santa Bárbara, MG	-43.42	-19.96
IBSP72030	Juquitiba, SP	-47.07	-23.92
IBSP72557	Sítio Gonçalves, MG	(vazio)	(vazio)
IBSP72584	Itapevi, SP	-46.94	-23.55
IBSP72588	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP72593	Rio Claro, SP	-47.55	-22.40
IBSP72596	Jundiaí, SP	-46.88	-23.19
IBSP72597	Cotia, SP	-46.92	-23.60
IBSP72601	Cachoeira de Minas, MG	-45.77	-22.35
IBSP72805	Brasília, DF	-47.94	-15.90
IBSP79164	Xanxerê, SC	-52.40	-26.88
IBSP79172	Xanxerê, SC	-52.40	-26.88
IBSP79207	São Miguel do Oeste, SC	-53.52	-26.73

IBSP79208	São Miguel do Oeste, SC	-53.52	-26.73
MNRJ34770	Resende, RJ	-44.45	-22.47
UFMG3613	Belo Horizonte, MG	-43.77	-19.96
UFMG3615	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG3616	Belo Horizonte, MG	-43.96	-19.86
UFMG3623	Belo Horizonte, MG	-43.97	-19.99
UFMG3625	Caeté, MG	-43.67	-19.88
UFMG3626	Brumadinho, MG	-44.24	-20.15
UFMG3627	Juatuba, MG	-44.34	-19.95
UFMG3630	Nova Lima, MG	-43.85	-19.99
UFMG3631	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG4055	Catalão, GO	-47.62	-18.11
UFMG4056	Catalão, GO	-47.62	-18.11
UFMG4057	Catalão, GO	-47.62	-18.11
UFMG4058	Catalão, GO	-47.62	-18.11
UFMG4059	Sabará, MG	-43.83	-19.91
UFMG4060	Uberlândia, MG	-48.28	-18.92
UFMG4066	Caeté, MG	-43.67	-19.88
UFMG4169	Lavras, MG	-45.00	-21.35
UFMG4170	Catalão, GO	-47.62	-18.11
UFMG4501	Cristina, MG	-45.18	-22.20
UFMG4896	Lima Duarte, MG	-43.79	-21.84
UFMG5226	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5227	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5228	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5229	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5230	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5232	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5235	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5237	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5249	Santa Barbara, MG	-43.46	-19.99
UFMG5260	Porto Alegre, RS	-51.14	-30.08
UFMG5262	Porto Alegre, RS	-51.18	-30.05
<i>P. pertyi</i>			
BMNH191535777172	Nova Friburgo, RJ	-42.51	-22.17
IBSP11856	Corumbá, MS	-57.65	-19.01
IBSP11890	Teresópolis, RJ	-42.95	-22.40
IBSP12651	Linhares, ES	-40.07	-19.38
IBSP12692	Linhares, ES	-40.07	-19.38
IBSP12867	Linhares, ES	-40.07	-19.38
IBSP12919	Linhares, ES	-40.07	-19.38
IBSP14119	Domingos Martins, ES	-40.66	-20.36
IBSP14129	Juiz de Fora, MG	-43.35	-21.76
IBSP14296	São Paulo, SP	-46.64	-23.55
IBSP14297	Domingos Martins, ES	-40.66	-20.36
IBSP144839	Jordânia, MG	-40.18	-15.88

IBSP16267	Vitor Hugo, ES	-40.82	-20.42
IBSP16521	Linhares, ES	-40.07	-19.38
IBSP2125	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP2142	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP2574	Juiz de Fora, MG	-43.35	-21.76
IBSP26722	Itamarajú, BA	-39.52	-17.03
IBSP2718	Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP27940	Mariana, MG	-43.42	-20.38
IBSP27941	Mariana, MG	-43.42	-20.38
IBSP2849	Petrópolis, RJ	-43.18	-22.51
IBSP29192	Araras, RJ	-42.97	-22.44
IBSP2970	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3141	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3142	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3154	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3157	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP31874	Petrópolis, RJ	-43.18	-22.51
IBSP31972	Teresópolis, RJ	-42.95	-22.40
IBSP3314	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3391	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3392	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP3402	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP36206	Petrópolis, RJ	-43.18	-22.51
IBSP36355	Domingos Martins, ES	-40.66	-20.36
IBSP4577	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP4688	Nova Friburgo, RJ	-42.53	-22.28
IBSP4797	Petrópolis, RJ	-43.18	-22.51
IBSP4801	Juiz de Fora, MG	-43.35	-21.76
UFMG4061	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG4165	Santa Teresa, ES	-40.53	-19.97
UFMG4166	Santa Teresa, ES	-40.53	-19.97
UFMG4500	Simonésia, MG	-42.07	-20.07
UFMG4989	Teresópolis, RJ	-42.99	-22.46
UFMG4991	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG5029	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG5256	Santa Barbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG5552	Juiz de Fora, MG	-43.32	-21.76

Anexo 2: Lista dos espécimes utilizados nas análises moleculares com respectivas localidades e coordenadas geográficas. Espécies como delimitado no capítulo I. Haplogrupo determinado pela análise molecular como mostra a Figura 2.3.

Espécie/ Haplogrupo	Localidade	Long	Lat
<i>Ctenus crulsi</i>			
UFMG4187	Belém, PA	-48.420	-1.426
UFMG5245	Rio Branco, AC	-67.624	-10.073
<i>Ctenus inaja</i>			
UFMG5247	Rio Branco, AC	-67.624	-10.073
<i>Ctenus maculisternis</i>			
UFMG4195	Belém, PA	-48.420	-1.426
<i>Ctenus ornatus</i>			
UFMG5244	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
<i>Cupiennius bimaculatus</i>			
UFMG4180	Belém, PA	-48.420	-1.426
<i>Isoctenus foliifer</i>			
UFMG5265	Itaúnas, ES	-39.699	-18.406
<i>Nothroctenus sp.</i>			
UFMG5267	Juiz de Fora, MG	-43.320	-21.761
<i>P. bahiensis</i>			
UFMG4897	Conceição da Barra, ES	-39.669	-18.346
UFMG4898	Itaúnas, ES	-39.699	-18.406
UFMG4899	Itaúnas, ES	-39.699	-18.406
<i>P. boliviensis</i>			
UFMG4890	Porto Acre, AC	-67.672	-9.751
UFMG4891	Porto Acre, AC	-67.672	-9.751
UFMG4892	Porto Acre, AC	-67.672	-9.751
UFMG4893	Rio Branco, AC	-67.624	-10.073
UFMG4894	Rio Branco, AC	-67.624	-10.073
<i>P. fera</i>			
CAS9021738	Cayenne, Guiana Francesa	-52.279	4.610
UFMG3617	Napo, Equador	-77.617	-1.066
UFMG3618	Napo, Equador	-77.617	-1.066
UFMG3622	Napo, Equador	-77.617	-1.066
<i>P. keyserlingi</i>			
Norte			
IBSP99099	Araruama, RJ	-42.333	-22.867
MNRJst1	Santa Teresa, ES	-40.533	-19.967
UFMG3629	Mimoso do Sul, ES	-41.366	-21.064
UFMG4895	Teresópolis, RJ	-42.995	-22.457
Sul			
IBSP132852	Criciúma, SC	-49.367	-28.667

IBSP72656	Ubatuba, SP	-45.050	-23.417
IBSP79838	Siderópolis, SC	-49.433	-28.567
IBSPmoela2	Guarujá, SP	-46.266	-24.050
MNRJ34437	Resende, RJ	-44.450	-22.467
UFMG4988	Itatiaia, RJ	-44.608	-22.455
<i>P. nigriventer</i>			
BH			
UFMG3613	Belo Horizonte, MG	-43.765	-19.955
UFMG3615	Santa Bárbara, MG	-43.369	-19.887
UFMG3616	Belo Horizonte, MG	-43.963	-19.861
UFMG3623	Belo Horizonte, MG	-43.965	-19.994
UFMG3625	Caeté, MG	-43.670	-19.881
UFMG3626	Brumadinho, MG	-44.237	-20.149
UFMG3627	Juatuba, MG	-44.343	-19.953
UFMG3630	Nova Lima, MG	-43.846	-19.988
UFMG3631	Santa Bárbara, MG	-43.369	-19.887
UFMG4066	Caeté, MG	-43.667	-19.883
UFMG4896	Lima Duarte, MG	-43.793	-21.843
UFMG5249	Santa Barbara, MG	-43.458	-19.995
Nordeste			
UFBA2064	Salvador, BA	-41.017	-14.683
UFBA2391	Andaraí, BA	-41.317	-12.800
UFBA2526	Caeté-Açu, BA	-41.483	-12.617
UFBA2655	Mucugê, BA	-41.367	-13.000
UFMG7074	Itacarambi, MG	-44.238	-15.151
Sudoeste			
IBSP151527	Porto Feliz, SP	-47.517	-23.200
IBSP160939	Santo Antônio do Pinhal, SP	-45.659	-22.820
UFMG4055	Catalão, GO	-47.621	-18.114
UFMG4056	Catalão, GO	-47.621	-18.114
UFMG4057	Catalão, GO	-47.621	-18.114
UFMG4058	Catalão, GO	-47.621	-18.114
UFMG4059	Sabarará, MG	-43.826	-19.914
UFMG4060	Uberlândia, MG	-48.283	-18.917
UFMG4169	Lavras, MG	-44.999	-21.349
UFMG4501	Cristina, MG	-45.183	-22.200
UFMG5226	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5227	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5228	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5229	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5230	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5232	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5235	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5237	Derrubadas, RS	-53.958	-27.248
UFMG5260	Porto Alegre, RS	-51.138	-30.079
UFMG5262	Porto Alegre, RS	-51.177	-30.052

UFMG5368	Serranópolis , GO	-52.004	-18.438
UFMG5369	Serranópolis , GO	-52.004	-18.438
UFMG5370	Serranópolis , GO	-52.004	-18.438
UFMG4170	Catalão, GO	-47.621	-18.114
<i>P. pertyi</i>			
Norte			
UFMG4061	Santa Bárbara, MG	-43.369	-19.887
UFMG4165	Santa Teresa, ES	-40.533	-19.967
UFMG4166	Santa Teresa, ES	-40.533	-19.967
UFMG4500	Simonésia, MG	-42.070	-20.074
UFMG4991	Santa Bárbara, MG	-43.369	-19.887
UFMG5029	Santa Bárbara, MG	-43.369	-19.887
UFMG5256	Santa Barbara, MG	-43.369	-19.887
Sul			
UFMG4989	Teresópolis, RJ	-42.995	-22.457
UFMG5552	Juiz de Fora, MG	-43.320	-21.761
<i>P. reidyj</i>			
IBSP160942	Belterra, PA	-54.950	-2.633
UFMG3624	Xambioá, TO	-48.563	-6.444
UFMG3628	Santa Bárbara do Pará, PA	-48.291	-1.212
UFMG4039	Belém, PA	-48.420	-1.426
UFMG4041	Belém, PA	-48.420	-1.426
UFMG4499	Santa Bárbara do Pará, PA	-48.291	-1.212
UFMG4502	Cotriguaçu, MT	-58.248	-9.840
UFMG4503	Cotriguaçu, MT	-58.248	-9.840
UFMG4504	Cotriguaçu, MT	-58.248	-9.840
UFMG4506	Cotriguaçu, MT	-58.248	-9.840
UFMG4508	Cotriguaçu, MT	-58.248	-9.840
UFMG4509	Cotriguaçu, MT	-58.248	-9.840
UFMG7075	Marabá, PA	-49.114	-5.390

Anexo 3: Lista dos espécimes examinados, mas não utilizados nas análises morfométricas e moleculares, com respectivas localidades e coordenadas geográficas. Espécies agrupadas sensu Martins & Bertani 2007.

Espécie/ Lote	Localidade	Long	Lat
<i>Ctenus crulsi</i>			
UFMG4188	Belém, PA	-48.42	-1.43
<i>Ctenus medius</i>			
UFMG3633	Mimoso do Sul, ES	-41.37	-21.06
UFMG4069	Marliéria, MG	-42.75	-19.72
<i>Ctenus medius</i>			
UFMG5259	Águas Mornas, SC	-48.84	-27.71
<i>Ctenus ornatus</i>			
UFMG5241	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
<i>Cupiennius bimaculatus</i>			
UFMG4181	Belém, PA	-48.42	-1.43
UFMG4182	Belém, PA	-48.42	-1.43
UFMG4183	Belém, PA	-48.42	-1.43
UFMG4184	Belém, PA	-48.42	-1.43
UFMG4185	Belém, PA	-48.42	-1.43
UFMG4186	Belém, PA	-48.42	-1.43
<i>Isoctenus foliifer</i>			
UFMG5264	Itaúnas, ES	-39.70	-18.41
UFMG5266	Itaúnas, ES	-39.70	-18.41
<i>P. bahiensis</i>			
IBSP58193	Itapebi, BA	-39.62	-15.95
IBSP58194	Salvador, BA	-38.33	-12.93
IBSP98066	Ilhéus, BA	-39.22	-14.77
MNRJ1480	Porto Seguro, BA	-39.14	-16.46
UFMG9407	Ilhéus, BA	-39.22	-14.77
<i>P. boliviensis</i>			
IBSP135219	Senador Guiomard, AC	-67.62	-10.07
IBSP147173	Monte Negro, RO	-63.28	-10.25
IBSP149536	Alto Alegre, RR	-62.20	3.22
IBSP149542	Alto Alegre, RR	-62.20	3.22
IBSP151206	Alto Alegre, RR	-61.48	2.88
IBSP98574	Itacoatiara, AM	-59.32	-3.15
IBSP98585	Juruá, AM	-65.77	-2.60
INPA7061	Anavilhanas, AM	-60.75	-2.00
INPA7062	Terra Nova, AM	-59.18	-4.67
INPA7063	Terra Nova, AM	-59.18	-4.67
INPA7065	Caracaraí, RR	-61.13	1.82
INPA7066	Terra Nova, AM	-59.18	-4.67
MPEG16843	Coari, AM	-65.26	-4.87
MPEG694	Coari, AM	-65.34	-4.86
MZSP38933	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP40035	Porto Velho, RO	-63.90	-8.76

MZSP40070	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
<i>P. eickstedtae</i>			
DZUB4614	Brasília, DF	-47.94	-15.90
IBSP29335	, MT	-55.75	-15.45
IBSP55130	Vale de São Domingos, MT	-59.07	-15.28
MZSP15678	Campinaçu, GO	-48.38	-13.87
UFMG1823	Ituiutaba, MG	-49.47	-18.97
UFMG3614	Unaí, MG	-46.88	-16.37
UFMG4067	Diogo Vasconcelos/Mariana, MG	-46.27	-20.45
UFMG5371	Serranópolis , GO	-52.00	-18.44
<i>P. fera</i>			
IBSP144671	Porto Velho, RO	-64.87	-9.60
IBSP149538	Alto Alegre, RR	-61.49	2.88
IBSP160957	Manaus, AM	-59.98	-2.93
INPA7069	Manaus, AM	-59.98	-2.93
INPA7070	Caracaraí, RR	-61.13	1.82
INPA7071	Caracaraí, RR	-61.13	1.82
INPA7072	Manaus, AM	-59.98	-2.93
MPEG14431	Juruti, PA	-56.19	-2.61
MPEG14433	Juruti, PA	-56.19	-2.61
MPEG14434	Juruti, PA	-56.19	-2.61
MPEG14435	Juruti, PA	-56.19	-2.61
MPEG14436	Juruti, PA	-56.19	-2.61
MPEG16841	Coari, AM	-65.26	-4.87
MPEG16842	Coari, AM	-65.15	-4.88
MPEG16844	Coari, AM	-65.19	-4.90
MPEG16845	Juruti, PA	-56.18	-2.51
MPEG7015	Almelrim, PA	-52.64	-0.70
MPEG7017	Almelrim, PA	-52.64	-0.70
MPEG7018	Almelrim, PA	-52.69	-0.59
MPEG8516	Juruti, PA	-56.00	-2.46
MZSP35501	Porto Velho, RO	-63.90	-8.76
MZSP35887	Porto Velho, RO	-63.90	-8.76
MZSP37614	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP37688	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP38052	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP40210	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
<i>P. keyserlingi</i>			
IBSP115898	Ilha Comprida, SP	-47.53	-24.73
IBSP132862	Urussanga, SC	-49.32	-28.52
IBSP151549	Iguapé, SP	-47.55	-24.70
IBSP151619	Santos, SP	-46.32	-23.95
IBSP43867	Ilhabela, SP	-45.35	-23.77
IBSP78873	, SP	-45.41	-22.64
IBSP99504	Bertioga, SP	-46.13	-23.85
MNRJ14590	Rio de Janeiro, RJ	-43.23	-22.88

MNRJ1648	Rio de Janeiro, RJ	-43.21	-22.90
MNRJ3747	Rio de Janeiro, RJ	-43.23	-22.88
MZSP18589	Ilhota , SC	-48.95	-26.80
MZSP18643	São Bento do Sul, SC	-49.22	-26.37
MZSP20566	Apiaí, SP	-48.82	-24.50
UFMG5028	Itatiaia, RJ	-44.61	-22.45
UFMG7623	Itatiaia, RJ	-44.61	-22.45
<i>P. nigriventer</i>			
IBSP116741	São Lourenço da Serra, SP	-46.94	-23.85
IBSP133201	Santo Antônio do Pinhal, SP	-45.67	-22.82
IBSP133209	Joanópolis, SP	-46.27	-22.92
IBSP133211	São Paulo, SP	-46.62	-23.52
IBSP140496	Capivari, SP	-47.50	-22.98
IBSP140498	São Paulo, SP	-46.62	-23.52
IBSP140499	Piracaia, SP	-46.33	-23.03
IBSP140500	São Paulo, SP	-46.62	-23.52
IBSP140501	São Paulo, SP	-46.62	-23.52
IBSP140502	Pilar do Sul, SP	-47.70	-23.82
IBSP143519	Pinhão/Candói, PR	-51.95	-25.65
IBSP151467	Araçariguama, SP	-47.05	-23.43
IBSP151481	Jacareí, SP	-45.97	-23.32
IBSP151482	Resende, RJ	-44.45	-22.47
IBSP151491	Joanópolis, SP	-46.27	-22.92
IBSP151492	Pilar do Sul, SP	-47.70	-23.82
IBSP151501	Nova Iguaçu, RJ	-43.45	-22.75
IBSP151502	Louveira, SP	-46.97	-23.07
IBSP151503	Nova Iguaçu, RJ	-43.45	-22.75
IBSP151510	Itapevi, SP	-46.93	-23.53
IBSP151511	Itu, SP	-47.28	-23.25
IBSP151513	Pardinho, SP	-48.37	-23.10
IBSP151531	Munhoz, MG	-46.37	-22.62
IBSP151541	Santa Branca, SP	-45.87	-23.38
IBSP151551	Sapucaí Mirim, MG	-45.75	-22.73
IBSP151580	São Roque, SP	-47.72	-23.13
IBSP151597	Santana do Parnaíba, SP	-46.92	-23.44
IBSP151652	Bofete, SP	-48.25	-23.10
IBSP151698	Resende, RJ	-44.45	-22.47
IBSP151700	Jarinú, SP	-46.72	-23.10
IBSP151701	Resende, RJ	-44.45	-22.47
IBSP151719	Resende, RJ	-44.45	-22.47
IBSP151720	Sapucaí Mirim, MG	-45.75	-22.73
IBSP151721	Ouro Fino, MG	-46.37	-22.27
IBSP151722	Resende, RJ	-44.45	-22.47
IBSP151829	Caçapava, SP	-45.70	-23.10
IBSP151830	São Paulo, SP	-46.62	-23.52
IBSP160940	Santo Antônio do Pinhal, SP	-45.66	-22.82

IBSP161704	Machado, MG	-45.92	-21.68
IBSP42385	Extrema, MG	-44.25	-15.38
IBSP50909	Santa Terezinha do Itanh, PR	0.00	0.00
IBSP55822	Agachi, MT	-56.22	-20.27
IBSP57929	Candói, PR	-52.12	-25.63
IBSP57930	Pinhão, PR	-51.62	-25.72
IBSP57931	Pinhão, PR	-51.62	-25.72
IBSP67220	, PR	-54.42	-25.60
IBSP67222	, PR	-52.18	-25.72
IBSP67224	, PR	-54.42	-25.60
IBSP67225	, PR	-54.42	-25.60
IBSP67226	Foz do Iguaçu, PR	-54.42	-25.60
IBSP72030	Jequitiba, SP	0.00	0.00
IBSP72557	Gonçalves, MG	-45.85	-22.65
IBSP79164	Xanxerê, SC	-52.40	-26.88
IBSP79208	São Miguel do Oeste, SC	-53.55	-26.75
MZSP20628	Guarulhos, SP	-46.52	-23.45
MZSP25415	São Paulo, SP	-46.62	-23.52
UFMG3621	Diogo Vasconcelos/Mariana, MG	-46.27	-20.46
UFMG3632	Vespasiano, MG	-43.92	-19.69
UFMG4062	Nova Lima, MG	-43.83	-19.98
UFMG4063	Cristina, MG	-45.25	-22.22
UFMG4064	Cristina, MG	-45.25	-22.22
UFMG4065	Cristina, MG	-45.25	-22.22
UFMG4068	Diogo Vasconcelos/Mariana, MG	-46.27	-20.45
UFMG4168	Caeté, MG	-43.67	-19.88
UFMG5035	Belo Horizonte, MG	-43.97	-19.87
UFMG5231	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5233	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5234	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5236	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5238	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5239	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5240	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5242	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5243	Derrubadas, RS	-53.96	-27.25
UFMG5372	Belo Horizonte, MG	-43.94	-19.84
UFMG5373	Belo Horizonte, MG	-43.96	-19.87
<i>P. pertyi</i>			
IBSP140407	Juiz de Fora, MG	-43.35	-21.75
UFMG1160	Caratinga, MG	-41.82	-19.73
UFMG3619	Florestal, MG	-44.43	-19.89
UFMG3620	Diogo Vasconcelos/Mariana, MG	-43.28	-20.47
UFMG4167	Santa Teresa, ES	-40.53	-19.97
UFMG5255	Santa Barbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG5551	Juiz de Fora, MG	-43.32	-21.76

UFMG5642	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
UFMG5643	Santa Bárbara, MG	-43.37	-19.89
<i>P. reidiyi</i>			
IBSP119574	Caxias, MA	-43.35	-4.85
IBSP119575	Caxias, MA	-43.35	-4.85
IBSP119576	Caxias, MA	-43.35	-4.85
IBSP119577	Caxias, MA	-43.35	-4.85
IBSP144672	Porto Velho, RO	-64.87	-9.60
IBSP160941	Belterra, PA	-54.95	-2.63
IBSP160943	Belterra, PA	-54.95	-2.63
IBSP160955	Belterra, PA	-54.95	-2.63
INPA7067	Manaus, AM	-59.96	-3.09
INPA7068	Manaus, AM	-60.03	-3.10
MPEG14432	Juruti, PA	-56.19	-2.61
MPEG16830	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16831	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16832	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16833	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16834	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16835	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16836	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16837	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16838	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16839	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG16840	Portel, PA	-51.61	-1.96
MPEG7016	Almelrim, PA	-52.65	-1.60
MPEG7019	Almelrim, PA	-52.69	-0.59
MPEG8514	Juruti, PA	-56.21	-2.47
MPEG8515	Juruti, PA	-56.00	-2.46
MZSP35747	Porto Velho, RO	-63.90	-8.76
MZSP37342	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP37615	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP37764	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP38711	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP38817	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP38869	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
MZSP40212	Porto Velho, RO	-65.33	-9.67
UFMG4040	Belém, PA	-48.42	-1.43
UFMG4498	Santa Bárbara do Pará, PA	-48.29	-1.21
UFMG4505	Cotriguaçu, MT	-58.25	-9.84
UFMG4507	Cotriguaçu, MT	-58.25	-9.84
MPEG4302	Altamira, PA	-55.43	-7.13
MPEG7020	Almelrim, PA	-52.78	-0.71
MPEG8513	Juruti, PA	-56.00	-2.46