

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Kierunek: Bioinformatyka

Studia stacjonarne pierwszego stopnia

Paweł Grygielski

121678

**Analiza filogenetyczna ptasznikowatych
(Theraphosidae) na podstawie genu
oksydazy cytochromu C1**

Phylogenetic analysis of tarantulas (Theraphosidae) based on
COI gene

Praca wykonana pod kierunkiem

Dr hab. inż. Magdaleny Zatoń-Dobrowolskiej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra genetyki

Wrocław, 2023

Streszczenie

Analiza filogenetyczna ptasznikowatych (Theraphosidae) na podstawie genu oksydazy cytochromu C1

Ptasznikowate (Theraphosidae) to jedna z najsłabiej zrozumianych rodzin pająków w kontekście filogenetycznym, jednocześnie wykazująca dużą różnorodność wśród obejmowanych przez nią gatunków.

Większość analiz filogenetycznych Theraphosidae skupia się na ich cechach morfologicznych, a ich wyniki często nie prowadzą do jasnych konkluzji. W tej pracy została podjęta próba przeprowadzenia jak najdokładniejszej analizy Theraphosidae, która bazuje na metodach filogenetyki molekularnej i wykorzystuje gen COI.

Praca nie skupia się na konkretnych podrodzinach, ani relacji pomiędzy ogólnie pojmowanymi podrodzinami ptasznikowatych, jej celem było przeprowadzenie możliwie najszerszej analizy Theraphosidae i podjęcie próby rozwikłania relacji zarówno pomiędzy podrodzinami, jak i poszczególnymi gatunkami ptasznikowatych.

Sekwencje, na podstawie których została przeprowadzona analiza pochodzą z bazy NCBI i są długości co najmniej 800 par zasad. Na podstawie stworzonego przyrównania wybrano odpowiednie modele substytucji. Dwa drzewa filogenetyczne będące podstawą tej analizy stworzone zostały metodą bayesowską w programie MrBayes, następnie z ich wykorzystaniem została przeprowadzona analiza filogenetyczna, do której dodatkowo wykorzystane zostały cechy morfologiczne konkretnych gatunków ptasznikowatych.

Znaczna większość wyników okazała się być spójna z aktualną systematyką Theraphosidae, jednak stwierdzono niewielkie różnice, które dotyczyły najczęściej najgłębszych gałęzi drzewa.

Słowa kluczowe: ptasznikowate, Theraphosidae, analiza filogenetyczna, filogenetyka molekularna, filogenetyka, COI.

Abstract

Phylogenetic analysis of tarantulas (Theraphosidae) based on COI gene

Tarantulas (Theraphosidae) is one of the least understood family of spiders in context of phylogeny, simultaneously characterized by high diversity of species included in this family.

Most of phylogenetic analysis of Theraphosidae focuses on morphological features and it's results often do not lead to clear conclusions. Basing on COI gene, the attempt to conduct the most accurate analysis of Theraphosidae with use of molecular phylogeny methods was made in this study

This study does not focus on any specific subfamilies of Theraphosidae, nor on relations between generally understood families, it's purpous was to conduct as wide analysis of Theraphoside as possible and to make an attempt of solving relations between subfamilies as well as between specific species of tarantulas.

Sequences on which this analysis is based, come from NCBI database and their lenght is at least 800 base pairs each. Relying on alignment created in this study, appropriate substitution models were chosen. Two phylogenetic trees which this analysis is based on, were created with bayesian methods in MrBayes, then with it's use, phylogenetic analysis was conducted with additional use of morphologival features of specific tarantula species.

Most of results turned out to becoherent with current systematics of Theraphosidae, yet minor differences regarding mostly the deepest branches of tree were found.

Keywords: tarantulas, Theraphosidae, phylogenetic analysis, molecular phylogeny, phylogeny, COI.

SPIS TREŚCI

WSTĘP I PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	2
Ptasznikowate	2
Gen oksydazy cytochromu C1	3
Metody filogenetyczne	4
Cel pracy.....	5
MATERIAŁ I METODY	5
MATERIAŁ.....	5
Pozyskanie danych potrzebnych do analizy	5
Wybór grupy zewnętrznej.....	10
METODY	10
Przyrównanie sekwencji genu COI dla obecnych w analizie gatunków Theraphosidae..	11
Pozyskanie danych potrzebnych do analizy	11
Wybór modelu substytucji	11
Tworzenie drzewa filogenetycznego	11
WYNIKI I DYSKUSJA	12
Podział Theraphosidae na podrodziny	18
Podział podrodziny Theraphosinae.....	18
Hapalopini.....	18
<i>Bonnetina</i> / <i>Schizopelma</i> (Hapalopini)	18
Rodzaje blisko spokrewnione z <i>Bonnetina</i> (Hapalopini) i <i>Hemirrhagus eros</i>	24
Grammostolini	27
Theraphosini	27
<i>Aphonopelma</i> , <i>Brachypelma</i> (Theraphosini)	27
<i>Lasiadora</i> , <i>Nhandu</i> , <i>Phormictopus</i> (Theraphosini)	30
<i>T. albopilosus</i> i <i>L. difficilis</i> (Theraphosini)	31
<i>Tliltocatl</i> , <i>Acanthoscurria</i> , <i>Eupalaestrus</i> (Theraphosini)	33
Gatunki nienależące do rodziny Theraphosinae.	34
Różnice pomiędzy drzewami.....	36
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	36
BIBLIOGRAFIA	38

WSTĘP I PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

Ptasznikowate

Theraphosidae (ptasznikowate) jest to monofiletyczna rodzina pajaków z podrzędu Ophisthotelae. Są najliczniejszą rodziną przynależącą do infrarzędu Mygalomorphae. Na dzień 20.11.2022 opisano 14 podrodzin, podzielonych na 157 rodzajów, wśród których sklasyfikowano 1047 gatunków. Występują w Ameryce Południowej, na południu Ameryki Północnej i Europy, a także w całej Afryce, Australii oraz w ciepłych krajach Azji (Taksonomiczna baza danych dotycząca rodziny Theraphosidae - www.tarantupedia.com).

Większość gatunków ptaszników osiąga duże rozmiary. Do Theraphosidae należy największy na świecie rodzaj pajaków – *Theraphosa*, którego przedstawiciele osiągają rozstaw odnóży wynoszący nawet do 26cm (Silva i in., 2019). Istnieją również niewielkie gatunki ptasznikowatych, najmniejszym znanym gatunkiem jest *Aphonopelma paloma*, którego rozstaw odnóży około 15mm (Thomas R. Prentice, 1992) (Rycina 1).



Rycina 1. Porównanie dorosłej samicy *Theraphosa blondi* (jeden z największych gatunków pajaków na świecie) oraz dorosłej samicy *Cyriocosmus elegans* (jeden z mniejszych gatunków Theraphosidae) (Autorzy zdjęć: Aleksandra Poźniak 2023, Bartosz Kubiak 2023)

Theraphosidae są to drapieżniki o nocnym trybie życia. Występują wśród nich gatunki podziemne, naziemne oraz nadrzewne. Większość po osiągnięciu dorosłości wykazuje wyraźny dymorfizm płciowy. Pomiędzy gatunkami mogą występować znaczne różnice w osiągniętych

przez nie rozmiarach, czy budowie ciała, także ich ubarwienie jest bardzo zróżnicowane. Ptasznikowate mają słaby wzrok, a do polowania wykorzystują głównie swoje zdolności do wyczuwania drgań. Zwykle nie polują aktywnie, czekają w ukryciu, aż ofiara podejdzie wystarczająco blisko. Część gatunków używa dużych ilości pajęczyny (np. *Chromatopelma cyaneopubescens*), nie tworzą jednak sieci łownych. Jad ptasznikowatych ma złożony i zróżnicowany skład. Zawiera sole nieorganiczne, wolne aminokwasy, poliaminy, białka, peptydy, neurotransmitery. Ze względu na neurotoksyny zawarte w jadzie ptasznikowatych, u ich ofiar najczęściej występuje paraliż (Macedo i in., 2021). Działanie jadu na człowieka jest zróżnicowane i zależy od gatunku. Jego potencjał jest zazwyczaj znacznie wyższy u gatunków pochodzących z Azji i Afryki. Niektóre gatunki ptaszników posiadają włoski parzące (zwykle, choć nie zawsze występują one na odwłoku), stanowiące narzędzie obrony przed drapieżnikami. W przypadku większości gatunków posiadających włoski parzące, pająk za pomocą ostatniej pary odnóży kroczych wyrzuca w powietrze ostro zakończone włoski, które wbijają się w napastnika, powodując podrażnienia (Bartani i Augusto, 1995).

Samice zwykle opiekują się potomstwem do momentu jego przejścia ze stadium larwalnego w stadium nimfalne (u większości gatunków występują 2 stadia larwalne). Liczba potomstwa znacznie różni się w zależności od gatunku i może wahać się od kilkunastu do ponad tysiąca jaj w kokonie. Samice osiągają dojrzałość płciową w różnym wieku i przechodzą wylinki przez całe życie, natomiast samce po osiągnięciu dojrzałości płciowej nie przechodzą już wylinek, ich długość życia jest jednocześnie znacznie krótsza. Długość życia samic od momentu osiągnięcia dojrzałości płciowej u niektórych gatunków może przekraczać 20 lat, podczas gdy samce tych samych gatunków rzadko przekracza 2 lata (Criscuolo i in., 2010).

Ptasznikowate są rodziną pajęczaków stosunkowo słabo przebadaną filogenetycznie. Większość badań dotyczących Theraphosidae skupia się na podrodzinie Theraphosinae i oparty jest w głównej mierze o cechy morfologiczne (Ortiz i in., 2018).

Gen oksydazy cytochromu C1

Oksydaza cytochromu C1 jest podjednostką IV kompleksu łańcucha oddechowego, enzym ten jest kluczowy w oddychaniu tlenowym. Kodowana jest przez bogaty w guaninę gen COI. Gen oksydazy cytochromu c1 jest bardzo często wykorzystywany filogenetyce molekularnej jako marker (Souza i in., 2016).

Podczas wnioskowania filogenetycznego nierzadko stosuje się fragmenty genu COI. Region blisko końca 5' jest szczególnie często wykorzystywany do barcodingu DNA (Souza i

in., 2016). Ze względu na popularność COI w barcodingu DNA, sekwencje fragmentów tego genu są szeroko dostępne w bankach genów dla wielu gatunków zwierząt, w tym rodziny Theraphosidae. Gen CO1 był wykorzystywany do identyfikacji gatunków pająków z rodzin Salticidae (skakunowate) oraz Lycosidae (pogońcowate). Badania pokazują, że barcoding DNA w przypadku gatunków pająków należących do powyższych rodzin może być skuteczniejszy niż ich identyfikacja na podstawie cech morfologicznych (Naseem i Tahir, 2016).

Analiza filogenetyczna innej rodziny pająków – Theriidae (omanikowate), przeprowadzona między innymi na podstawie genu CO1, pokazuje, że niektóre z synapomorfii nie zgadzają się z przeprowadzoną analizą. Dodatkowo stwierdzono, że rodzaj *Phoroncidia*, posiadający wiele klasycznych synapomorfii np. brak paracymbium, może w rzeczywistości nie należeć do rodziny Theriidae (Arnedo i in., 2003). Badania te pokazują, że cechy morfologiczne, czy np. sposób polowania wykorzystywane w kladystyce, mogą być poddawane w wątpliwość, gdyż ich zbieżność nie zawsze musi prawidłowo wskazywać pokrewieństwo, choć w większości przypadków wyniki analizy były zbieżne z dotychczasowym umiejscowieniem taksonów.

Metody filogenetyczne

Klasyfikacja organizmów żywych mogą opierać się na cechach fenotypowych organizmów, takich jak cechy morfologiczne czy zachowanie, a także na podstawie materiału genetycznego (filogenetyka molekularna). Wynikiem analizy filogenetycznej opartej o filogenetykę molekularną zazwyczaj jest drzewo filogenetyczne.

Jedną z metod tworzenia drzew filogenetycznych bazuje na twierdzeniu Bayesa

- $P(A)$ – prawdopodobieństwo zajścia zdarzenia A
- $P(B)$ – prawdopodobieństwo zajścia zdarzenia B
- $P(A|B)$ – prawdopodobieństwo zajścia zdarzenia A przy założeniu, że zaszło zdarzenie B
- $P(A|B) = \frac{P(B|A)P(A)}{P(B)}$

Program MrBayes, który opiera się na tej metodzie, korzysta z próbkowania mcmc. Do przeszukiwania przestrzeni wszystkich możliwych drzew wykorzystuje łańcuchy Markowa. W programie bazowo wykorzystywany jest algorytm Metropolis-coupled MCMC (MC^3), wykazujący się wysoką wydajnością spowodowaną parowaniem łańcuchów markowa, przy jednoczesnym zachowaniu rozkładu stacjonarnego (Huelsenbeck i Ronquist, 2001, Geyer,

1991). Drzewa tworzone metodą bayesowską pozwalają na otrzymanie wyników o podobnej dokładności do wyników otrzymywanych za pomocą Metody największej wiarygodności, a jednocześnie ich tworzenie przebiega znacznie szybciej. (Douady i in. 2003).

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie relacji między gatunkami Theraphosidae za pomocą metod filogenetycznych i w oparciu o drzewo filogenetyczne stworzone na podstawie fragmentarycznych sekwencji genu COI.

MATERIAŁ I METODY

Material

Pozyskanie danych potrzebnych do analizy

Wszystkie sekwencje genu COI wykorzystane w analizie pochodzą z bazy danych NCBI, z której zostały bezpośrednio pobrane w formacie fasta. Podczas przeszukiwania bazy, pomijane były sekwencje krótsze niż 800 par zasad. Sekwencje oznaczone wyłącznie nazwą rodzajową, przy których nie zidentyfikowano gatunku (z pominięciem rodzajów, do których należy wyłącznie jeden gatunek), także nie zostały włączone do analizy. Wszystkie gatunki, dla których dostępne są sekwencje nie krótsze niż 800bp, zostały uwzględnione w analizie. Dla niektórych gatunków dostępna była więcej niż jedna sekwencja nadająca się do analizy, w takich przypadkach wykorzystana została większa liczba sekwencji dla pojedynczego gatunku.

Ze względu na fakt, że sekwencje zamieszczane w bazie NCBI oznaczane są w pierwszej kolejności za pomocą SeqID (każda sekwencja zamieszczona w bazie musi posiadać swoje unikalne ID), linie tekstowe w każdej sekwencji zostały edytowane tak, by pierwsza po znaku „>” (rozpoczynającym linię tekstową) znajdowała się nazwa gatunkowa. Dalsze części linii tytułowych pozostały niezmienione. Modyfikacje te zostały wprowadzone w celu ułatwienia edycji przyrównania i interpretacji drzewa, gdyż zarówno w programie Seaview, jak i w drzewie utworzonym za pomocą MrBayes, sekwencje są oznaczone jedynie tekstem występującym po „>” do pierwszej spacji. Bez edycji linii tekstowych zamiast nazw gatunkowych widać byłoby jedynie ID sekwencji, co byłoby znacznym utrudnieniem podczas dalszej pracy. W przypadkach, gdy kilka sekwencji należało do tego samego gatunku, po nazwie gatunkowej dopisane zostały liczby, dzięki którym możliwe było odróżnienie

sekwencji. Dodanie liczb do nazw gatunkowych jest konieczne również ze względu na fakt, że program MrBayes wymaga, by każda „nazwa sekwencji” w formacie nexus była unikalna.

Informacje dotyczące konkretnych gatunków ptasznikowatych, takie jak podrodzina, czy region występowania, zostały zebrane za pomocą Tarantupedia, która jest największą bazą danych dotyczącą Theraphosidae (Tabela 1 i Rycina 2). Wszystkie informacje zawarte w tej bazie są poparte dostępnymi w niej artykułami naukowymi. Informacje dotyczące środowiska życia opisanych gatunków pochodzą z wieloletnich obserwacji ptaszników przez hodowców tych zwierząt, w tym z moich własnych doświadczeń, a także z dostępnych informacji o stanowiskach występowania kolejnych gatunków.

Tabela 1. Informacje dodatkowe o gatunkach, których sekwencje genu COI zostały użyte w analizie

Nr.	Rodzaj	Gatunek	Podrodzina	Środowiska życia	Region	Kraj
1	<i>Acanthoscurria</i>	<i>geniculata</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia
2	<i>Aphonopelma</i>	<i>hentzi</i>	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Północna	USA, Meksyk
3	<i>Aphonopelma</i>	<i>joshua</i>	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Północna	USA
4	<i>Aphonopelma</i>	<i>mojave</i>	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Północna	USA
5	<i>Aphonopelma</i>	<i>paloma</i>	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Północna	USA
6	<i>Aphonopelma</i>	<i>seemanni</i> **	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Środkowa	Kostaryka, Honduras, Nikaragua
7	<i>Avicularia</i>	<i>avicularia</i>	Avicularinae	Nadrzewny	Ameryka Południowa	Wenezuela, Trynidad i Tobago, Brazylia, Gujana, Gujana Francuska

Nr.	Rodzaj	Gatunek	Podrodzina	Środowiska życia	Region	Kraj
8	<i>Bonnetina</i>	<i>alagoni</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
9	<i>Bonnetina</i>	<i>aviae</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
10	<i>Bonnetina</i>	<i>cyaneifemur</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
11	<i>Bonnetina</i>	<i>flammigera</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
12	<i>Bonnetina</i>	<i>hijmenseni</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
13	<i>Bonnetina</i>	<i>hobbit</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
14	<i>Bonnetina</i>	<i>julesvernei</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
15	<i>Bonnetina</i>	<i>malinalli</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
16	<i>Bonnetina</i>	<i>megagyana</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
17	<i>Bonnetina</i>	<i>minax</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
18	<i>Bonnetina</i>	<i>papalutlensis</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
19	<i>Bonnetina</i>	<i>tanzeri</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
20	<i>Bonnetina</i>	<i>tenuiverpis</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
21	<i>Bonnetina</i>	<i>tindoo</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
22	<i>Bonnetina</i>	<i>unam</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
23	<i>Bonnetina</i>	<i>vittata</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk

Nr.	Rodzaj	Gatunek	Podrodzina	Środowiska życia	Region	Kraj
24	<i>Brachypelma</i>	<i>emilia</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna/ Środkowa	Meksyk, Panama
25	<i>Cardiopelma</i>	<i>mascatum*</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
26	<i>Chilobrachys</i>	<i>huahini**</i>	Selenocosmiinae	Podziemny	Azja	Tajlandia
27	<i>Cyriocosmus</i>	<i>itayensis</i>	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Południowa	Peru
28	<i>Cyriocosmus</i>	<i>perezmilesi</i>	Theraphosinae	Podziemny	Ameryka Południowa	Boliwia
29	<i>Davus</i>	<i>fasciatus</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Środkowa	Kostaryka
30	<i>Eupalaestrus</i>	<i>campestratus</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia, Argentyna, Paragwaj
31	<i>Grammostola</i>	<i>pulchripes</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Argentyna, Paragwaj
32	<i>Grammostola</i>	<i>rosea</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Chile, Argentyna
33	<i>Hemirrhagus</i>	<i>eros</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
34	<i>Homoeomma</i>	<i>uruguayense</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Urugwaj, Argentyna
35	<i>Ischnocolus</i>	<i>valentinus</i>	Ischnocolinae	Naziemny	Afryka Północna, Europa Południowa	Hiszpania, Włochy, Algieria, Maroko, Tunezja, Libia
36	<i>Kochiana</i>	<i>brunnipes*</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia
37	<i>Lasiodora</i>	<i>difficilis</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia

Nr.	Rodzaj	Gatunek	Podrodzina	Środowiska życia	Region	Kraj
38	<i>Lasiodora</i>	<i>klugi</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia
39	<i>Lasiodora</i>	<i>parahybana</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia
40	<i>Magnacarina</i>	<i>primaverensis</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
41	<i>Nhandu</i>	<i>chromatus</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia, Paragwaj
42	<i>Nhandu</i>	<i>tripepii</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Brazylia
43	<i>Phormictopus</i>	<i>cautus</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Kuba
44	<i>Plesiopelma</i>	<i>longisternale</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa	Argentyna, Urugwaj
45	<i>Poecilotheria</i>	<i>regalis</i>	Poecilotheriinae	Nadrzewny	Azja	Indie
46	<i>Schizopelma</i>	<i>bicarinatum</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
47	<i>Schizopelma</i>	<i>juxtantricola</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna	Meksyk
48	<i>Tliltocatl</i>	<i>albopilosus</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Południowa, Środkowa, Północna	Nikaragua, Kostaryka, Panama, Brazylia, Gwatemala, Wenezuela, Meksyk
49	<i>Tliltocatl</i>	<i>vagans</i>	Theraphosinae	Naziemny	Ameryka Północna, Ameryka Środkowa	Meksyk, Gwatemala, Belize

* Rodzaj potwierdzony, gatunek niepotwierdzony, rodzaj zawiera tylko jeden gatunek.

** Gatunek usunięty z analizy.



Rycina 2. Mapa lokalizacji gatunków poddawanych analizie (Wikimedia Commons - https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page)

Wybór grupy zewnętrznej

Do ukorzenia drzewa filogenetycznego konieczna jest grupa zewnętrzna (outgrupa). W przypadku rodziny Theraphosidae, będącej jedną z najbardziej prymitywnych wśród pajaków, znalezienie grupy oddzielonej wcześniej, należącej do rzędu Aranea (pajaki), czy nawet do gromady Arachnida stanowi pewien problem. Najbardziej prymitywną rodziną wśród pajaków jest prawdopodobnie Liphistiidae, jest to jedyna rodzina należąca do podrzędu Mesothelae (Gillespie i Spagna, 2009). Pajaki należące do tej rodziny mogłyby stanowić dobrą grupę zewnętrzną w analizie filogenetycznej Theraphosidae, jednak wystarczająco długie sekwencje genu COI nie są dostępne dla żadnego gatunku należącego do Liphistiidae. W związku z powyższym, grupę zewnętrzną stanowi jedyny gatunek krocionoga, dla którego udało się znaleźć wystarczająco długie sekwencje COI – *Brachycybe rosea*.

Metody

Ta praca skupia się przede wszystkim na filogenetyce molekularnej i obejmuje możliwie jak najwięcej gatunków ptasznikowatych. Cechy morfologiczne w miarę możliwości zostały zestawione z wynikami metod filogenetyki molekularnej w celu sprawdzenia ich zbieżności i jak najgłębszego zrozumienia wyników.

Przyrównanie sekwencji genu COI dla obecnych w analizie gatunków Theraphosidae

Program Seaview obsługuje wyłącznie jeden plik na raz, konieczne było więc połączenie wszystkich plików fasta w jeden plik wsadowy, co zostało wykonane za pomocą prostego skryptu ręcznie napisanego w języku bash. Utworzony w ten sposób plik wsadowy umożliwia programowi odczytanie wszystkich sekwencji.

Przyrównanie sekwencji zostało wykonane w programie Seaview za pomocą algorytmu muscle.

Wybór modelu substytucji

W celu stworzenia dokładnego drzewa trzeba dokonać wyboru modelu substytucji. W tym celu wykorzystany został program jModelTest 2.10. Ze względu na to, że presja doboru naturalnego jest inna w każdej pozycji w kodonie, oprócz modelu dla całego genu wybrane zostały również modele dla 1, 2 i 3 litery w kodonach. Takie działanie pozwala na utworzenie dwóch drzew i umożliwia dokładniejszą analizę. Podział przyrównania na kolejne litery kodonu został przeprowadzony w programie Seaview, a następnie za pomocą jModelTest znaleziony został odpowiedni model dla całego genu i pojedynczych liter w kodonach w oparciu o trzy kryteria: AIC, AICc, oraz BIC.

Tworzenie drzewa filogenetycznego

Do stworzenia drzewa filogenetycznego został wykorzystany program MrBayes, który wymaga, by plik z przyrównaniem zapisany był w formacie nexus. Do przeformatowania przyrównania ponownie wykorzystany został program Seaview.

W pierwszym drzewie, po wyborze modelu wskazanego w analizie w programie jModelTest, konieczne jest podanie ilości kroków w łańcuchach Markowa, które ma wykonać program. Pierwszym celem przy wyborze kroków jest osiągnięcie konwergencji pomiędzy robotami (modele w programie MrBayes to odchylenie standardowe pomiędzy dwoma robotami, składającymi się z łańcuchów Markowa). W tym celu program musi wykonać tyle obliczeń, by odchylenie standardowe spadło poniżej 0.01.

W celu stworzenia drugiego drzewa, w którym należy wybrać różne modele dla różnych liter kodonów, trzeba podzielić dane umieszczając je w charsetach (zbiorach). Trzy charsety odpowiadają trzem literom w kodonach. Konieczne jest utworzenie partycji, do której przypisane zostaną wcześniej stworzone charsety, a następnie jej uaktywnienie. Wybór modelu przeprowadzamy osobno dla każdego charsetu. Po wybraniu modeli dalsze tworzenie drzewa

jest identyczne jak w przypadku tworzenia drzewa bez podziału na charsety, konieczny jest więc wybór ilości kroków.

Dodatkowo otrzymane drzewa były edytowane w programie Figtree w celu dalszego opracowania, w tym eksportowania, wyświetlania i edycji.

WYNIKI I DYSKUSJA

Po stworzeniu alignmentu, z analizy zostały wykluczone sekwencje *Chilobrachys huahini* oraz *Aphonopelma seemanni*, które pomimo podobnej długości znacząco skracają przyrównanie, ze względu na duże różnice miejsca rozpoczynania się tych sekwencji w stosunku do pozostałych. Usunięta została także jedna z sekwencji *Poecilotheria regalis*, która bardzo znacząco różniła się od pozostałych sekwencji tego gatunku użytych w analizie. Ze względu na różną długość oraz miejsca rozpoczynania się używanych w analizie sekwencji fragmentów genu COI, konieczne było również przycięcie sekwencji na początku i końcu przyrównania tak, by zaczynały i kończyły się w tym samym miejscu. Powstałe przyrównanie zawiera ostatecznie 97 sekwencji (w tym 3 sekwencje *Brachygybe rosea*, stanowiące outgrupę) o długości 882 bp.

Analiza wyników uzyskanych dla określenia najlepszego modelu substytucji w odniesieniu do analizowanych sekwencji, pozwoliła wskazać odpowiednie modele zarówno dla całego genu, jak i dla poszczególnych pozycji w kodonie (Tabela 2).

Tabela 2. Wybrane modele substytucji

	Kryteria wyboru modelu		
	AIC	AICc	BIC
Cały gen	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
1 litera	GTR+G	GTR+G	GTR+G
2 litera	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
3 litera	GTR+G	HKY+G	GTR+G

W związku z powyższym, dla całego genu wybierzemy model GTR+I+G, natomiast dla 1 litery kodonu GTR+G, dla 2 litery GTR+I+G, a dla 3 litery GTR+G, gdyż to ten model został wytypowany na podstawie 2 kryteriów.

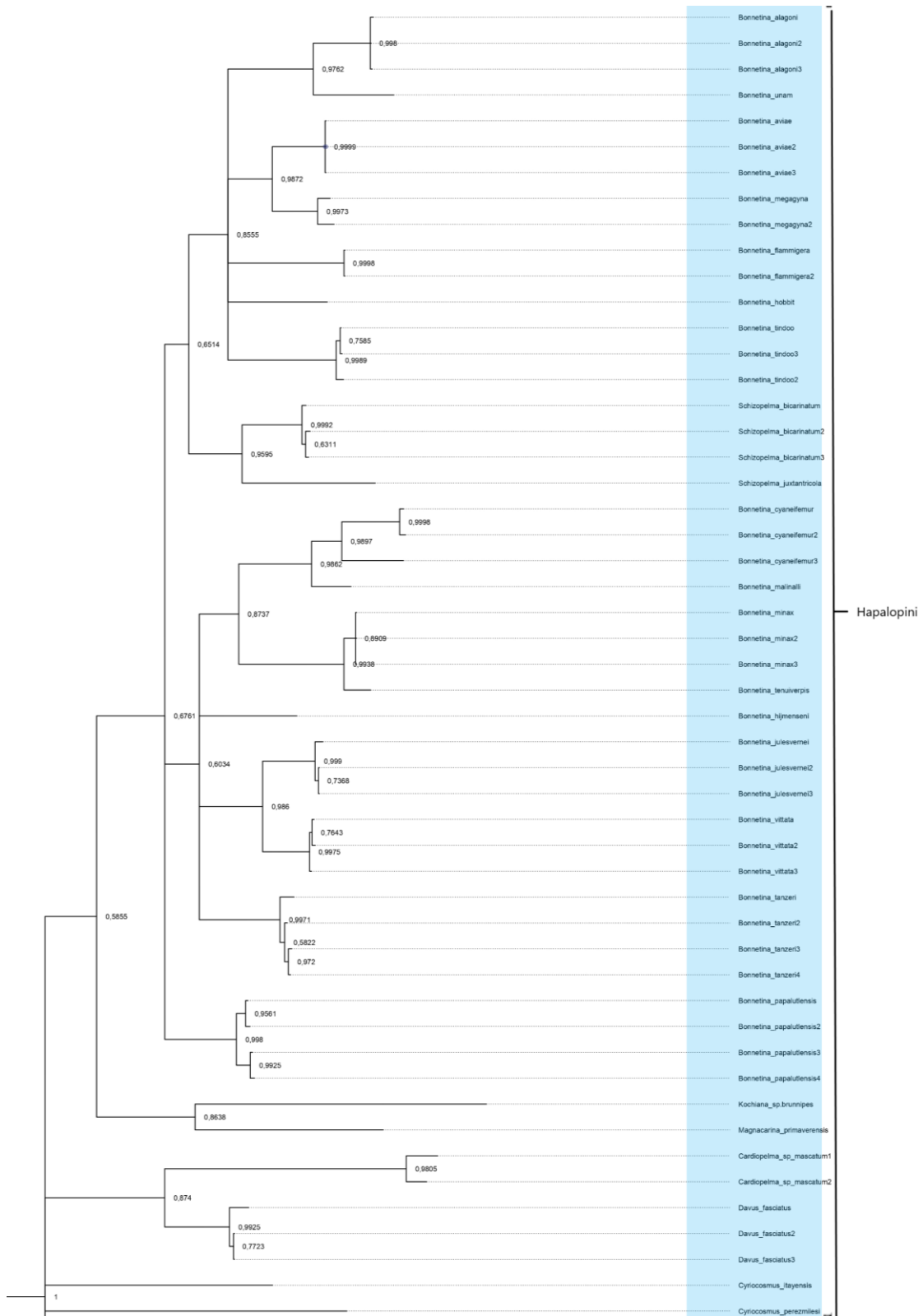
W przypadku pierwszego drzewa, konwergencja została osiągnięta po wykonaniu 2510000 kroków, jednak w celu przeprowadzenia dokładnej analizy, wprowadzone zostało dodatkowe 7530000 kroków (trzykrotność kroków potrzebnych do osiągnięcia odchylenia standardowego równego 0.01). Obliczenia w przypadku pierwszego drzewa trwały około 19 godzin, nie udało się jednak stworzyć drzewa konsensusowego, ze względu na fakt, że w liniach tytułowych 2 sekwencji, znajdowała się dokładnie ta sama nazwa (*Cardiopelma_sp.mascatum*), co zostało pominięte podczas dostosowywania sekwencji. Zmiana nazwy w plikach utworzonych przez MrBayes nie przynosi w takiej sytuacji oczekiwanych skutków, a obliczenia muszą zostać wykonane ponownie na pliku wsadowym ze zmienioną nazwą gatunkową, w związku z czym wszystkie powyższe kroki musiały zostać powtórzone. Po ponownym przeprowadzeniu obliczeń udało się utworzyć drzewo konsensusowe.

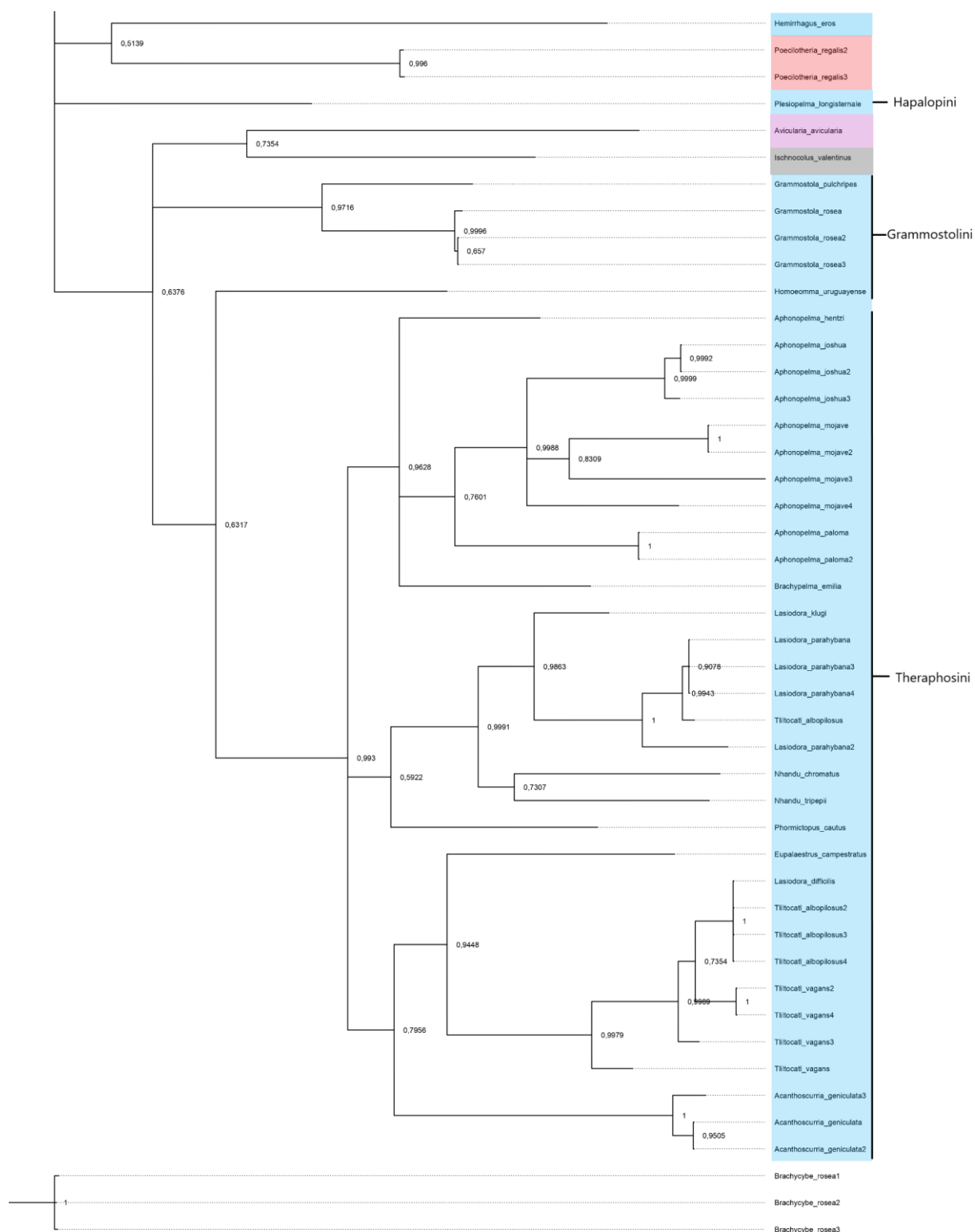
Dla zbiorów pierwszego i trzeciego, które odpowiadają pierwszej i trzeciej literze w kodonie, zgodnie z wcześniejszymi obliczeniami przeprowadzonymi w jModelTest (Tabela 2) należy wybrać model GTR+G, a dla 2 charsetu odpowiednim modelem jest GTR+I+G.

Konwergencja w przypadku drugiego drzewa została osiągnięta po 3200000 kroków i tak jak poprzednio, dodana została trzykrotność kroków potrzebnych do osiągnięcia zbieżności, a więc 9600000 kroków. Wykonanie całości obliczeń w tym przypadku zajęło programowi około 26 godzin.

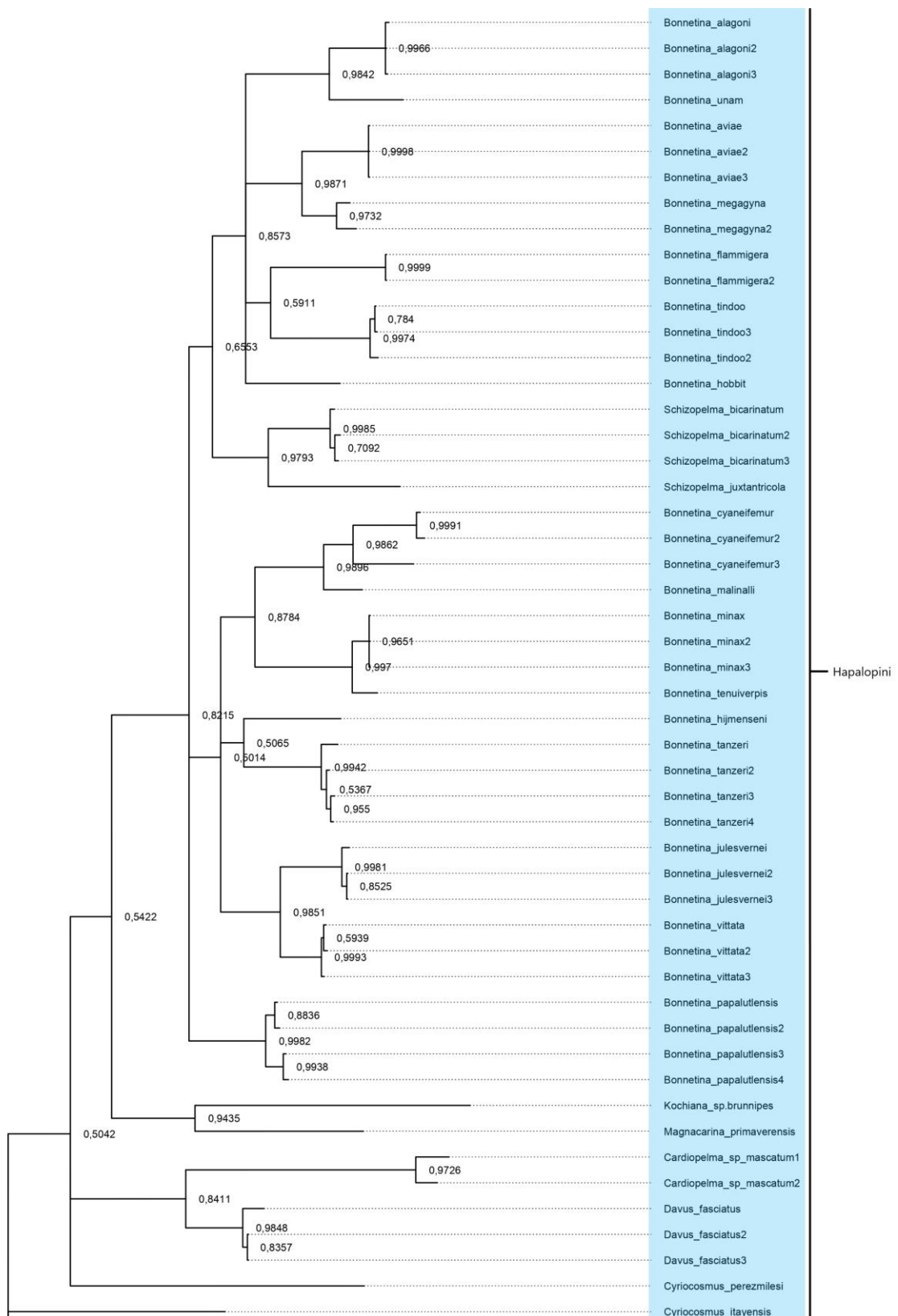
Przy pomocy programu MrBayes zostały utworzone dwa drzewa filogenetyczne, pokazujące relacje pomiędzy gatunkami Theraphosidae, na podstawie sekwencji fragmentów genu CO1.

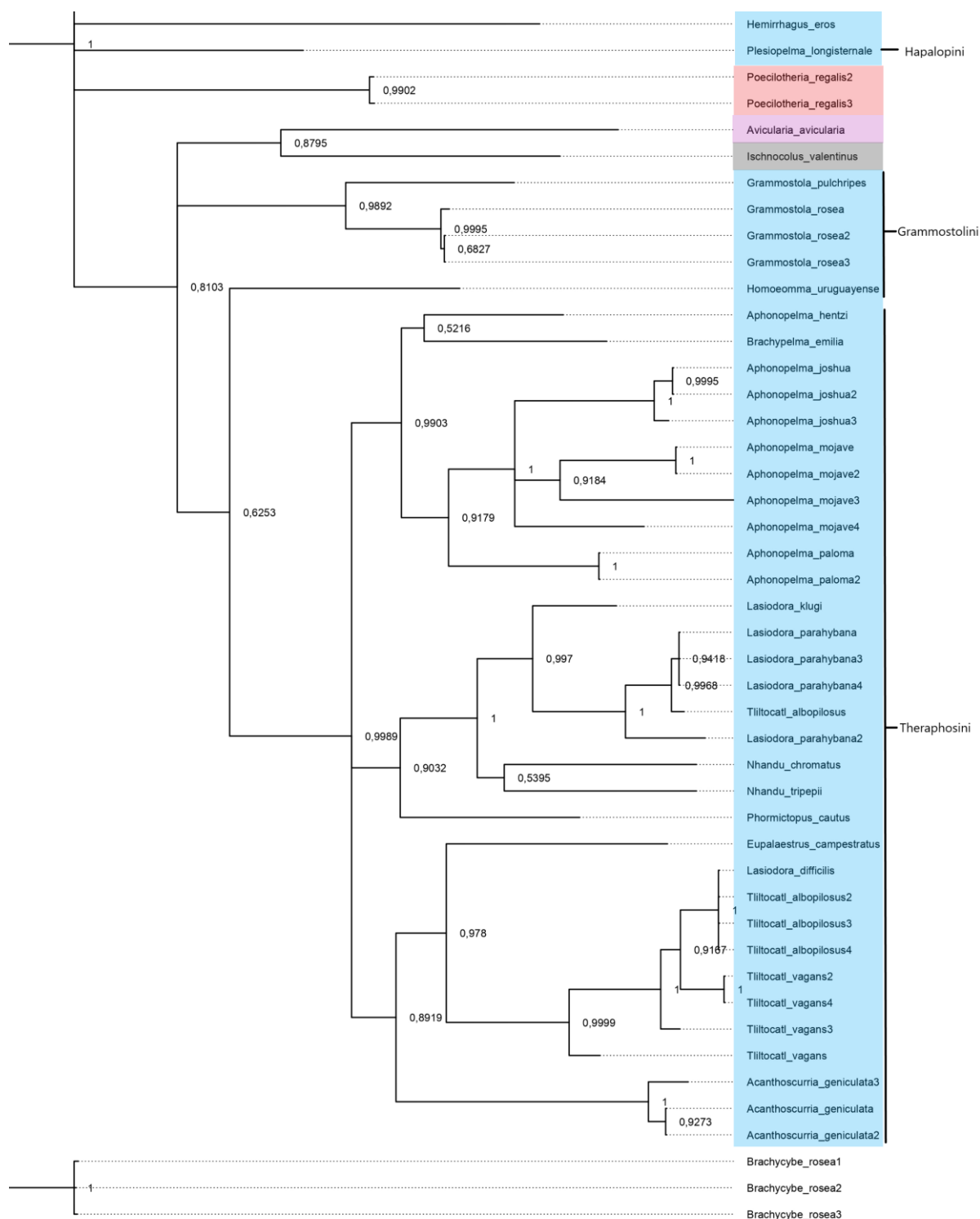
Ze względu na dużą liczbę sekwencji poddanych analizie, drzewo w pierwotnej formie byłoby trudne lub niemożliwe do odczytania, dlatego oba drzewa zostały podzielone na dwie części i przycięte w taki sposób, by ułatwić ich analizowanie. Dodatkowo w programie Figtree zostały dodane prawdopodobieństwa na węzłach drzewa. Dodane zostały również zaznaczenia wskazujące przynależność do podrodziny oraz plemienia.





Rycina 3. Drzewo filogenetyczne stworzone przy użyciu jednego modelu (GTR+I+G) (podzielone). Kolory odnoszą się do podrodzin Theraphosidae: kolor niebieski – Theraphosinae, kolor czerwony – Poecilotheriinae, kolor fioletowy – Aviculariinae, kolor szary – Ischnocolinae





Rycina 4. Drzewo filogenetyczne stworzone przy użyciu różnych modeli dla różnych liter kodonów (GTR+I+G, GTR+G) (podzielone). Kolory odnoszą się do podrodzin Theraphosidae: kolor niebieski – Theraphosinae, kolor czerwony – Poecilotheriinae, kolor fioletowy – Aviculariinae, kolor szary – Ischnocolinae

Rozbieżność pomiędzy drzewami wynika z różnic w wyborze modeli substytucji.

Podział Theraphosidae na podrodziny

W tej analizie znaleźli się przedstawiciele następujących podrodzin ptasznikowatych: Theraphosinae, Poecilotheriinae, Avicularinae, Ischnocolinae.

Podział podrodziny Theraphosinae

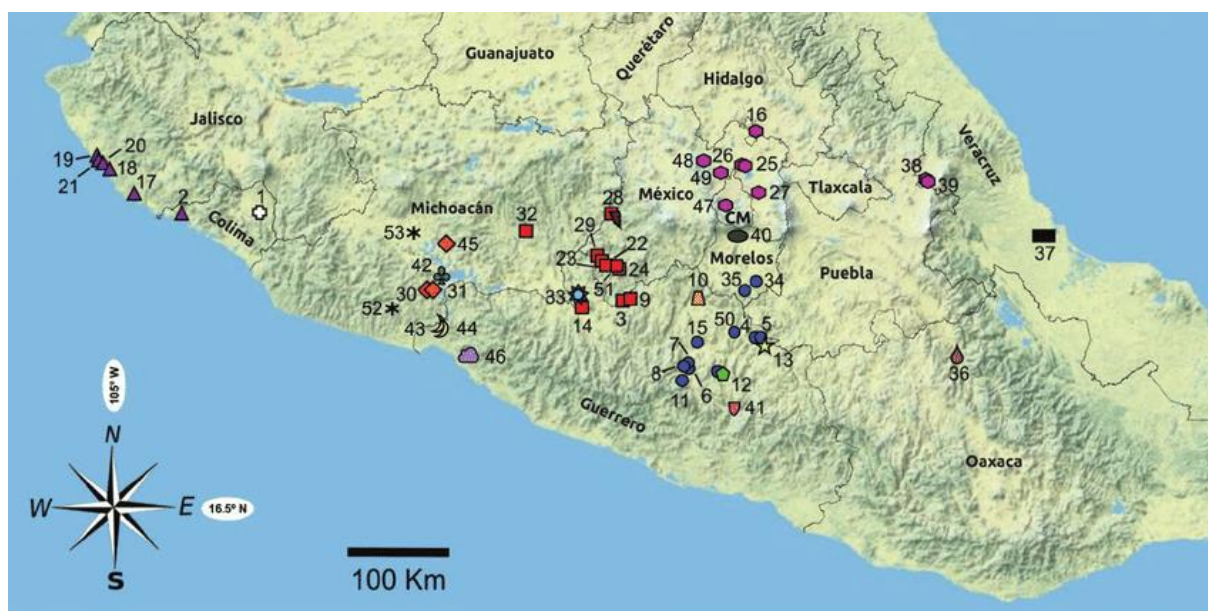
Istnieje hipotetyczny podział podrodziny Theraphosinae na plemiona Grammostolini, Hapalopini i Theraphosini (Turner i in., 2017). Podział ten na tą chwilę nie jest oficjalnie uznany, jednak został wykorzystany w tej pracy, między innymi ze względu na to, że oprócz metod filogenetyki molekularnej, opiera się również na cechach morfologicznych, a to pomoże w określeniu zbieżności tych cech z budową genu COI. Nazwy plemion zostaną wykorzystane w tytułach podrozdziałów w celu zwiększenia czytelności

Hapalopini

Na podstawie podziału Theraphosinae na plemiona, *Bonnetina* i blisko spokrewnione z nią rodzaje miałyby należeć do plemienia Hapalopini (nazwa pochodzi od rodzaju *Hapalopus*, który nie jest obecny w tej pracy). Część rodzajów hipotetycznie należących do Hapalopini i obecnych w tej pracy to: *Bonnetina*, *Schizopelma*, *Kochiana*, *Magnacarina*, *Cardiopelma*, *Davus*, *Cyriocosmus* i *Plesiopelma*. Każdy z wymienionych gatunków charakteryzuje się niewielkimi jak na ptasznikowate rozmiarami i posiada włoski parzące na odwłoku.

***Bonnetina*/*Schizopelma* (Hapalopini)**

Wszystkie poznane gatunki z rodzaju *Bonnetina* występują wyłącznie na terenie Meksyku. W celu bliższego zbadania relacji pomiędzy gatunkami należącymi do tego rodzaju, można przyrzeć się dokładniejszym lokalizacjom ich występowania.



Rycina 5. „Dystrybucja rodzaju *Bonnetina*. Konkretnie kształty odnoszą się do poszczególnych gatunków *Bonnetina*. Ciemnofioletowe trójkąty: *B. cyaneifemur*; czerwone kwadraty: *B. tanzeri*; ciemnoniebieskie kółka: *B. papalutlensis*; ciemnobrązowy piorun: *B. tenuiverpis*; różowe sześciangy: *B. aviae*; jasnoczerwone tarcze: *B. juxtantricola*; ciemnozielona elipsa: *B. alagoni*; biały krzyż: *B. malinalli*; ciemnopomarańczowy romb: *B. vittata*; jasnoniebieska dziewięcioramienna gwiazda: *B. minax*; jasnożółty półksiężyc: *B. julesvernei*; jasnofioletowa chmura: *B. hijmenseni*; jasnopomarańczowy trapez: *B. unam*; jasno zielony siedmnościan: *B. hobbit*; żółta pięcioramienna gwiazda: *B. megagyna*; jasnobrązowa kropka: *B. tindoo*; stalowo-niebieska koniczyna: *B. flammigera*; czarny prostokąt: *Davus* sp. Szare linie: granice stanów.” (Ortiz i Francke, 2017)

Wszystkie gatunki należące do *Bonnetina* osiągają niewielkie jak na ptaszniki rozmiary i posiadają włoski parzące na odwłoku.

Bliskie pokrewieństwo dwóch pierwszych gatunków widocznych na uzyskanych drzewach (Rycina 3 i Rycina 4): *B. unam* (pomarańczowy trapez na Rycinie 5) i *B. alagoni* (ciemnozielona elipsa na Rycinie 5) jest odzwierciedlane przez lokalizację występowania tych gatunków (występują one stosunkowo blisko siebie). Oba gatunki charakteryzują się bardzo zbliżonym wyglądem, w tym podobnym kształtem sternum i owłosieniem sternum (które u *B. alagoni* osiąga większe rozmiary). *B. alagoni* znajdowano na terenach otoczonych lasami dębowymi (osobników do badań szukano na otwartych terenach), natomiast *B. unam* występują w lasach dębowych. Są to dwa z trzech gatunków *Bonnetina* spp. występujących w bliskim otoczeniu lasów dębowych (trzecim jest *B. megagyna*).

B. megagyna (żółta gwiazda na Rycinie 5) i *B. aviae* (różowe sześciiany na Rycinie 5) również wykazują duże podobieństwo pod względem genu CO1, jednak nie wykazują tak dużego jak w przypadku poprzednich gatunków podobieństwa morfologicznego. Siedliska tych gatunków także się różnią. *B. aviae* morfologicznie najwięcej cech wspólnych wykazuje prawdopodobnie w stosunku do *B. unam*.

Pierwsze znaczące różnice między drzewami, to wykazane bliższe pokrewienie *B. tindoo* i *B. flammigera* względem *B. hobbit* na drzewie charsetowym. *B. tindoo* i *B. flammigera* mają ze sobą najbliższego wspólnego przodka który nie występuje na drzewie bez charsetów. Wsparcie tego węzła na drzewie charsetowym wynosi 59%, co oznacza, że na 100 drzew ten węzeł pojawiał się 59 razy. Nie jest to wartość wysoka, w związku z czym przynależność *B. flammigera* i *B. tindoo* do jednej grupy siostrzanej jest wątpliwe. Miejsca występowania tych gatunków są od siebie stosunkowo odległe. Nie opisano żadnej samicy gatunku *B. flammigera*, z tego względu znane są wyłącznie różnice morfologiczne między samcami tych gatunków, które nie wskazują na bliższe pokrewieństwo pomiędzy *B. Tindoo* i *B. flammigera*, w stosunku do wspomnianych wcześniej gatunków (*B. unam*, *B. megagyna*, *B. alagoni*, *B. aviae*, czy *B. hobbit*). Takiej relacji nie potwierdzają także publikacje dotyczące *Bonnetina spp.*

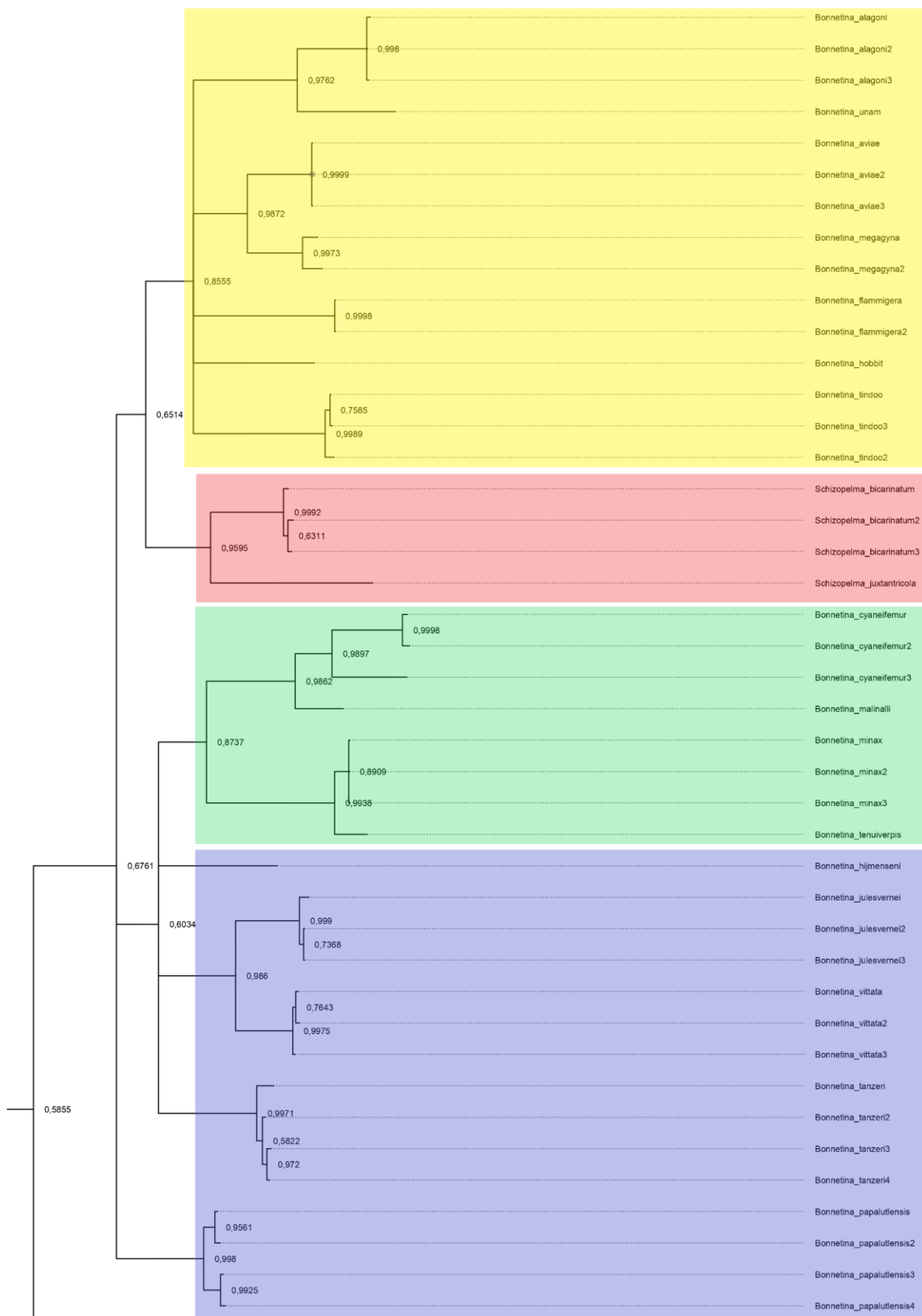
Oba drzewa wskazują na istnienie wspólnego przodka dla wszystkich wspomnianych wyżej gatunków. Badania, z których pochodzi rycina dotycząca dystrybucji *Bonnetina spp.* (Ortiz i Francke, 2017) również wskazują na występowanie wspólnego przodka dla tych gatunków.

Schizopelma to rodzaj ptasznikowatych blisko spokrewniony z *Bonnetina spp.* *S. juxtantricola*, wcześniej uznawana była za przedstawiciela *Bonnetina spp.*, jednak na podstawie publikacji autorstwa Ortiza i in., gatunek ten został przeniesiony do rodzaju *Schizopelma*. Drzewo filogenetyczne w powyższej publikacji wyraźnie oddziela rodzaj *Schizopelma* od *Bonnetina* (przy czym nadal widoczne jest ich bliskie pokrewieństwo), co różni je od drzew stworzonych na potrzeby tej pracy. Różnica ta ma miejsce prawdopodobnie ze względu na fakt, że w publikacji została wykorzystana większa liczba genów, oprócz COI były to między innymi: ITS1, EF1G, MID1IP1. U Theraphosidae gen COI uznaje się za szybko ewoluujący (Ortiz i in. 2018), co powoduje, że dobrze nadaje się on do młodych ewolucyjnie gałęzi, a znacznie gorzej do starszych, najgłębszych gałęzi drzewa. Zarówno drzewo stworzone przy użyciu jednego modelu, jak i drzewo stworzone przy użyciu różnych modeli, pokazują, że *S. juxtantricola* i *S. bicarinatum* należą do jednej grupy siostrzanej, do której nie należy żaden gatunek należący do

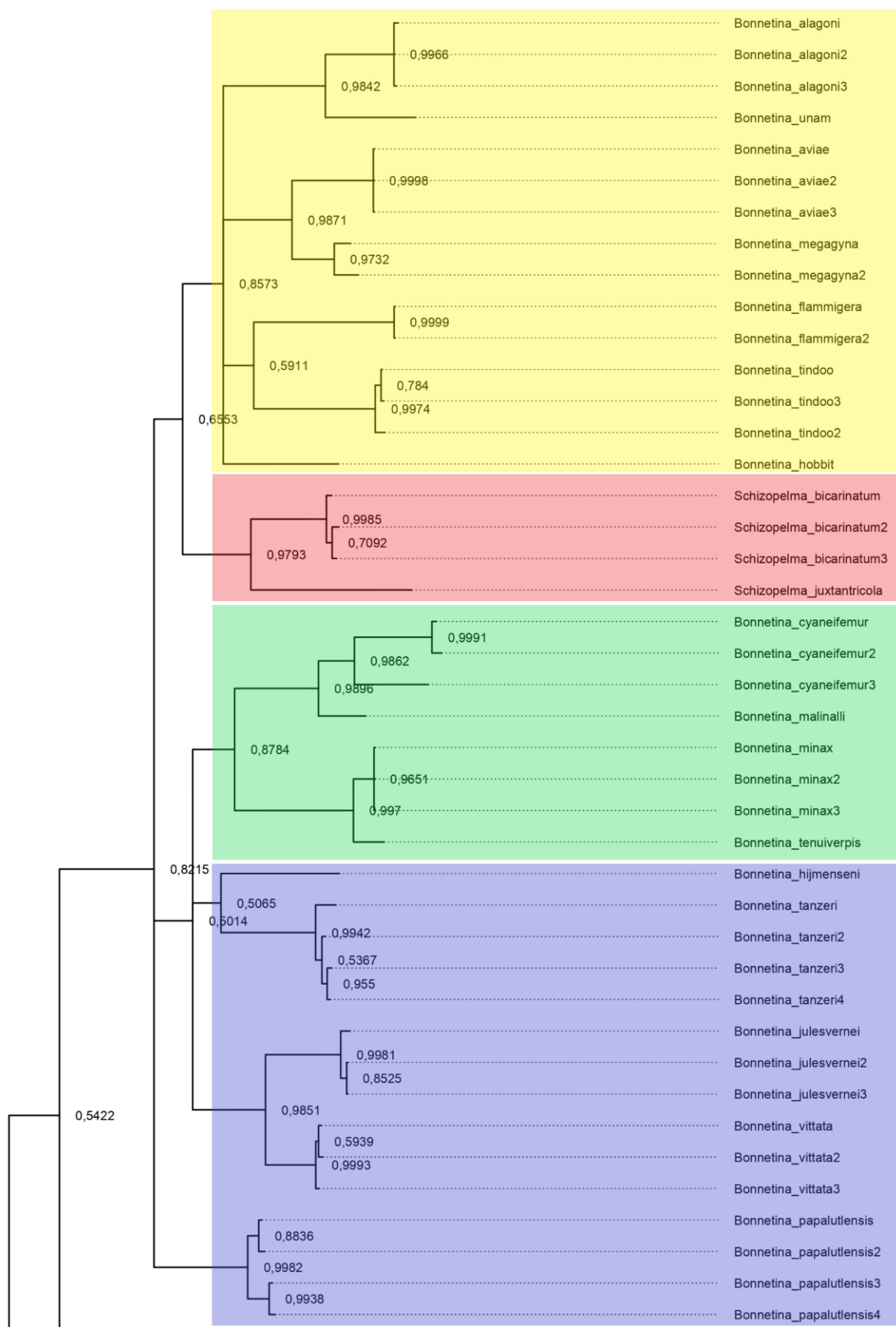
Bonnetina spp. (wsparcie dla tej grupy to prawie 98% na drzewie charsetowym i 96% na drzewie bez charsetów, są to wartości wysokie). Węzeł łączący rodzaj *Schizopelma* z *Bonnetina* ma wsparcie około 65% dla obu drzew, w porównaniu do wielu węzłów na obu drzewach, jest to wartość stosunkowo niska. Mimo użycia w analizie wyłącznie genu COI, hipotetyczna obecność gatunków należących do *Schizopelma* w rodzaju *Bonnetina*, budzi pewne wątpliwości, badania pokazują natomiast, że *S. juxantricola* i *S. bicarinatum* nie należą do rodzaju *Bonnetina*, a wyniki tej pracy nie powinny budzić wątpliwości co do usystematyzowania tych gatunków.

Uzyskane relacje w opracowanych drzewach wskazują na występowanie wspólnego przodka pomiędzy *B. malinalli* i *B. cyaneifemur*, a także *B. minax* i *B. tenuiverpis*. Wszystkie cztery gatunki są do siebie stosunkowo podobne morfologicznie w zestawieniu z innymi gatunkami (głównie w zakresie budowy narządów płciowych). Ich bliższe pokrewieństwo między sobą względem innych gatunków jest uzasadnione morfologicznie. Grupy siostrzane między tymi gatunkami: *B. malinalli* i *B. cyaneifemur*, oraz *B. minax* i *B. tenuiverpes* cechują się dużym wsparciem na obu drzewach. Taka relacja między tymi gatunkami została stwierdzona również w badaniach Ortiza i Francke z 2017 roku, a także w badaniach Ortiza i in. z 2018 roku.

Bonnetina hijmenseni (jasnofioletowa chmura na Rycinie 5) i *Bonnetina tanzeri* (czerwone kwadraty na Rycinie 5) tworzą grupę siostrzaną na drzewie charsetowym ze wsparciem około 50%, natomiast na drzewie bez charsetów nie powstała taka grupa. Gatunki te są podobne morfologicznie, nie jest to jednak podobieństwo, które wskazywałoby na bliższą relację między tymi gatunkami, niż ta, którą mają z *B. julesvernei* (jasnożółty półksiężyc na Rycinie 5), *B. vittata* (ciemnopomarańczowy rąb na Rycinie 5) i *B. papalutlensis* (ciemnoniebieskie kółka na Rycinie 5). Badania Ortiza i in. (2018) wskazują, że grupy siostrzane tworzą *B. hijmenseni*, *B. julesvernei* i *B. vittata*, a także *B. tanzeri* z *B. papalutlensis*. Takie pokrewieństwo gatunków miałyby dobre odzwierciedlenie w stanowiskach ich występowania. Wcześniejsze badania (Ortiz i Francke, 2017) wskazują na dwie inne grupy siostrzane: *B. vittata* i *B. julesvernei* oraz *B. hijmenseni* i *B. tanzeri*.



Rycina 6. Klady *Bonnetina*: *aviae* (żółty), *cyaneifemur* (zielony), *papalutlensis* (niebieski) oraz rodzaj *Schizopelma* (czerwony) dla drzewa bez charsetów



Rycina 7. Klady *Bonnetina*: *aviae* (żółty), *cyaneifemur* (zielony), *papalutlensis* (niebieski) oraz rodzaj *Schizopelma* (czerwony) dla drzewa z charsetami

Rodzaj *Bonnetina* zgodnie z obecną systematyką dzieli się na trzy kłady. Kład *cyaneifemur*, do którego należą: *B. cyaneifemur*, *B. malinalli*, *B. minax*, *B. tenuiverpis*. Kład ten jest dobrze wspierany zarówno w tej pracy (87-88%), podobnie jak w publikacjach Ortiza i Francke (2017) oraz Ortiza i in. (2018). Dwa pozostałe kłady to kład *papalutlensis* obejmujący gatunki *B. vittata*, *B. papalutlensis*, *B. hijmenseni*, *B. julesvernei*, *B. tanzeri*, oraz kład *aviae* dla gatunków *B. tindoo*, *B. aviae*, *B. hobbit*, *B. unam*, *B. alagoni*, *B. megagyna*, *B. flammigera*. W żadnym z drzew stworzonych w tej pracy nie powstał wyraźny kład *papalutlensis*, a kład *aviae* cechuje się 86% wsparciem i jest wyraźnie widoczny, wątpliwości budzą jednak relacje między gatunkami wewnątrz tego kładu. Podobna sytuacja dla obu tych kładów miała miejsce w badaniach Ortiza i Francke (2017). Dopiero w badaniach Ortiza i in. (2018) kłady te są dobrze widoczne na drzewie filogenetycznym. Wsparcie tych kładów i relacje między obecnymi w nich gatunkami, nie są tak mocne jak w przypadku kładu *cyaneifemur*. Pokrewieństwo pomiędzy *B. aviae*, *B. unam*, *B. tindoo* w kładzie *aviae*, oraz *B. vittata*, *B. hijmenseni* i *B. julesvernei* w kładzie *papalutlensis*, ulegało zmianom podczas różnych analiz. Wyniki dotyczące rodzaju *Bonnetina* w tej pracy nie są więc zaskakujące i są w znacznej mierze zbieżne z badaniami innych autorów (Ortiz i Francke, 2017, Ortiz i in., 2018). Należy jednak zaznaczyć, że stworzenie drzewa na podstawie większej liczby genów może być znacznie bardziej skuteczne i wiarygodne, niż wykorzystywanie samego genu COI. Sam gen oksydazy cytochromu C1 dobrze nadaje się do barcodingu DNA dla rodzaju *Bonnetina* (Ortiz i Francke, 2017).

Rodzaje blisko spokrewnione z *Bonnetina* (Hapalopini) i *Hemirrhagus eros*

Najbliżej spokrewnionym z *Bonnetina* i *Schizopelma* rodzajem powinien być *Davus* (Turner i in., 2017) lub *Magnacarina* (Ortiz i in., 2018), *Magnacarina* nie występuje jednak na drzewie filogenetycznym obecnym w pierwszej ze wspomnianych publikacji. Oba drzewa stworzone na potrzeby mojej pracy wskazują na bliskie pokrewieństwo *Kochiana brunnipes* i *Magnacarina primaverensis*, ze stosunkowo wysokim wsparciem. Gatunki te występują kolejno w Brazylii i Meksyku, znacząco różniąc się morfologicznie. *Kochiana* to rodzaj najslabiej spokrewniony z *Bonnetina* spp. wśród hipotetycznego plemienia Hapalopini, natomiast *Magnacarina* jest rodzajem najbliżej spokrewnionym z *Bonnetina*. Tak bliskie pokrewieństwo pomiędzy *Kochiana* a Hapalopini nie powinno mieć miejsca. (Ortiz i in. 2018). Umieszczenie tych gatunków w grupie siostrzanej może być spowodowane znacznym podobieństwem genu COI, przy jednocześnie dużych różnicach w budowie innych, analizowanych w powyższej publikacji genów. Różnice w rezultatach ponownie pokazują, że

wykorzystanie w analizie większej liczby genów może skutkować bardziej precyzyjnymi wynikami, a także, że w niektórych przypadkach systematyzowanie gatunków na podstawie cech morfologicznych, może mieć przewagę nad filogenetyką molekularną. Węzeł łączący rodzaje *Magnacarina* (i *Kochiana*) z *Bonnetina* obecny jest na obu drzewach (Rycina 3 i Rycina 4). Bliskie pokrewieństwo *Magnacarina* spp. z *Bonnetina* i *Schizopelma* jest uzasadnione morfologicznie. *Magnacarina*, podobnie jak *Schizopelma* i *Bonnetina* to rodzaje, których przedstawiciele występują w Meksyku i są podobne morfologicznie. Zarówno *Schizopelma* jak i *Bonnetina* są silnie spokrewnione z *Magnacarina* (Ortiz i in. 2018).

Cardiopelma to rodzaj monotypowy – oznacza to, że zawiera on wyłącznie jeden gatunek, którym jest *Cardiopelma mascatum*. Na obu drzewach powstała grupa siostrzana zawierająca *Cardiopelma mascatum* oraz *Davus fasciatus* (ex. *Cyclosternum fasciatum*), która jest dość dobrze wspierana (84-87%). Mimo że *C. mascatum*, podobnie jak *Magnacarina*, *Schizopelma* i *Bonnetina* występuje w Meksyku, najbliższej spokrewniona jest z rodzajem *Davus* spp. W tej analizie wykorzystane zostały sekwencje gatunku *Davus fasciatus*, występującego w Kostaryce. Taka relacja pomiędzy *Davus* a *Cardiopelma*, jak i ich bliższe pokrewieństwo z wcześniej omawianymi gatunkami, w porównaniu z gatunkami, które w tej analizie nie zostały jeszcze omówione, była stwierdzona również w publikacji Ortiza i in. z 2018 roku.

Cyriocosmus itayensis oraz *Cyriocosmus perezmilei* na obu drzewach nie uformowały grupy siostrzanej, mimo ich przynależności do jednego rodzaju, taka sytuacja nie miała miejsca w badaniach, w których wykorzystano najprawdopodobniej te same sekwencje obu gatunków (Ortiz i in. 2018). Na drzewie charsetowym występuje węzeł, który łączy *C. perezmilei* z wyżej omówionymi rodzajami, co nie powinno być zaskakujące, gdyż istnienie wspólnego przodka dla *Cyriocosmus* i tych rodzajów zostało potwierdzone, *C. perezmilei* i *C. itayensis* powinny jednak tworzyć grupę siostrzaną (Ortiz i in., 2018). Potwierdza to również dzielony przez nie tryb życia (oba gatunki uznaje się za podziemne). Klucz identyfikacyjny dla rodzaju *Cyriocosmus* wydaje się potwierdzać ich przynależność do jednego rodzaju (Kaderka, 2015), autor tego klucza także nie wspomina o różnicach, które miałyby wykluczać jeden z tych gatunków z rodzaju *Cyriocosmus*.

Ostatnim gatunkiem obecnym w analizie i należącym do hipotetycznego plemienia Haplopiini jest *Plesiopelma longisternale*. Rodzaj *Plesiopelma* w badaniach Turnera i in. (2017) na drzewie filogenetycznym stworzonym przy użyciu genów 16S rRna i ND1 wykazuje bliższe od rodzaju *Cyriocosmus* pokrewieństwo z *Bonnetina*, podobnie wyniki Ortiza i in. (2018), wskazują, że to rodzaj *Plesiopelma* jest bliżej spokrewniony z *Bonnetina*. Dodatkowo w wyżej

wspomnianych badaniach Ortiza i in. rodzaj *Plesioplema* tworzy grupę siostrzaną z rodzajem *Kochiana* (nieobecnym na drzewie stworzonym na potrzeby badań Turnera i in. z 2017 roku). 16S rRNA w przypadku wielu gatunków może zawierać NUMT (nuclear mitochondrial DNA) (Ortiz i in. 2018). Obecność NUMTów może prowadzić do błędów we wnioskowaniu filogenetycznym (Song i in. 2008, Nacer i Amaral, 2017), dlatego też, drzewo obecne w publikacji Turnera i in. (2017) może być mniej wiarygodne, niż to w publikacji Ortiza i in. (2018), jednak z powodu braku innych badań oraz sprzecznych wyników (dotyczących relacji *Plesiopelma* i *Cyriocosmus* z wcześniej omówionymi gatunkami) dwóch wspomnianych publikacji, trudno jest dojść do jednoznacznych wniosków dotyczących usystematyzowania tych gatunków.

Brak węzła wskazującego na bliższe, w porównaniu do nieomówionych gatunków, pokrewieństwo pomiędzy *Plesiopelma* a wcześniej omawianymi gatunkami, prawdopodobnie wynika z użycia w tej pracy wyłącznie genu COI, który gorzej sprawdza się przy analizie głębokich gałęzi drzew filogenetycznych (Ortiz i in. 2018).

Hemirrhagus jest rodzajem należącym do Theraphosinae. Rodzaj ten mocno wyróżnia się ze względu na swoją morfologię, m.in. jako jedyny posiada włoski parzące typu VI. Włoski te są mocno zredukowane, u niektórych gatunków *Hemirrhagus* prawdopodobnie nie występują wcale. Ta cecha jest wyjątkowa w Theraphosinae, których cechą charakterystyczną jest występowanie włosków parzących. Ze względu na wyjątkowe cechy morfologiczne, rodzaj nie został umiejscowiony w żadnym hipotetycznym plemieniu dzielącym Theraphosinae (Turner i in., 2017), jest to więc rodzaj wyjątkowo problematyczny w systematyce ptasznikowatych. *Hemirrhagus spp.* występują wyłącznie w Meksyku i wykazują wyjątkowo słabe pokrewieństwo z innymi gatunkami ptasznikowatych występującymi w tym rejonie (słabsze niż wszystkie gatunki należące do podrodziny Theraphosinae, dla których takie pokrewieństwo było badane) (Ortiz i in. 2018). *H. eros* w drzewie bez charsetów tworzy grupę siostrzaną z *Poecilotheria regalis* z niskim wsparciem(51%). Ze względu na niskie wsparcie, przynależność *Poecilotheria spp.* do podrodziny Poecilotheriinae, nadrzewny tryb życia *Poecilotheria regalis*, jak i bardzo odległe regiony występowania (*P. regalis* występuje w Indiach), niezblizną morfologię, a także różnice w potencjale jadu obu gatunków, nie ma podstaw, by uznać taką relację za prawdopodobną. Relacja ta mogła wystąpić nie tylko ze względu na użycie w analizie wyłącznie sekwencji genu COI, ale także ze względu na fakt, że brak jest w niej innych gatunków Theraphosidae pochodzących z tzw. Starego Świata (poza *I. valentinus*), które mogłyby wykazywać bliższe pokrewieństwo, a *Hemirrhagus* to prawdopodobnie najmniej

wpasowujący się w Theraphosinae rodzaj należący do tej podrodziny (jednocześnie jest to rodzaj, który wśród wszystkich uznawanych podrodzin Theraphosidae, najlepiej pasuje do Theraphosinae).

Grammostolini

Hipotetyczne plemię Grammostolini (nazwa pochodzi od rodzaju *Grammostola*) miałyby zawierać następujące rodzaje spośród obecnych w tej analizie: *Grammostola*, *Homoeoma*.

W analizie występują dwa gatunki z rodzaju *Grammostola*: *G. rosea* oraz *G. pulchripes*. Pierwszy z nich występuje w Argentynie i Chile, drugi w Argentynie i Paragwaju. *G. rosea* występuje w różnych formach barwnych (prawdopodobnie zależnych od lokalizacji). Karapaks tego gatunku ma zwykle różowy kolor, a odnóży i odwłok koloru brązowy. Formy barwne różnią się przede wszystkim kolorem włosków, które mogą być szare, czerwone lub pomarańczowe. Dorosłe osobniki *G. rosea* i *G. pulchripes* można bardzo łatwo odróżnić. Karapaks i pierwszy segment każdego z odnóży kroczyń *G. pulchripes* mają ciemnobrązowy/czarny kolor, pozostałe segmenty odnóży są jaśniejsze. Za pierwszym segmentem odnóży kroczyń widoczne są charakterystyczne złote zdobienia, którym ten pająk zawdzięcza swoją polską nazwę: „Ptasznik złotokolanowy”. Oba gatunki wyczesują włoski parzące z odwłoka i prowadzą naziemny tryb życia. Na obu drzewach tworzą grupę siostrzaną z wysokim wsparciem.

Homoeoma uruguayense na żadnym z drzew nie wykazuje relacji, które potwierdzałyby jego przynależność do Grammostolini, jednak wsparcie węzła mogącego łączyć ją z następnym plemieniem (Theraphosini) jest niskie, w związku z tym nie można wykluczyć bliższego spokrewnienia *H. uruguayense* z rodzajem *Grammostola*, które zostało stwierdzone w publikacji Turnera i in. (2017). Różnice prawdopodobnie wynikają z wykorzystania innych genów.

Theraphosini

Hipotetyczne plemię Theraphosini zawiera następujące rodzaje obecne w tej analizie: *Brachypelma*, *Aphonopelma*, *Tliltocatl*(ex. *Brachypelma*), *Lasiadora*, *Nhandu*, *Phormictopus*, *Eupalaestrus*, *Acanthoscurria*.

***Aphonopelma*, *Brachypelma* (Theraphosini)**

Aphonopelma to rodzaj charakteryzujący się dużym zróżnicowaniem w rozmiarach osiąganych przez jego przedstawicieli. *A. paloma* (rozstaw odnóży do 5cm) jest najmniejszym

znanym przedstawicielem ptasznikowatych, obecne w analizie *A. mojave* i *A. joshua* również osiągają niewielkie rozmiary, podczas gdy samice *A. hentzi* osiągają zazwyczaj 12-13cm długości ciała (Setton i in., 2019).

Na obu drzewach *A. mojave* i *A. joshua* tworzą grupę siostrzaną, która nie zawiera *A. mojave* i *A. hentzi*. Kolejną grupę siostrzaną tworzą *A. mojave*, *A. paloma* i *A. joshua*, do której nie należy *A. hentzi*. Wyniki te nie są zaskakujące. Stanowiska występowania *A. mojave*, *A. paloma* i *A. joshua* leżą stosunkowo blisko siebie, największy dystans wśród *Aphonopelma* uwzględnionych w tej pracy dzieli *A. hentzi* od pozostałych gatunków. *A. hentzi* jest także gatunkiem znacznie większym. Podobne wyniki zauważyć można w analizie skupiającej się na rodzaju *Aphonopelma* (Hamilton i in., 2011). Wysokie wsparcie węzła łączącego *A. hentzi* z pozostałymi gatunkami, również potwierdza jego stosunkowo dalekie pokrewieństwo z innymi gatunkami *Aphonopelma* brany pod uwagę.

Wystąpienie *Brachypelma emilia* w drzewach jako grupy siostrzanej z *A. joshua* (drzewo charsetowe), lub jako gatunku połączonego tym samym węzłem, który wiąże *A. joshua* z innymi *Aphonopelma* jest w pewnym stopniu zaskakujące, istnieje jednak duże prawdopodobieństwo, że wśród Theraphosinae to właśnie rodzaj *Brachypelma* jest najbliższym spokrewnionym z *Aphonopelma* (Turner i in., 2017). Także cechy morfologiczne i występowanie obu gatunków wskazują, że w tej analizie to właśnie gatunek *A. hentzi* powinien być najbliższym spokrewnionym z przedstawicielami rodzaju *Brachypelma*, nie powinny jednak tworzyć grupy siostrzanej (ta występuje tylko na jednym z drzew z niskim wsparciem), ani łączyć się z małymi gatunkami *Aphonopelma* równoległe z *A. hentzi*. Gen COI mógł zatem zmieniać się stosunkowo powoli od momentu rozdzielenia się *Aphonopelma* i *Brachypelma*, stąd różnice w budowie tego genu są stosunkowo niewielkie, niestety, nie udało się znaleźć publikacji, która opierałaby analizę filogenetyczną o gen COI i pozwoliłaby zweryfikować tę hipotezę.

Część gatunków, które należały do rodzaju *Brachypelma* zostały przeniesione do rodzaju *Tliltocatl* (Mendoza i Francke, 2019). W analizie występują *T. albopilosus* i *T. vagans*, wcześniej należące do rodzaju *Brachypelma*. Publikacja Turnera i in. z 2017 roku nie uwzględnia tego podziału, dlatego trudno jest na jej podstawie stwierdzić, który z tych rodzajów jest bliżej spokrewniony z *Aphonopelma*. W publikacji, na podstawie której dokonano przeniesienia części gatunków z *Brachypelma* do nowoutworzonego rodzaju *Tliltocatl*, pojawia się jeden przedstawiciel *Aphonopelma* – *A. seemani*, który został usunięty z prezentowanej analizy w efekcie znacznie krótszego przyrównania. Niektóre sekwencje genu COI użyte w tej publikacji były krótkie, np. *Xenesthis immanis* – 269 par zasad, zatem przyrównanie musiało

być znacznie krótsze niż w tej pracy. Publikacja była ukierunkowana na rodzaj *Brachypelma* i outgroupę stanowił przedstawiciel Theraphosidae należący do podrodziny Psalmopoeinae, dobrze nadający się do ukorzenienia rodziny podrodziny Theraphosinae (Mendoza i Francke, 2019). Moja analiza ze względu na wystąpienie w niej przedstawicieli wielu podrodzin Theraphosidae nie mogła zostać ukorzeniona na podstawie jednej z nich. Być może to właśnie ze względu na te różnice, w pracy dzielącej *Brachypelma* spp. na dwa odrębne kłady, nieobecny w mojej analizie gatunek *Aphonopelma seemani* wykazał bliższe pokrewieństwo z rodzajem *Tliltocatl* niż z rodzajem *Brachypelma*.

Powód pojawienia się wyżej wymienionych różnic w wynikach analiz może być jednak inny. Istnieje uzasadniona możliwość, że rodzaj *Aphonopelma* nie jest monofiletyczny (Hamilton i in., 2016). *A. seemani* wykazuje morfologiczne podobieństwa do innych przedstawicieli *Aphonopelma* z Ameryki Środkowej, których nie ma w mojej analizie. Potencjalna rewizja *Aphonopelma* spp. nie została jednak ukończona ze względu na problemy ze skompletowaniem sekwencji (Hamilton i in., 2016). Istnieje możliwość, że *Aphonopelma seemani* w przyszłości będzie należeć do odrębnego kładu, w którym znajdą się gatunki *Aphonopelma* z Ameryki Środkowej (taki kład mógłby być blisko spokrewniony z *Tliltocatl* spp.). *Aphonopelma* uwzględnione w tej analizie mogłyby natomiast należeć do innego kładu, który wykazywałby bliższe pokrewieństwo z przedstawicielami rodzaju *Brachypelma*. W tej hipotetycznej sytuacji, uzasadnione jest zarówno bliskie pokrewieństwo występujących w analizie *Aphonopelma* z *Brachypelma* spp., jak i bliskie pokrewieństwo *A. seemani* oraz *Tliltocatl* spp., które zostało stwierdzone w badaniach Mendoza i Francke z 2019 roku. Takie hipotetyczne relacje dobrze odzwierciedlałyby w lokalizacji, w których występują powyższe gatunki. Hipotezę tą wspiera także publikacja Turnera i in., z 2017 roku, w której na drzewie filogenetycznym rodzaj *Aphonopelma* podzielił się na cztery kłady, a rodzaj *Brachypelma* na dwa kłady (pokrywające się z późniejszym podziałem tego rodzaju). Część gatunków *Aphonopelma* była blisko spokrewniona z *Brachypelma* o kolorowych nogach, a część z *Brachypelma* o kolorowym odwłoku. W aktualnej systematyce ten drugi kład stanowi już odrębny rodzaj *Tliltocatl*, co może potwierdzać powyższą hipotezę. Trzeci kład *Aphonopelma* jest niewielki i blisko spokrewniony z nieobecnym w tej analizie rodzajem *Stichoplastoris* (Turner i in., 2017). Czwarty, najmniejszy kład wykazuje bliskie pokrewieństwo z rodzajem *Acanthoscurria*. Bliskie spokrewnienie samego gatunku *B. emilia* z przedstawicielem *Aphonopelma* (*A. johnnycashi*) pojawiły się także w innej analizie filogenetycznej (Ortiz i in., 2018)

***Lasiadora*, *Nhandu*, *Phormictopus* (Theraphosini)**

Obecne w analizie gatunki *Lasiadora* (*L. klugi*, *L. parahybana*, *L. difficilis*) występują w Brazylii, *Nhandu tripepii* oraz *Nhandu chromatus* także występują na terenie tego kraju (*N. chromatus* występuje także w Paragwaju). *Phormictopus cautus* to gatunek występujący na Kubie, co powoduje, że jest oddzielony od wcześniej wymienionych gatunków i dzieli go od nich stosunkowo duży dystans.

Wszystkie obecne w tej analizie gatunki *Lasiadora* wykazują duże podobieństwa morfologiczne, odróżnienie tych gatunków na podstawie cech morfologicznych bez uwzględnienia budowy narządów płciowych jest najprawdopodobniej niemożliwe.

N. tripepii i *N. chromatus* występują na stanowiskach bardziej odległych niż ma to miejsce w przypadku występujących w Analizie przedstawicieli *Lasiadora*. Wymienione gatunki z rodzaju *Nhandu* są łatwe do odróżnienia. *N. chromatus* charakteryzuje się ciemnymi odnóżami, które na stawach łączących ich dalsze segmenty są białe (odnóża pająka są paskowane), jasnym karapaksem i ciemnym, pokrytym rudymi włoskami odwłokiem. Natomiast *N. tripepii* to gatunek ubarwiony jednolicie, na całym ciele dominuje kolor jasnobrązowy/rudawy. Włoski *N. tripepii* są dłuższe niż u *N. chromatus*, a różnica ta jest szczególnie widoczna na odnóżach.

Phormictopus cautus na tle wymienionych *Nhandu* i *Lasiadora* wyróżnia się przede wszystkim lokalizacją. Morfologicznie bardziej przypomina *Lasiadora* niż *Nhandu* i był kiedyś uważany za przedstawiciela pierwszego z tych rodzajów. Nie jest trudny do odróżnienia od obecnych w tej analizie gatunków *Lasiadora*. Charakteryzuje się ciemnobrązowym/czarnym ubarwieniem. Femur u tego gatunku jest ciemniejszy od pozostałych segmentów odnóży i podobnie jak karapak, może opalizować na fioletowo, co jest szczególnie widoczne przy odpowiednim świetle.

Bliskie spokrewnienie *L. klugi* i *L. parahybana* z bardzo wysokim wsparciem na obu drzewach jest w pełni uzasadnione. Oba gatunki osiągają duże rozmiary są większe niż przedstawiciele *Nhandu* i *Phormictopus*. Gatunki te występują blisko siebie, są bardzo podobne morfologicznie i nie ma wątpliwości co do ich prawidłowego sklasyfikowania. *N. tripepii* i *N. chromatus*, podobnie jak *L. klugi* i *L. parahybana*, tworzą między sobą grupy siostrzane. Zarówno wystąpienie tych grup siostrzanych oraz bliskie spokrewnienie *Nhandu* i *Lasiadora* są w pełni uzasadnione występowaniem i morfologią tych gatunków. Taka relacja *Nhandu* i *Lasiadora* jest również wspierana przez publikację Turnera i in. z 2017 roku, wielokrotnie już

przytaczaną w tej pracy. Węzeł łączący *Phormictopus* z grupą siostrzaną, do której należą *Nhandu* i *Lasiadora* na drzewie charsetowym ma wsparcie 89%, natomiast na drzewie bez charsetów, wsparcie jest już znacznie niższe (59%), co budzi pewne wątpliwości odnośnie spokrewnienia tych rodzajów. *Phormictopus spp.* to rodzaj, który wykazuje wspólne cechy morfologiczne z *Nhandu* i *Lasiadora*. Bliskie spokrewnienie pomiędzy tymi rodzajami zostało już stwierdzone w co najmniej jednej publikacji (Foley i in., 2018), w której *Phormictopus spp.* są jednocześnie jeszcze bliżej spokrewnione z *Acanthoscurria spp.* Mimo że rodzaj *Acanthoscurria* występuje w mojej analizie, drzewa wskazują na bliższą relację *Phormictopus cautus* z *Nhandu spp.* i *Lasiadora spp.*, co wzbudza dodatkowe wątpliwości odnośnie prawdziwości tej relacji. W tej publikacji nie pojawił się rodzaj *Brachypelma*, do którego należeli wtedy wszyscy przedstawiciele *Tliltocatl spp.* i który może być bliżej od *Phormictopus* spokrewniony z *Acanthoscurria* (co wynika z tej analizy). Inna publikacja (Turner i in., 2017) także wyklucza możliwość bliższego spokrewnienia *Phormictopus* z *Lasiadora* i *Nhandu*, niż *Phormictopus* z *Acanthoscurria*. Ze względu na powyższe nie powinno się na podstawie uzyskanych w pracy wyników rozważać bliższego spokrewnienia *Phormictopus cautus* z rodzajami *Lasiadora* i *Nhandu* niż z *Acanthoscurria spp.*

***T. albopilosus* i *L. difficilis* (Theraphosini)**

Najbardziej zadziwiającym dla poprzednio omawianej części drzewa jest pojawienie się jednej sekwencji *Tliltocatl albopilosus* wśród sekwencji *L. parahybana*, co celowo zostało pominięte w poprzednim podrozdziale, bowiem podobna sytuacja ma miejsce także w przypadku pojawienia się sekwencji *L. difficilis* w grupie siostrzanej z pozostałymi sekwencjami *T. albopilosus*.

Tak zaskakujące umiejscowienie tych sekwencji jest spowodowane złą identyfikacją gatunków. *T. albopilosus*, *L. difficilis* oraz *L. parahybana* to gatunki trudne do odróżnienia na podstawie cech zewnętrznych na wcześniejszych etapach życia, a dla osoby mało obeznanej z tematem, dorosłe osobniki również mogą być bardzo trudne do identyfikacji. Sekwencje tych gatunków były dostępne w bazie NCBI. Pochodzą one z publikacji Shivambu i in. (2020). Na potrzeby tego artykułu sekwencjonowano gatunki Theraphosidae dostępne w afrykańskich sklepach zoologicznych, lub pochodzące bezpośrednio od hodowców ptaszników. Sekwencje oznaczone zostały nazwą, którą pająki były opisane w sklepach zoologicznych. W samym artykule znajduje się wzmianka o tym, że część gatunków prawdopodobnie została źle opisana (co widać także na zamieszczonym w tej pracy kladogramie). We wstępie publikacji można przeczytać, że badania mają na celu sprawdzenie między innymi tego, z jaką trafnością

sprzedawcy identyfikują sprzedawane pająki. W publikacji sprawdzano poprawność identyfikacji za pomocą BLAST (wykorzystywano dostępne w bazie GenBank sekwencje referencyjne, a jeśli te nie były dostępne, sekwencjonowano większą liczbę osobników danego gatunku w celu stworzenia możliwości do znalezienia źle zidentyfikowanych gatunków, gdyby takie się pojawiły) a także za pomocą kladogramu. Wyniki BLAST pokazały, że część gatunków była zidentyfikowana nieprawidłowo. Z trzech gatunków *Avicularia avicularia*, jeden okazał się być *L. parahybana*, drugi *B. albopilosum*, a trzeci *A. avicularia*. *A. avicularia* wykazuje wyjątkowo duże różnice w porównaniu do dwóch pozostałych gatunków. Źle zidentyfikowanych (nieświadomie lub celowo dla osiągnięcia większych korzyści majątkowych) sprzedawanych pod inną nazwą ptaszników było więcej. Wszystkie sekwencje zostały po opublikowaniu artykułu zamieszczone w bazie NCBI i choć w większości przypadków po zidentyfikowaniu ich za pomocą BLAST (bez uwzględnienia cech morfologicznych) nazwy zostały poprawione, to w niektórych przypadkach autorzy publikacji z nieznanych przyczyn nie poprawili nazw sekwencji i w takim stanie umieścili je w bazie NCBI. Przykładem są dwie wspomniane wcześniej sekwencje, które tak naprawdę należą kolejno do *L. parahybana*, zamiast do *T. albopilosum* i do *T. albopilosum* zamiast do *L. difficilis*. W celu upewnienia się, sekwencje zostały dodatkowo sprawdzone przeze mnie za pomocą BLAST. W mojej analizie znajduje się więcej sekwencji pochodzących z tej publikacji, więc w celu upewnienia się co do ich poprawnej identyfikacji (a tym samym autentyczności całej przeprowadzonej analizy), wszystkie zostały sprawdzone za pomocą BLAST. W publikacji znalazły się trzy sekwencje *P. regalis*, z których dwie okazały się należeć do tego gatunku. Jedna wg. omawianego artykułu należała do *A. hentzi* (85% identyczności) jednak w rzeczywistości jest to sekwencja *Grammostola pulchripes*, czego autorzy nie mogli wiedzieć, bo tej sekwencji nie porównywali z innymi pozyskanymi przez nich sekwencjami, a żadna sekwencja *Grammostola pulchripes* nie znajdowała się wcześniej w GeneBanku. Omawiana sekwencja *P. regalis* została wykluczona z mojej analizy na samym początku ze względu na zauważone znaczne różnice między nią a pozostałymi sekwencjami *P. regalis*. Wśród obecnych w tej analizie sekwencji to właśnie te trzy: *P. regalis*, *T. albopilosum* i *L. difficilis* zostały dodane do NCBI z niepoprawną nazwą. Błędy te zostały zgłoszone do administratorów GeneBank.

Dodatkowo, autorzy dopuścili się kolejnego niedopatrzenia tworząc rycinę do publikacji (Shivambu i in., 2020, figure 6), w której opisie znajduje się informacja o tym, że na rycinie widać pobrane (kupione w sklepach lub od sprzedawców internetowych) gatunki ze

zdjęciami i podpisami, jakimi opisali je sprzedawcy. Zdjęcia oznaczone jako d i j są w rzeczywistości dokładnie tym samym zdjęciem, które w niewielkim stopniu różni się nasyceniem. Zdjęcie d) oznaczono jest jako *B. albopilosus* (aktualna nazwa to *Tliltocatl albopilosus*), a zdjęcie j) jako *L. parahybana*. Na tym zduplikowanym zdjęciu w rzeczywistości widoczny jest *T. albopilosus*.

Ze względu na powyższe, nie istnieje możliwość odwoływania się w tej pracy do wyżej wspomnianej publikacji, która ze względu na znalezione nieścisłości może być mniej wiarygodna.

Tliltocatl, Acanthoscurria, Eupalaestrus (Theraphosini).

Ptasznik kędzierzawy (*T. albopilosus*) charakteryzuje się długimi włoskami występującymi na całym ciele, których jasny kolor kontrastuje z ciemnym ubarwieniem tego gatunku. Włoski te często sprawiają wrażenie pofalowanych, do czego nawiązuje polska nazwa gatunkowa *T. albopilosus*. Jest to gatunek średniej wielkości i jak zdecydowana większość Theraphosinae wyczesuje włoski parzące z odwłoka. *T. vagans* jest gatunkiem podobnym morfologicznie, nie jest jednak trudny do odróżnienia od *T. albopilosus* (poza wczesnymi etapami życia) ze względu na krótsze włoski, które nie wyróżniają się kolorem (poza włoskami na odwłoku), przez co ten gatunek sprawia wrażenie ciemniej ubarwionego. Włoski na odwłoku *T. vagans* wyróżniają się od włosków na reszcie ciała swoim rudym kolorem. Bliskie spokrewnienie *T. albopilosus* i *T. vagans* (na obu drzewach, z dużym wsparciem) jest w pełni uzasadnione morfologicznie i zgodne z aktualną systematyką, a także wsparte badaniami na podstawie których utworzono rodzaj *Tliltocatl* i przeniesiono do niego część gatunków z rodzaju *Brachypelma* (Mendoza i Francke, 2019). Należy zaznaczyć, że widoczna na drzewie *L. difficilis*, to w rzeczywistości również *T. albopilosus*.

Eupalaestrus campestratus jest to gatunek stosunkowo słabo przebadany filogenetycznie. Na obu drzewach tworzy grupę siostrzaną z przedstawicielami *Tliltocatl*, z wysokim wsparciem. Istnieją badania wskazujące na to, że najbliższe pokrewieństwo wykazuje on z rodzajami *Nhandu* i *Lasiodora* (Turner i in., 2017), jednak jak wcześniej zostało wspomniane, badania te wykorzystują w analizie inne geny, niż zostały wykorzystane w mojej pracy. Nie analizowano w nich także morfologii tego gatunku. Brakuje nowych publikacji, które sprawdzałyby relacje *Eupalaestrus spp.* z innymi przedstawicielami Theraphosinae na podstawie cech morfologicznych lub użytego w niniejszej pracy genu COI. Gatunek ten wydaje się być podobny morfologicznie do innych przedstawicieli hipotetycznego plemienia

Theraphosini, jednak brak jest publikacji porównujących go z *Lasiadora*, *Nhandu*, *Acanthoscurria* i *Tliltocatl*. Ze względu na brak takich porównań, jak i brak konsensusu pomiędzy drzewami z tej analizy i drzewami z analizy Turnera i in. z 2017 roku, trudno jest określić z którymi gatunkami najbliżiej spokrewniony jest *Eupalaestrus campestratus*, jednak zarówno morfologicznie, jak i molekularnie pasuje on do hipotetycznego plemienia Theraphosini.

Acanthoscurria geniculata to duży gatunek ptasznika charakteryzujący się podobnymi jak w przypadku *Nhandu chromatus* „białymi kolanami”. Osiąga jednak znacznie większe rozmiary i jest znacznie ciemniej ubarwiony. Stosunkowo bliskie relacje z *Tliltocatl* spp. na uzyskanym drzewie są potwierdzeniem innych analiz, w których rodzaj ten wykazuje bliższe pokrewieństwo z *Brachypelma* z kolorowym odwłokiem (aktualnie *Tliltocatl*), niż z *Brachypelma* z kolorowymi odnóżami (aktualnie *Brachypelma*) (Turner i in., 2017). Wsparcie dla węzła łączącego *Tliltocatl*, *Eupalaestrus* i *Acanthoscurria* w jeden kład wynosi 89% na drzewie charsetowym i 79% na drzewie bez charsetów. Istnienie takiego kładu w rzeczywistości nie może być uznane za pewnik, ale jest ono wysoce prawdopodobne.

Gatunki nienależące do rodziny Theraphosinae.

Ze względu na to, że Theraphosinae jest najbardziej liczną i prawdopodobnie również najbardziej niepewną filogenetycznie podrodziną ptasznikowatych, liczba sekwencji dostępnych dla tej podrodziny jest znacznie większa, niż dla pozostałych podrodzin Theraphosidae. Próby odpowiedniego usystematyzowania tej podrodziny powodują, że pojawia się także duża liczba sekwencji dla jej przedstawicieli, jednak nie wszystkie gatunki obecne w tej analizie należą do Theraphosinae.

Poecilothera regalis jest to gatunek ptasznika należący do monotypowej podrodziny Poecilotheriinae, która zawiera wyłącznie rodzaj *Poecilotheria* (do którego aktualnie należy 15 gatunków). Ptaszniki z rodzaju *Poecilotheria* występują na terenie Sri Lanki oraz Indii i wszystkie prowadzą nadrzewny tryb życia. Samice posiadają wyraźne charakterystyczne ornamenty na karapaksie i odwłoku. *Poecilotheria* spp. posiadają jad o stosunkowo wysokim potencjale, a konsekwencje ukąszenia są dla człowieka znacznie poważniejsze, niż w przypadku jakiegokolwiek innego gatunku obecnego w tej analizie przedstawiciela Theraphosidae (Arredondo i in., 2015). Nie stanowią jednak zagrożenia dla zdrowia i życia zdrowych osób dorosłych. Najczęstszymi objawami ukąszenia jest palący ból i silne zaczerwienienie w okolicach miejsca aplikacji jadu. Może wystąpić również nadmierna

potliwość. Objawy te ustępują stosunkowo szybko. Kolejnym i najbardziej dotkliwym objawem są bolesne skurcze mięśni mogące występować w całym ciele. Skurcze mogą utrzymywać się przez długi czas (nawet kilka tygodni do ich zupełnego zniknięcia, najbardziej dotkliwe utrzymują się jednak znacznie krócej) (Fuchs i in., 2014).

Poecilotheria regalis morfologicznie bardzo znacząco różni się od jakiegokolwiek innego gatunku występującego w tej analizie. Należą do ptaszników tzw. „Starego Świata”. W tej analizie oprócz *P. regalis*, za taki gatunek uznaje się również *Ischnocolus valentinus*. Gatunki te nie są do siebie podobne morfologicznie. *P. regalis* w tej analizie nie wykazuje wyróżniającego się pokrewieństwa z żadnym innym gatunkiem w przypadku drzewa dla różnych modeli substytucji w zależności od litery kodonu. Tworzy grupę siostrzaną z *Hemirrhagus eros* na drzewie bez charsetów, relacja ta jednak ze względu na bardzo niskie wsparcie i różnice morfologiczne między tymi gatunkami, nie jest warta rozpatrywania. Brak bliższego pokrewieństwa *P. regalis* z innymi gatunkami w analizie jest w pełni uzasadniony, ponieważ prawdopodobnie żaden z tych gatunków nie wyróżnia się szczególnym pokrewieństwem z Poecilotheriinae, a równocześnie gen COI nie sprawdza się najlepiej w analizie najgłębszych gałęzi drzew filogenetycznych (Ortiz i in., 2018).

Avicularia avicularia jest to gatunek należący do podrodziny Avicularinae. Są to pająki o nadrzewnym trybie życia. Wiele gatunków należących do Avicularinae są to pająki o wyjątkowych kolorach, prawdopodobnie najbardziej rozpoznawalnym gatunkiem w tej podrodzynie jest *Caribena versicolor* (ex. *Avicularia versicolor*). *Avicularia avicularia* to gatunek, w którego ubarwieniu dominuje kolor szary/czarny. Charakterystyczne dla tego gatunku są różowe końcówki ostatnich segmentów każdego z odnóży kroczych, oraz obecność włosków o tym samym kolorze na bokach odwłoku. *Ischnocolus valentinus*, który na obu drzewach tworzy grupę siostrzaną z *A. avicularia*, jest gatunkiem od niego mniejszym i należy do podrodziny Ischnocolinae. *I. valentinus* to gatunek wyjątkowo szeroko rozpowszechniony (występuje w Tunezji, Włoszech, Hiszpanii, Algierii, Libii, Maroko). Prowadzi naziemny tryb życia. Włoski na ciele tego gatunku są krótkie, dominuje kolor brązowy, karapaks może się lekko mienić, przez co wydaje się on być złotawy. *I. valentinus* został dawniej sklasyfikowany jako *Avicularia andalusiaca*, prawdopodobnie ma więc cechy morfologiczne przypominające Avicularinae, które jednak są trudne do dostrzeżenia bez znajomości wyglądu narządów płciowych *I. valentinus*, i przedstawicieli Avicularinae, dlatego morfologiczne podobieństwa są w tym przypadku wyłącznie hipotezą. Bliskie pokrewieństwo między Avicularinae a Ischnocolinae zostało już wcześniej stwierdzone na podstawie metod filogenetyki

molekularnej, do której wykorzystano sześć genów: COI, 12S, 16S, 18S, 28S, H3 (Korba i in., 2022). Bliskie pokrewieństwo Avicularinae i Ischnocolinae na tle innych podrodzin Theraphosidae, można więc uznać za wysoce prawdopodobne.

Różnice pomiędzy drzewami

Na potrzeby tej analizy zostały stworzone dwa drzewa, które w większości przypadków były zbieżne. Drzewo bez podziału na charsety zawiera jedną grupę siostrzaną, która wydaje się zupełnie pozbawiona podstaw (*P. regalis* i *H. eros*). Drzewo z podziałem na charsety zawiera grupę siostrzaną *A. hentzi* i *B. emilia*, taka relacja może być jednak w pewnym stopniu prawdopodobna, ale wsparcie dla łączącego te gatunki węzła jest niskie. Drzewo charsetowe charakteryzuje się także większymi prawdopodobieństwami dla relacji morfologicznie oczywistych np. pomiędzy *T. albopilosum* a *T. vagans* (choć nie jest tak w każdym przypadku). Trudno jest na podstawie tej analizy jednoznacznie stwierdzić, które drzewo dało lepsze wyniki, gdyż te są w znacznej większości podobne, brak wyraźnych różnic wynika najprawdopodobniej z tego, że wybór modeli jest generalnie podobny w obu przypadkach. Drzewo z charsetami jest z definicji dokładniejsze od drzewa z jednym modelem dla całego genu, gdyż modele są lepiej dobrane, co pozwala na dokładniejszą analizę, dlatego w analizach filogenetycznych należy skupiać się na tych drzewach i prawdopodobnie nie ma potrzeby, by tworzyć dodatkowo drzewa z jednym modelem substytucji dla całego genu. Tworzenie drzewa z charsetami w tym przypadku było jednak mniej wydajne, ilość obliczeń, która musiała zostać wykonana, znacząco przewyższała ilość obliczeń potrzebnych do wykonania pierwszego drzewa.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku analizy stworzono drzewa przedstawiające pokrewieństwo pomiędzy gatunkami różnych podrodzin, w głównej mierze byli to przedstawiciele Theraphosinae. Wyniki pracy w większości przypadków były spójne z przeprowadzanymi dotychczas analizami na rodzinie Theraphosidae. Duże znaczenie podczas analiz filogenetycznych może mieć odpowiedni dobór genów, które wykazują różną skuteczność w analizie gałęzi młodszych lub starszych ewolucyjnie. W innych przypadkach badania pokazują, że niektóre geny mogą gorzej nadawać się do przeprowadzania analiz filogenetycznych konkretnych organizmów, jak w przypadku 16S i Theraphosidae (Ortiz i in., 2018). Większość różnic pomiędzy wynikami tej

pracy i wynikami wykorzystanych publikacji prawdopodobnie wynika właśnie z różnic w wyborze genów lub długości ich fragmentów.

Wyniki otrzymane za pomocą metod filogenetyki molekularnej najczęściej były spójne z cechami morfologicznymi badanych organizmów, należy jednak podkreślić, że choć metody filogenetyki molekularnej są wysoce skuteczne w analizach filogenetycznych (i być może przewyższają dokładnością analizy oparte o cechy morfologiczne), to do pełnego zrozumienia relacji pomiędzy gatunkami potrzebne są także badania ich cech morfologicznych, zachowania i prowadzonego trybu życia.

Na podstawie tej analizy trudno jest szukać powiązań pomiędzy ewolucją genu COI, a prowadzonym trybem życia, gdyż znaczna większość gatunków obecnych w analizie prowadzi naziemny tryb życia. Region występowania jest zwykle spójny z pokrewieństwem badanym na podstawie genu COI.

W większości przypadków wyniki tej pracy są również spójne z hipotetycznym podziałem Theraphosinae na plemiona. Podział ten, mimo że nie został na tą chwilę uznany i być może wymaga dopracowania, na podstawie mojej analizy wydaje się być dobrym rozwiązaniem dla Theraphosinae, która jest najliczniejszą podrodziną należącą do Theraphosidae.

Prawdopodobnie najbardziej ciekawym wynikiem tej pracy, jest hipoteza o konieczności podziału rodzaju *Aphonopelma*, na co najmniej 2 odrębne kłady, z których jeden byłby blisko spokrewniony z *Tliltocatl*, spp., a drugi z *Brachypelma* spp.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnedo, M.A.; Coddington, J.; Agnarsson, I.; Gillespie, R.G. (2004) From a comb to a tree: phylogenetic relationships of the comb-footed spiders (Araneae, Theridiidae) inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 31(1), 225-245.
2. Bartani, R.; Augusto, O. (1995) Defensive Behaviours in Mygalomorph Spiders: Release of Uricating Hair by Some Aviculariinae (Araneae, Theraphosidae). *Zoologischer Anzeiger*, 234, 161-165.
3. Criscuolo, F.; Font-Sala, C.; Bouillaud, F.; Poulin, N.; Trabalon, M. (2010) Increased ROS Production: A Component of the Longevity Equation in the Male Mygalomorph, *Brachypelma albopilosa*. *PLOS ONE* 5(10), e13104.
4. Douady, C.J.; Delsuc, F.; Boucher, Y.; Doolittle, W.F.; Douzery, E.J.P. (2003) Comparison of Bayesian and Maximum Likelihood Bootstrap Measures of Phylogenetic Reliability. *Molecular Biology and Evolution*, 20(2), 248-254.
5. Foley, S.; Lüddecke, T.; Cheng, D.Q.; Krehenwinkel, H.; Künzel, S.; Longhorn, S.J.; Wendt, I.; Wirth, V.; Tänzler, R.; Vences, M.; Piel, W.H. (2019) Tarantula phylogenomics: A robust phylogeny of deep theraphosid clades inferred from transcriptome data sheds light on the prickly issue of urticating setae evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 140, 106573.
6. Fuchs, J.; Dechend, M.; Mordasini, R.; Ceschi, A.; Nentwig, W. (2014) A verified spider bite and a review of the literature confirm Indian ornamental tree spiders (Poecilotheria species) as underestimated theraphosids of medical importance. *Toxicon*, 77, 73-77.
7. García-Arredondo, A.; Rodríguez-Rios, L.; Díaz-Peña, L.F.; Vega-Ángeles, R. (2015) Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: Poecilotheria regalis, Ceratogyrus darlingi and Brachypelma epicureanum. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21, 15
8. Geyer, C.J. (1991) Markov Chain Monte Carlo Maximum Likelihood. *University of Minnesota*.
9. Gillespie, R.G.; Spagna, J.C. (2009) Spiders, Encyclopedia of Insects (Second Edition). Academic Press, Amsterdam, rozdział 241, 941-951.
10. Hamilton, C.A.; Formanowicz, D.R.; Bond, J.E. (2011) Species Delimitation and Phylogeography of Aphonopelma hentzi (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): Cryptic Diversity in North American Tarantulas. *PLOS ONE* 6(10): e26207.
11. Hamilton, C.A.; Hendrixson, B.E.; Bond, J.E. (2016) Taxonomic revision of the tarantula genus Aphonopelma Pocock, 1901 (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae) within the United States. *ZooKeys*, 560, 1–340.
12. Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F.; Nielsen, R.; Bollback, J.P. (2001) Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science*, 294, 2310-2314.

13. Kaderka, R. (2015) The Neotropical genus *Cyriocosmus* Simon, 1903 and new species from Peru, Brazil and Venezuela (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae). *Journal of Natural History*, 50(7), 1-73.
14. Korba, J.; Opatova, V.; Mascarell, A.C.; Enguídanos, A.; Bellvert, A.; Adrián, S.; Sánchez-Vialas, A.; Arnedo, M.A. (2022) Systematics and phylogeography of western Mediterranean tarantulas (Araneae: Theraphosidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 196(2), 845–884.
15. Macedo, K.W.R.; Costa, L.J.L.; Souza, J.O.; Vasconcelos, I.A.; Castro, J.S.; Santana, J.C.; Magalhães, A.C.M.; Castro, M.S.; Júnior, O.R.P (2021) Brazilian Theraphosidae: a toxicological point of view. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 27, e20210004.
16. Mendoza, J.; Francke, O.F. (2019) Systematic revision of Mexican threatened tarantulas *Brachypelma* (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae), with a description of a new genus, and implications on the conservation. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 188(1), 82-147.
17. Nacer, D.F.; Amaral, F.R. (2017) Striking pseudogenization in avian phylogenetics: Numts are large and common in falcons. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 115, 1-6.
18. Naseem, S.; Tahir, H.M. (2016) Use of mitochondrial COI gene for the identification of family Salticidae and Lycosidae of spiders. *Mitochondrial DNA part A*, 29(1), 96-101.
19. Ortiz, D.; Francke, O.F. (2017) Reconciling morphological and molecular systematics in tarantulas (Araneae: Theraphosidae): revision of the Mexican endemic genus *Bonnetina*, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 180(4), 819–886.
20. Ortiz, D.; Francke, O.F.; Bond, J.E. (2018) A tangle of forms and phylogeny: Extensive morphological homoplasy and molecular clock heterogeneity in *Bonnetina* and related tarantulas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 55-73.
21. Prentice, T.R. (1992) A New Species of North American Tarantula, *Aphonopelma paloma* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae). *The Journal of Arachnology*, 20(3), 189–199.
22. Setton, E.V.W.; Hendrixson, B.E.; Sharma, P.P. (2019) Embryogenesis in a Colorado population of *Aphonopelma hentzi* (Girard, 1852) (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae): establishing a promising system for the study of mygalomorph development. *The Journal of Arachnology* 47(2), 209-216.
23. Shivambu, T.C.; Shivambu, N.; Lyle, R.; Jacobs, A.; Kumschick, S.; Foord, S.; Robertson, M.P. (2020) Tarantulas (Araneae: Theraphosidae) in the pet trade in South Africa. *African Zoology*, 55(4), 323-336.
24. Silva, F.D.; Barros, R.; Cerqueira, V.L.A.; Mattedi, C; Pontes, R.C.; Pereira, E.A. (2019) Predation on *Leptodeira annulata* (Linnaeus, 1758) (Squamata: Colubridae) by *Theraphosa blondi* (Latreille, 1804) (Araneae: Theraphosidae) in Amazon Forest, North of Brazil. *Herpetology Notes*, 12, 953-956

25. Song, H.; Buhay, J.E.; Whiting, M.F.; Crandall, K.A. (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 36, 13486-13491.
26. Souza, H.V.; Marchesin, S. R. C.; Itoyama, M. M. (2016). Analysis of the mitochondrial COI gene and its informative potential for evolutionary inferences in the families Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera). *Genet. Mol. Res.*, 15(1).
27. Turner, S.P.; Longhorn, S.J.; Hamilton, C.A.; Gabriel, R.; Pérez-Miles, F.; Vogler, A.P. (2017) Re-evaluating conservation priorities of New World tarantulas (Araneae: Theraphosidae) in a molecular framework indicates non-monophyly of the genera, *Aphonopelma* and *Brachypelma*. *Systematics and Biodiversity*, 16(1), 89-107.
28. Taksonomiczna baza danych dotycząca rodziny Theraphosidae - www.tarantupedia.com (28.01.2023)