



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GILCILENE SANTANA CORNÉLIO

ESTRUTURA GENÉTICA EM *Pristimantis latro* (ANURA:
CRAUGASTORIDAE)

ALTAMIRA - PA
2018

GILCILENE SANTANA CORNÉLIO

ESTRUTURA GENÉTICA EM *Pristimantis latro* (ANURA:
CRAUGASTORIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Emil José Hernández-Ruz
Coorientador: Msc. Elciomar Araújo de Oliveira

ALTAMIRA
2018

GILCILENE SANTANA CORNÉLIO

ESTRUTURA GENÉTICA EM *Pristimantis latro* (ANURA:
CRAUGASTORIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
aprovação como requisito parcial para obtenção
do grau de Licenciado em Ciências Biológicas,
pela banca examinadora formada pelos
professores:

Orientador:

Prof. Dr. Emil José Hernández-Ruz
Faculdade de Ciências Biológicas - UFPA - Altamira

Coorientador:

Msc. Elciomar Araújo de Oliveira
Curso de Pós-graduação em Biodiversidade BIONORTE

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rainério Meireles da Silva
Faculdade de Engenharia Agrônômica - UFPA - Altamira

MSc Keila Xavier Magalhães
Faculdade de Medicina- UFPA - Altamira

Suplentes:

Prof^ª. Dr^a Daniela Fernandes
Faculdade de Medicina– UFPA - Altamira

Prof. Dr. Rodolfo Aureliano Salm
Faculdade de Ciências Biológicas - UFPA - Altamira

*“Eu sou
um universo de átomos,
e ainda assim,
um átomo no universo.”*
- Richard P. Feynman

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Eu não cheguei sozinha ao final dessa jornada. É graças à colaboração de muitas pessoas e ao apoio de tantas outras, que essa etapa na minha vida acadêmica se conclui.

Sou grata aos meus pais (Marinalva e João Evangelista), por tão bravamente me apoiar em todos os momentos e me amar incondicionalmente e por me ajudarem a seguir apesar de todas as dificuldades.

Aos meus irmãos (Genilson, Gilcinéia e Gilvanei) que não mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso.

A minha cunhada Suely Batista, aos meus sobrinhos (Gleicielly, Erik Vitor e Arthur) e minha prima Cristina Santana por todos os momentos de descontração.

Aos meus colegas de turma da Bio-2015 pela convivência e paciência, em especial as minhas amigas e grupo de trabalho de todos os momentos (Agda Lorena, Amanda Costa, Jéssica Almeida e Tamires Pereira), pessoas que me ensinaram muito e que além de colegas viraram grandes amigas.

Ao meu primo Mateus por ter me ajudado e apoiado em tantos momentos difíceis na trajetória acadêmica e a Cristiane Costa Carneiro por todo apoio, ensinamento e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de zoologia, da Faculdade de Ciências Biológicas da UFPA de Altamira, em especial a Karol Sousa por todos os momentos, conversas e parceria.

As colegas de TCC (Gabriela Wemilly, Gleicierle Rodrigues e Vanessa Nascimento) sorrimos e choramos juntas, mais enfim podemos dizer que conseguimos chegar ao final desse ciclo.

Aos professores do curso pelos ensinamentos e compreensão.

Aos colegas e amigos que fiz na Defensoria Pública da União, em especial a Dhyene Rayne, por segurar a barra em tantos momentos.

Ao professor Emil Hernández pela orientação, paciência e por me instigar a buscar sempre mais. Sou extremamente grata por todo aprendizado científico e pessoal, que obtive nesses últimos anos.

E é claro que não poderia deixar de agradecer ao melhor coorientador de todos, por me disponibilizar os dados do mestrado para que esse trabalho fosse realizado, por todos os puxões de orelha, pelas correções, sugestões de leitura. Por me incentivar, me manter centrada em meus objetivos e principalmente por ter-me “adotado”. Seu apoio foi fundamental para que eu conseguisse chegar ao final dessa etapa.

A todos vocês, minha sincera gratidão!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
METODOLOGIA.....	2
Área de estudo	2
Amostras para estudos genéticos.....	2
Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento	2
Alinhamento das sequências e datação molecular	3
Análise de estrutura populacional	3
RESULTADOS	4
Datação molecular e distância genética	4
Estrutura populacional.....	4
DISCUSSÃO	4
CONCLUSÃO.....	6
AGRADECIMENTOS	6
REFERÊNCIAS	6
Legenda das figuras	11
Tabelas.....	12
Figuras	16
ANEXO	21
ANEXO – I	21

Este documento segue as normas da revista Zookeys:
<https://zookeys.pensoft.net/about#Authors-Guidelines>

Estrutura genética em *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae)

GILCILENE SANTANA CORNÉLIO¹, ELCIOMAR ARAÚJO DE OLIVEIRA^{2*}, EMIL JOSÉ HERNÁNDEZ-RUZ³

¹*Faculdade de Ciências Biológicas, Campus Universitário de Altamira, Universidade Federal do Pará, Rua Coronel José Porfírio, 2515, CEP 68372-040, Altamira, Pará, Brazil.*

² *Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil.*

³ *Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Faculdade de Ciências Biológicas, Campus Universitário de Altamira, Universidade Federal do Pará, Rua Coronel José Porfírio, 2515, CEP 68372-040, Altamira, Pará, Brazil.*

* *Corresponding author. E-mail: elciomar.attractus@gmail.com*

RESUMO

CORNÉLIO, G.S. **Estrutura genética em *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae).** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Pará, Altamira, 2018, 43 p.

Anfíbios anuros são apontados como um grupo de elevada diversidade críptica em regiões tropicais, por conta do forte conservatismo fenotípico presente entre espécies. É contrastante a presença de uma forte estruturação acompanhada de diferenciação genética entre populações. O gênero *Pristimantis* é o mais diverso entre todos os grupos de Vertebrados, com mais de 526 espécies. *Pristimantis latro* Oliveira, Rodrigues, Kaefer, Pinto and Hernández-Ruz 2017, é encontrada no leste da Amazônia, entre os rios Tapajós e Tocantins – Araguaia, ocupando assim as duas margens do rio Xingu. Até recentemente, *P. latro* era erroneamente identificada como *P. fenestratus*. Dado o pouco conhecimento sobre *P. latro*, utilizamos os genes mitocondriais 16S e COI para 1) avaliar padrões de estrutura genética; 2) testar se existe relação entre a distância genética e a distância geográfica entre as diferentes localidades; 3) reconstruir as relações filogenéticas entre as populações; e 4) estimar o tempo de divergência entre as localidades amostradas. *Pristimantis latro* apresentou forte estruturação genética entre as populações da margem esquerda e direita do rio Xingu, assim como na mesma margem. Rios recentes podem representar barreiras recentes ou semipermeáveis, como encontrado em anfíbios e squamatas no rio Tapajós. Observamos um padrão espacial de distribuição da estruturação genética similar ao proposto para a hipótese de rios como barreiras por Wallace (1849). Tal padrão tem sido encontrado por diversos estudos com diferentes vertebrados terrestres. Este padrão se assemelha aquele observado em *Allobates*, anuro que apresenta reprodução terrestre, similar as espécies de *Pristimantis*. Sua história de vida, barreira fluvial, isolamento por distância e uma elevada diversidade de habitats na Amazônia, são alguns dos fatores que foram responsáveis por propiciar essa pronunciada estruturação em *P. latro*.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, isolamento por distância, rio como barreira, terrarana.

ABSTRACT

CORNELIO, G.S. **Genetic structure in *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae).**
Course completion work, Universidade Federal do Pará, Altamira, 2018, 43 p.

Keywords: Mitochondrial DNA, distance isolation, river barrier, terrarana.

Anuran amphibians are indicated as a group of high cryptic diversity in Tropical regions, due to the strong phenotypic conservatism present among species. The presence of a high genetic structure between populations. The *Pristimantis* genus is the most diverse among all Vertebrates, with more than 526 species. *Pristimantis latro* Oliveira, Rodrigues, Kaefer, Pinto and Hernández-Ruz 2017, is distributed in the eastern Amazon, between the Tapajós and Tocantins-Araguaia rivers, occupying two banks of the Xingu River. Not too long ago, *P. latro* was erroneously identified as *P. fenestratu*. Due to little knowledge about *P. latro*, we used the mitochondrial genes 16S and IOC to 1) evaluate patterns of genetic structure; 2) test the relation between the genetic and geographical distance between the locations; 3) reconstruct phylogenetic relationships among populations; and 4) Assess the time of divergence between the sampled locations. *Pristimantis latro* presented a strong genetic structure among the populations of the left and right banks of the Xingu River of the same margin. Recent rivers may represent recent or semi permeable barriers, as found in amphibians and squamates in the Tapajós River. Through observations, we found a spatial pattern of genetic distribution similar to that proposed as a rivers barrier hypothesis by Wallace (1849). Such pattern has been found in studies with terrestrial Vertebrates. This pattern resembles this in *Allobates*, anuro of terrestrial reproduction similar to the *Pristimantis* species. Its life history, river barrier, isolation by distance, and a high diversity of habitats in the Amazon, are some of the factors that were responsible to populate this proclaimed structuring in *P. latro*.

Introdução

Uma das premissas da genética de populações prevê que a dispersão diminui com o aumento da distância geográfica, de modo que o fluxo gênico é geralmente mais baixo entre populações geograficamente distantes provocando um padrão de isolamento por distância (Wright 1943), nesse sentido populações historicamente isoladas são as principais candidatas para estudos da origem das diferenças genéticas e fenotípicas, porque elas teriam sido potencialmente expostas à deriva genética de longo prazo ou divergentes pressões de seleção, sem as influências de homogeneização de fluxo gênico (Avice 2000, Nosil et al. 2009, Kaefer et al. 2013).

Por outro lado a extensão e a forma da estrutura espacial das relações intraespecífica e genealógicas são tipicamente desconhecidas para as populações, especialmente em regiões tropicais megadiversas, onde nem mesmo os limites das espécies estão claramente definidos (Groeneveld et al. 2009, Vieites et al. 2009, Kaefer et al. 2013), todo isso aumenta o desafio de delimitar espécies, que é um processo que depende entre outros de fatores geográficos que podem explicar a origem e diversificação de linhagens dentro de espécies, como a variância e isolamento por distância (Hutchison and Templeton 1999, Zink et al. 2000).

Anfíbios anuros são apontados como um grupo de elevada diversidade críptica em regiões tropicais por conta do forte conservatismo fenotípico presente entre espécies em contraste com a forte estruturação e elevada diferenciação genética observada entre diferentes populações (Zeisler e Beebe 2008, Vieites et al. 2009, Kaefer et al. 2013). Assim, duas hipóteses são recorrentes em estudos sobre a diversificação na biota amazônica, afim de explicar o padrão de distribuição das espécies: (1) rios como barreiras, proposta por Wallace (1849), na qual grandes rios amazônicos atuam como barreiras ao fluxo gênico, limitando a distribuição das espécies, sendo que elas estariam sobre maior efeito da deriva genética (populações menores) para promover a divergência genética entre populações das margens opostas (Gascon et al. 2000, Haffer 2008, Ribas et al. 2012) e (2) teoria de refúgios, que identifica as influências dos ciclos glaciais e interglaciais como causadores de isolamento e diferenciação entre as populações, devido às contrações e expansões florestais (Haffer 1969).

O gênero *Pristimantis* Jiménez De la Espada 1870, possui atualmente 526 espécies (Frost 2018) divididas em 11 grupos (Padial et al. 2014). O grupo *P. conspicillatus* (Lynch and Duellman 1997) possui 34 espécies de Oliveira et al. (2017), distribuídas principalmente no norte da América do Sul, leste da Colômbia, Guianas, Ilha Taboga no Panamá (Hedges, Duellman, and Heinicke 2008) e Amazônia brasileira.

O gênero *Pristimantis* é o mais diverso entre todos os grupos de Vertebrados (Fouquet et al. 2013). Essa diversidade pode estar associada à evolução do desenvolvimento direto, característica dos terráneos que os faz alvo de interesse para estudos de evolução, já que as espécies com essas características apresentam pouca capacidade de dispersão e filopatria (Fouquet et al. 2012, Vences and Wake 2007, Beebe and Griffiths 2005). Como consequência de sua história de vida, as populações tendem a ser altamente estruturadas geneticamente e retêm sinais fortes de processos evolutivos passados, por isso, tornam-se bons modelos para testes de hipóteses evolutivas (Funk et al. 2012, Fouquet et al. 2012).

Pristimantis latro Oliveira, Rodrigues, Kaefer, Pinto & Hernández-Ruz 2017, é encontrada no leste da Amazônia, entre os rios Tapajós e Tocantins – Araguaia, ocupando assim as duas margens do rio Xingu (de Oliveira et al. 2017). Até recentemente, *P. latro* era

erroneamente identificada como *P. fenestratus* (Steindachner 1864), uma espécie amplamente distribuída na bacia amazônica (Padial and De La Riva 2009).

Dado o nível de desconhecimento de *P. latro* utilizamos os genes mitocondriais 16S e COI para 1) Avaliar padrões de estrutura genética; 2) Testar se existe relação entre a distância genética e a distância geográfica entre as diferentes localidades; 3) Reconstruir as relações filogenéticas entre as populações; e 4) Estimar o tempo de divergência entre as localidades amostradas.

Metodologia

Área de estudo

Este estudo abrange os municípios de Santarém, Medicilândia, Brasil Novo, Vitória do Xingu, Altamira, Anapu, Senador José Porfírio e Marabá no estado do Pará, Brasil (Figura 1). A composição da floresta na área de estudo varia de Floresta Ombrófila Densa a Floresta Ombrófila de Terras Baixas (IBGE 2004), com imensas áreas de pastagem.

Amostras para estudos genéticos

Foram coletados tecidos de 52 indivíduos de *P. latro*. Os espécimens coletados em campo foram eutanasiados com pomada de lidocaína de uso tópico (BENZOTOP®). Os tecidos do músculo ou fígado foram retirados e armazenados em etanol 95%. Os espécimes foram fixados em formalina 10%, armazenados em álcool 70% e depositados na Coleção do laboratório de Zoologia - Adriano Giorgi da Faculdade de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Pará - UFPA/ Campus de Altamira.

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

O DNA genômico total foi extraído através do protocolo CTAB (Doyle and Doyle 1987) e ressuspendido com 30 µl de água ultrapura. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose a 1% em cuba de eletroforese. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada para amplificar um fragmento de 600 pb do gene mitocondrial 16S, e fragmento de 600 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI). A reação para amplificação do fragmento dos genes mitocondrial 16S e COI estão disponíveis na tabela 1.

A reação para amplificação do fragmento do gene mitocondrial 16S seguiu as seguintes condições: uma temperatura inicial de 92°C (60 sec.), seguidos por 35 ciclos de 92°C (60 sec.), 50°C (50 sec.) e 72°C (1.5 min.) e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Já para a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial COI a reação seguiu as seguintes condições: 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 53 °C, 40s a 72 °C e uma extensão final de 7 min. a 72 °C.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit BigDye Terminator (*Life Technology*) seguindo o protocolo do fabricante. Os *primers forward* 16S A (mDNA), o primer COI LCO 1590, foram utilizados nas reações de sequenciamento. Os produtos das reações de sequenciamento foram precipitados com etanol de acordo com recomendações do fabricante (*Applied Biosystems*), ressuspendidos em 10 µL de formamida deionizada (ABI) e posteriormente foram injetados no sequenciador automático ABI 3500xl (*Applied Biosystems*).

Alinhamento das sequências e datação molecular

As sequências obtidas foram alinhadas no software BIOEDIT (Hall 1999) utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1996) e editadas manualmente. Para inferir o tempo de divergência entre as localidades de *P. latro*, uma Species Tree foi construída utilizando o software BEAST v1.8 (Drummond et al. 2012) usando ambos os genes 16S e COI com o modelo evolutivo GTR + G, escolhido no software JMODELTEST (Darriba et al. 2012) via Critério de Informação Akaike Corrigido (AICc). Utilizamos *Oreobates quixensis* como outgroup (Heinicke et al. 2009). Todas as sequências geradas e utilizadas neste estudo são encontradas na tabela 2. Devido à ausência de registro fóssil utilizamos a taxa geral de mutação para o 16S de 0.0028 por linhagens por milhões de anos (Lemmon et al. 2008, Lymberakis et al. 2007). A cadeia (MCMC) teve 500 milhões de gerações, com uma árvore amostrada a cada mil. Desse modo, foram gravadas 50 mil árvores e descartadas as 10 mil primeiras, considerando um burn-in de 20%.

Tais análises foram realizadas assumindo um relógio molecular relaxado do tipo lognormal, o qual assume taxas independentes sobre diferentes ramos (Drummond et al. 2006). As árvores prévias foram modeladas de acordo com o processo de especiação Yule. A estacionalidade da distribuição posterior para todos os parâmetros foi visualizada no programa TRACER v1.5 (Drummond and Rambaut 2007). Para o *output* do MCMC, geramos uma árvore consenso final utilizando o TREE ANNOTATOR v1.6.6 (Drummond e Rambaut 2007).

As distâncias genéticas *p* par a par não corrigidas entre as localidades foram obtidas pelo programa MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013), utilizando a distância *p* para o 16S e Kimura 2 Parâmetro (K2P) para o COI.

Análise de estrutura populacional

Análise Bayesiana de Estrutura Populacional (BAPS) foi implementada no software BAPS 5.0 (Corander et al. 2008) para encontrar agrupamentos formados com as sequências do gene COI (oito localidades). O software BAPS utiliza frequências nucleotídicas das amostras para inferir o número *K* de grupos diferentes geneticamente através de análise Bayesiana, alocando sequências similares no mesmo grupo. O número máximo de *K* escolhido para a análise foi oito, correspondente a cada localidade. O valor de *log-likelihood* foi usado para escolher a configuração de agrupamentos mais provável.

Para estimar relações genealógicas entre os indivíduos, foram produzidas redes de haplótipos, com base na topologia de uma árvore filogenética para o gene COI, construída no software TREEFINDER (Jobb 2011) com 10 mil réplicas não paramétricas de *bootstrap* (Felsenstein 1985). O grupo externo não foi utilizado na rede de haplótipos. O software HAPLOVIEW (Salzburger et al. 2011) construiu a rede de haplótipos, determinando o número de haplótipos compartilhados com base em cálculos de verossimilhança. Nas análises do BAPS e rede de haplótipos, não usamos sequências do gene 16S, pois não apresentou indivíduos da localidade de Marabá.

Para calcular a importância relativa de isolamento por distância utilizamos o teste de Mantel simples realizado pelo programa ALLELES IN SPACE (AIS) (Miller, 2005) apenas para o marcador COI, pois apresentou mais indivíduos por localidade. O teste de Mantel

consiste em estimar a correlação entre duas matrizes através do coeficiente r de correlação de Pearson. A significância dos valores de r foi estimada através de 1.000 permutações.

Resultados

Datação molecular e distância genética

Foram obtidas 52 sequências do fragmento do gene 16S DNAm, correspondendo a oito haplótipos com 521 pb, sendo 507 sítios conservados, 14 sítios variáveis e 11 sítios informativos; 38 sequências de COI DNAm, equivalente a 14 haplótipos com 617 pb, sendo 579 sítios conservados, 38 sítios variáveis e 31 sítios informativos.

A árvore com o tempo de divergência (Figura 2) mostrou a separação de *P. latro* com *Pristimantis* sp.4 (norte do Mato Grosso) no final do Mioceno e início do Plioceno, por volta de ~ 6,8 Ma (95% HPD: 3.2 – 10.8 Ma). Dentro de *P. latro*, as duas principais separações foram entre as populações da margem esquerda e direita do rio Xingu ~ 497 mil anos atrás, no meio do Pleistoceno (95% HPD: 231 – 846 Mil anos). A segunda ocorreu entre Santarém (margem direita do rio Tapajós) e Medicilândia, Brasil Novo, Altamira e Vitória do Xingu (margem esquerda do rio Xingu) ~ 269 Mil anos, final do Pleistoceno (95% HPD: 109 – 483 Mil anos).

A distância genética dentro de *P. latro* apresentou variação de 0.2 – 8.3 % para o COI (Tabela 3) e 0 – 1.7 % para o gene 16S (Tabela 4). Entre as margens esquerda e direita, a distância foi de 2.8 – 4.6 % para o COI e de 0 – 1.5 % para o 16S. A maior distância genética (8.3 % para o COI) foi entre *P. lato* do município de Marabá e Senador José Porfírio, a uma distância geográfica de 443 Km, enquanto que para o 16S (1.7 %), foi entre *P. latro* dos municípios de Brasil Novo + Medicilândia e Santarém, a uma distância geográfica de 240 Km. As localidades mais distantes geograficamente (Santarém e Marabá, situadas em margens opostas do rio Xingu), 701 Km, apresentaram uma distância genética de 5.1 % para o COI. Devido à ausência de sequências para o gene 16S de Marabá, esta comparação não pôde ser feita. Por isso comparamos entre os municípios de Santarém e Anapu (Margens opostas do rio Xingu) distantes em cerca de 377 Km, apresentando 1% de distância genética entre elas.

Estrutura populacional

Pristimantis latro apresentou forte estruturação genética para o gene COI (logML = - 382.8427; probabilidade = 0,99), formando cinco clusters (Figura 3): cluster 1 (Santarém); cluster 2 (Medicilândia – A); cluster 3 (Medicilândia - B, Brasil Novo, Altamira e Vitória do Xingu); cluster 4 (Senador José Porfírio - A e Anapu – A); e cluster 5 (Anapu - B, Senador José Porfírio - B e Marabá). Na rede de haplótipos (Figura 4), observamos que não existe compartilhamento entre as margens esquerda e direita do rio Xingu.

O teste de Mantel revelou uma correlação positiva e significativa entre distâncias geográficas e genéticas ($P < 0.001$; $r = 0,558$), indicando um forte papel de eventos aleatórios no processo de diversificação evolutiva com o marcador estudado.

Discussão

Pristimantis latro apresentou forte estruturação genética entre as populações da margem esquerda e direita do rio Xingu, assim como na mesma margem. Anuros com desenvolvimento direto apresentam estratégias de vida que promovem alta estruturação populacional, pois apresentam baixa capacidade de dispersão (Fouquet et al. 2014, 2015), filopatria e até mesmo territorialidade (Wells 2007, Bogart 1991). O padrão de estruturação

genética encontrado no presente estudo se assemelha aquele observado em *Allobates* (Kaefer et al. 2013), gênero que inclui espécies com desenvolvimento direto e que compartilha com *Pristimantis* características que promovem baixa capacidade de dispersão. A estruturação genética é amplamente documentada na literatura sobre anfíbios (Elmer et al. 2007, Zeisset and Beebee 2008, Kaefer et al. 2013), revelando que as populações muitas vezes encontram-se distribuídas de tal forma que estimativas de fluxo gênico entre elas são praticamente nulas. A hipótese de que populações de anfíbios tendem a ser relativamente isoladas umas das outras, como resultado da ausência de migração e de baixo fluxo gênico, é uma evidência de estruturação genética populacional (Shaffer et al. 2000, Lampert et al. 2003).

Podemos observar um padrão espacial de distribuição da variabilidade genética similar ao proposto para a hipótese de rios como barreiras, proposta por Wallace (1849). Tal padrão tem sido encontrado por diversos estudos com diferentes vertebrados terrestres (Antonelli et al. 2010), embora seja importante salientar que a diversidade de organismos e de rios testados não permitem grandes generalizações a respeito do tema (Leite and Rogers 2013, Dias- Terceiro et al. 2015). Por fim, o desenho amostral empregado no presente estudo não permitiu avaliar se existe “permeabilidade” dos rios ao fluxo gênico ao longo de suas respectivas extensões. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo vem se somar a um crescente corpo de conhecimento que indica que a variabilidade genética nos níveis intra e interespecífico em anfíbios apresentam relação com a transposição de grandes rios amazônicos (e.g. Funk et al. 2007, Fouquet et al. 2012, Kaefer et al. 2012, Kaefer et al. 2013, Simões et al. 2014).

Os municípios de Medicilândia (margem esquerda do rio Xingu) e Senador José Porfírio e Anapu (margem direita), apresentaram mais de um cluster por localidade, evidenciando estruturação genética local. Estruturação genética em anfíbios em distâncias menores que 5 km é documentada na literatura (Lampert et al. 2003, Rowe et al. 2000, Burns et al. 2004, Andersen et al. 2004), mostrando que o fluxo gênico limitado pode promover diferenciação em populações locais, devido principalmente a fragmentação de habitats. O teste de Mantel explica que 31% (r^2) da variação é causada pela distância geográfica, mais não é responsável por toda estruturação, indicando assim que outros fatores estão associados com essa pronunciada estruturação (rios, fragmentação do habitat, elevação altitudinal).

Estima-se que a origem da maioria das espécies de anfíbios atuais na Amazônia tenham ocorrido durante o final do Mioceno (Santos et al. 2009, Funk et al. 2012), período que ocorreu a separação entre *P. latro* e *Pristimantis* sp.4. do norte do Mato Grosso. Já a separação entre margem esquerda e direita do rio Xingu (meio do Pleistoceno), é relativamente recente, no entanto desempenhando um papel importante na estruturação populacional (ver Figura 3, BAPS) e ausência de compartilhamento de haplótipos entre as margens (ver Figura 4, rede de haplótipos). Ribas et al. (2012) sugerem o rio Xingu como barreira geográfica, separando as espécies de *Psophia interjecta* e *P. dextralis* por volta de 0.8 – 0.3 Ma, sendo responsável pela separação de linhagens mais jovens. Rios recentes podem representar barreiras recentes ou semipermeáveis, como encontrado em anfíbios e squamatas no rio Tapajós (Moraes et al. 2016).

P. latro apresenta uma alta filopatria e ausência de transporte de girinos, este fator pode restringir ainda mais o uso de espaço pelas rãs, bem como concentrar a prole perto de seus parentais, contribuindo assim para o fluxo gênico limitado entre linhagens, característica também observada em espécies de *Allobates* (Kaefer et al. 2013). Este pode ser um dos fatores que estão contribuindo para a estruturação de *Pristimantis latro* na mesma margem do

rio Xingu. Um fator limitante do nosso estudo foi o uso de apenas dois marcadores moleculares (16S e COI mtDNA), sendo que o uso de marcadores nucleares é geralmente recomendado, pois o uso deles tem o potencial de melhorar a precisão das reconstruções filogenéticas (Rojas et al. 2018) e as datações moleculares. Portanto a inclusão de mais indivíduos por localidades e novas áreas de amostragem, contemplando a distribuição da espécie em toda sua extensão, assim como outros marcadores moleculares, poderá fornecer maior embasamento sobre a história evolutiva de *P. latro*.

Conclusão

Com base em nossas análises foi possível observar que diferentes fatores contribuem para moldar a estrutura genética de *Pristimantis latro*. Sua história de vida, barreira fluvial, isolamento por distância e uma elevada diversidade de habitats na amazônia, são alguns dos fatores que foram responsáveis por propiciar essa pronunciada estruturação em *P. latro*.

Agradecimentos

Agradecemos a Faculdade de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Zoologia – Adriano Giorgi da Universidade Federal do Pará/ Campus Universitário de Altamira e a todos os amigos e colegas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Referências

- Andersen LW, Fog K, Damgaard C (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271: 1293–1302. doi: 10.1098/rspb.2004.2720.
- Antonelli A, Quijada-Mascareñas A, Crawford AJ, Bates JM, Velazco PM, Wuster W (2010) Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. *Molecular studies of Amazonian tetrapods*: 385–404. doi: 10.1007/978-94-017-9376-6_99.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Bates JM, Haffer J, Grismer E (2004) Avian mitochondrial DNA sequence divergence across a headwater stream of the Rio Tapajós, a major Amazonian river. *Journal of Ornithology* 145: 199–205. doi: 10.1007/s10336-004-0039-4.
- Beebee TJC, Griffiths RA (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271–285. doi: 10.1016/j.biocon.2005.04.009.
- Burns EL, Eldridge MDB, Houlden BA (2004) Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid *Litoria aurea*. *Molecular Ecology* 13: 1745– 1757. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02190.x.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics* 9: 1–14. doi: 10.1186/1471-2105-9-539.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
- Dias-Terceiro RG, Kaefer IL, de Fraga R, de Araújo MC, Simões PI, Lima AP (2015) A

- Matter of Scale: Historical and Environmental Factors Structure Anuran Assemblages from the Upper Madeira River, Amazonia. *Biotropica* 47: 259–266. doi: 10.1111/btp.12197.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4: 699–710. doi: 10.1371/journal.pbio.0040088.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 1–8. doi: 10.1186/1471-2148-7-214.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973. doi: 10.1093/molbev/mss075.
- Elmer KR, Dávila JA, Loughheed SC (2007) Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evolutionary Biology* 7: 1–14. doi: 10.1186/1471-2148-7-247.
- Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783–791. doi: 10.2307/2408678.
- Fouquet A, Courtois EA, Baudain D, Lima JD, Souza SM, Noonan BP, Rodrigues MT (2015) The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. *Journal of Tropical Ecology* 31: 361–373. doi: 10.1017/S0266467415000206.
- Fouquet A, Ledoux JB, Dubut V, Noonan BP, Scotti I (2012) The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 356–373. doi: 10.1111/j.1095-8312.2012.01871.x.
- Fouquet A, Martinez Q, Courtois EA, Dewynter M, Pineau K, Gaucher P, Blanc M, Marty C, Kok PJR (2013) A new species of the genus *Pristimantis* (Amphibia, Craugastoridae) associated with the moderately elevated massifs of French Guiana. *Zootaxa* 3750: 569–586. doi: 10.11646/zootaxa.3750.5.8.
- Fouquet A, Santana Cassini C, Fernando Baptista Haddad C, Pech N, Trefaut Rodrigues M (2014) Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41: 855–870. doi: 10.1111/jbi.12250
- Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padial JM, De la Riva I, Cannatella DC (2007) Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 825–837. doi: 10.1016/j.ympev.2007.01.012.
- Funk WC, Caminer M, Ron SR (2012) High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. : 1806–1814. doi: 10.1098/rspb.2011.1653.
- Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, Silva MNF, Bogart JP, Loughheed SC, Peres CA, Neckel S, Boag PT (2000) Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species.
- Groeneveld E, Westhuizen BD, Maiwashe A, Voordewind F, Ferraz JB (2009) POPREP: a generic report for population management. *Genetics and molecular research : GMR* 8: 1158–1178. doi: 10.4238/vol8-3gmr648.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian Forest Birds: 131–137.

- Haffer J (2008) Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Brazilian Journal of Biology* 68: 917–947. doi: 10.1590/S1519-69842008000500003.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*: 95–98.
- Hedges SB, Duellman WE, Heinicke MP (2008) New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana). *Zootaxa*: 1-182 pp.
- Heinicke MP, Duellman WE, Trueb L, Means DB, Macculloch RD, Hedges SB (2009) A new frog family (Anura : Terrarana) from South America and an expanded direct- developing clade revealed by molecular phylogeny. *Blood* 35: 1–35.
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution* 53: 1898–1914. doi: 10.2307/2640449.
- Jobb G (2011) Treefinder manual: 1–84.
- Kaefer IL, Kaefer IL, Tsuji-nishikido BM, Lima AP (2012) Beyond the river: Underlying determinants of population acoustic signal variability in Amazonian direct-developing *Allobates* (Anura: Dendrobatoidea). *acta ethologica* 15: 187–194. doi: 10.1007/s10211-012-0126-0.
- Kaefer IL, Tsuji-Nishikido BM, Mota EP, Farias IP, Lima AP (2013) The Early Stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism Despite Strong Genetic Structure. *Evolutionary Biology* 40: 228–245. doi: 10.1007/s11692-012-9205-4.
- Lampert KP, Rand AS, Mueller UG, Ryan MJ (2003) Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* 12: 3325–3334. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.02016.x.
- Leite RN, Rogers DS (2013) Revisiting Amazonian phylogeography: Insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*: 1–27. doi: 10.1007/s13127-013-0140-8.
- Lemmon EM, Lemmon AR, Collins JT, Cannatella DC (2008) A new North American chorus frog species (Amphibia : Hylidae : *Pseudacris*) from the south-central United States. *Zootaxa* 1675: 1–30.
- Lymberakis P, Poulakakis N, Manthalaou G, Tsigenopoulos CS, Magoulas A, Mylonas M (2007) Mitochondrial phylogeography of *Rana* (Pelophylax) populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 115–125. doi: 10.1016/j.ympev.2007.03.009.
- Lynch JD, Duellman WE (1997) Frogs of the Genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in Western Ecuador: Systematics, Ecology, and Biogeography. 1-252 pp.
- Miller MP (2005) Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. *Journal of Heredity* 96: 722–724. doi: 10.1093/jhered/esi119.
- Moraes LJCL, Pavan D, Barros MC, Ribas CC (2016) The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *Journal of Biogeography* 43: 2113–2124. doi: 10.1111/jbi.12756.

- Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O (2009) Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 145–156. doi: 10.1016/j.tree.2008.10.011.
- de Oliveira EA, Rodrigues LR, Kaefer IL, Pinto KC, Hernández-Ruz EJ (2017) A new species of *Pristimantis* from eastern Brazilian Amazonia (Anura, Craugastoridae). *ZooKeys* 2017: 101–129. doi: 10.3897/zookeys.687.13221.
- Padial JM, Grant T, Frost DR (2014) Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825: 1–132. doi: 10.11646/zootaxa.3825.1.1.
- Padial JM, De la Riva IJ (2009) Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Eleuthrodactylus* (Anura). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155: 78–122.
- Ribas CC, Aleixo A, Nogueira ACR, Miyaki CY, Cracraft J, Andre A (2012) A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. : 681–689. doi: 10.1098/rspb.2011.1120.
- Roelants K, Gower DJ, Wilkinson M, Loader SP, Biju SD, Guillaume K, Moriau L, Bossuyt F (2007) Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 887–892. doi: 10.1073/pnas.0608378104.
- Rojas RR, Fouquet A, Ron SR, Hernández-Ruz EJ, Melo-sampaio PR, Chaparro JC, Vogt RC, de Carvalho VT, Pinheiro LC, Avila RW, Farias IP, Gordo M, Hrbek T (2018) A Pan-Amazonian species delimitation : high species diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura : Bufonidae). *PeerJ*: 1–56. doi: 10.7717/peerj.4941.
- Rowe G, Beebe TJC, Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. *Oikos* 88: 641–651. doi: 10.1034/j.1600-0706.2000.880321.x.
- Salzburger W, Ewing GB, Von Haeseler A (2011) The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20: 1952–1963. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05066.x.
- Santos JC, Coloma LA, Summers K, Caldwell JP, Ree R, Cannatella DC (2009) Amazonian Amphibian Diversity Is Primarily Derived from Late Miocene Andean Lineages. *PLoS Biology* 7: 448–461. doi: 10.1371/journal.pbio.1000056.
- Shaffer HB, Fellers GF, Magee A, Voss SR (2000) The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo camorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 9: 245–257. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.00835.x.
- Simões PI, Stow A, Hödl W, Amézquita A, Farias IP, Lima AP (2014) The value of including intraspecific measures of biodiversity in environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (*Allobates femoralis*). *Tropical Conservation Science* 7: 811–828. doi: 10.1177/194008291400700416.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725– 2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of

- progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
- Vences M, Wake DB (2007) Speciation, Species Boundaries and Phylogeography of Amphibians. In: *Amphibian Biology*. , 2935.
- Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Kohler J, Glaw F, Vences M (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 8267–8272. doi: 10.1073/pnas.0810821106.
- Wallace AR (1852) On the Monkeys of the Amazon. *Zoological Society of London* 20: 107–110.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138. doi: 10.5194/isprs-Archives-XLII-5-W1-419-2017.
- Zeisset I, Beebee TJC (2008) Amphibian phylogeography: A model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109–119. doi: 10.1038/hdy.2008.30.
- Zink RM, Barrowclough GF, Atwood JL, Blackwell-Rago RC (2000) Genetics, taxonomy, and conservation of the threatened California Gnatcatcher. *Conservation Biology* 14: 1394–1405. doi: 10.1046/j.1523-1739.2000.99082.x

Legenda das figuras

Figura 1: Pontos de coleta de *P. latro*. Os círculos vermelhos representam localidades da margem esquerda do rio Xingu e os verdes da Margem direita. Os números correspondem as localidades amostradas: 1) Santarém; 2) Medicilândia; 3) Brasil Novo; 4) Altamira; 5) Vitória do Xingu; 6) Senador José Porfírio; 7) Anapu e 8) Marabá.

Figura 2: Árvore de espécies para *Pristimantis latro* baseado em análise Bayesiana para os genes 16S e COI. Os valores dos ramos indicam a probabilidade posterior. A barra de escala mostra o número de substituições por sítio.

Figura 3: Estrutura populacional em *P. latro* a partir dos dados de 16S. As cores dispostas verticalmente representam cada um dos agrupamentos genéticos (clusters). Os números correspondem as localidades amostradas: 1) Santarém; 2) Medicilândia; 3) Brasil Novo; 4) Altamira; 5) Vitória do Xingu; 6) Senador José Porfírio; 7) Anapu e 8) Marabá.

Figure 4: Rede de haplótipos Median-Joinin com base no DNAm COI. Cada haplótipo é representado por um círculo, no qual a área é proporcional a sua frequência. Os traços indicam passos mutacionais adicionais para ramos com mais de uma mutação. As cores indicam cada localidade. Os pontos azuis representam haplótipos perdidos ou não amostrados.

Tabelas

Tabela 1: Condição das reações de PCR para os genes 16S e COI.

Reagente	16S (15 µL volume total)	COI (15 µL volume total)
H ₂ O	6.7 µL	7.1 µL
MgCl ₂	1.5 µL de 25 mM	1.6 µL de 25 mM
dNTPs	1.25 µL de 10 mM	1.25 µL de 10 mM
Tampão	1.25 µL de tampão 10x (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄)	1.25 µL de tampão 10x (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄)
Primer	1.5 µL do <i>primer</i> 16S A e 1.5 µL do <i>primer</i> 16S B	1.5 µL do <i>primer</i> LCO 1490 e HCO 2198
DNA	1 µL (30 – 50 ng/µL)	1 µL (30 – 50 ng/µL)
Taq	0.3 µL de 1 U	0.3 µL de 1 U

Tabela 2: Localidades de amostragem de *Pristimantis latro* e respectivos números de amostras para genes mitocondriais (16S e COI).

Local.	Localidade	Coordenadas	16S	COI
1	Santarém (PA)	2° 1'24.44"S; 51°36'4.80"O	3	3
2	Medicilândia (PA)	3°26'37.93"S; 52°53'35.26"O	10	8
3	Brasil Novo (PA)	3°40'14.23"S; 52°30'51.87"O	1	1
4	Altamira (PA)	3°13'24.85"S; 52°14'22.74"O	16	8
5	Volta Grande (PA)	3°23'12.95"S; 51°50'14.23"O	12	10
6	S. José Porfírio (PA)	2°34'7.60"S; 51°50'54.90"O	3	2
7	Anapu (PA)	3° 9'28.15"S; 51°27'51.67"O	7	4
8	Marabá (PA)	5°22'50.86"S; 49° 7'46.12"O	-	2
Total			52	38

Tabela 3: Distância genética p não-corrigida (em %) COI entre as localidades de amostragem de *P. latro*; 1) *P. latro* (Altamira); 2) *P. latro* (Brasil Novo); 3) *P. latro* (Medicilândia); 4) *P. latro* (Santarém); 5) *P. latro* (Vitória do Xingu); 6) *P. latro* (Anapu); 7) *P. latro* (Senador José Porfirio); 8) *P. fenestratus* (Borba); 9) *P. fenestratus* (Manaus); 10) *P. latro* (Marabá); 11) *Pristimantis* sp; (Maranhão); 12) *P. zeuctotylus* (Monte Alegre); 13) *P. bipunctatus* (Peru); 14) *P. vilarsi* (Colômbia).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0,2													
3	0,4	0,2												
4	2,0	2,2	2,2											
5	0,1	0,4	0,5	1,9										
6	3,1	3,4	3,4	3,1	3,0									
7	2,9	3,1	3,2	4,6	2,8	3,5								
8	20,2	20,4	20,3	19,7	20,1	19,6	20,5							
9	20,4	20,7	20,5	19,7	20,3	21,1	21,8	12,8						
10	6,0	6,2	6,1	5,1	5,8	5,9	8,3	20,0	19,9					
11	11,1	11,3	11,3	10,1	10,9	11,7	13,0	19,7	20,2	10,3				
12	21,0	21,0	21,0	21,3	21,0	21,9	22,6	21,6	21,4	21,7	19,7			
13	20,0	20,1	20,1	20,7	19,9	21,2	22,1	20,5	21,1	20,5	20,8	18,6		
14	23,0	23,1	23,1	22,6	22,9	23,1	25,0	21,7	20,8	22,2	21,3	18,5	17,6	

Tabela 4: Distância genética p não-coriigida (em %) 16S entre as localidades de amostragem de *P. latro*; 1) *P. latro* (Santarém); 2) *P. latro* (Anapu); 3) *P. latro* (Altamira); 4) *P. latro* (Senador); 5) *P. latro* (Altamira); 6) *P. latro* (Medicilândia); 7) *P. latro* (Brasil Novo); 8) *P. fenestratus* (Manaus); 9) *P. psamaipatae* (Bolívia); 10) *P. koehleri* (Bolívia); 11) *P. chiastonotus* (Guiana Francesa) 12) *P. fenestratus* (Borba); 13) *P. fenestratus* (Bolívia); 14) *P. fenestratus* (Borba); 15) *P. vilarsi* (Colômbia); 16) *P. conspicillatus* (Equador); 17) *P. zeeuctotylus* (Monte Alegre); 18) *P. achatinus* (Colômbia); 19) *P. zeeuctotylus* (Obidos); 20) *P. zeeuctotylus* (Alenquer); 21) *P. skydmainos* (Peru).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2	1,0																				
3	1,5	1,0																			
4	1,5	1,0	0,0																		
5	1,6	1,2	0,1	0,1																	
6	1,7	1,2	0,3	0,3	0,3																
7	1,7	1,2	0,3	0,3	0,2	0,1															
8	8,5	8,1	7,6	7,6	7,8	7,9	7,9														
9	8,5	8,2	8,2	8,2	8,3	8,4	8,5	5,0													
10	9,0	9,3	8,7	8,7	8,8	9,0	9,0	2,4	5,0												
11	9,1	8,7	7,7	7,7	7,8	8,0	8,0	9,2	9,1	8,6											
12	9,4	8,9	9,0	9,0	8,9	8,7	8,7	2,0	4,7	1,5	8,8										
13	9,4	9,1	8,5	8,5	8,7	8,8	8,8	3,0	5,6	2,6	7,9	2,8									
14	11,1	11,4	11,4	11,4	11,5	11,6	11,7	12,0	10,8	10,5	11,8	11,1	12,2								
15	11,4	11,1	11,1	11,1	11,2	11,4	11,4	13,7	12,0	13,7	14,4	13,9	14,4	16,6							
16	12,2	11,4	11,4	11,4	11,5	11,6	11,7	12,0	10,8	11,4	12,9	11,9	11,7	12,8	11,7						
17	13,7	14,0	14,0	14,0	14,1	14,3	14,3	13,7	12,8	13,7	14,2	13,9	12,9	16,6	9,6	12,2					
18	13,7	13,3	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8	13,6	13,8	13,0	15,4	13,5	13,8	17,1	13,4	8,6	15,6				
19	14,0	14,3	14,3	14,3	14,4	14,6	14,6	14,2	13,3	14,2	14,5	14,4	13,4	17,1	9,5	12,1	0,8	15,4			
20	14,1	14,5	14,4	14,4	14,6	14,8	14,7	14,2	13,3	14,1	14,6	14,4	13,3	17,1	9,5	12,1	0,7	15,5	0,2		
21	16,9	16,5	15,7	15,7	15,9	16,0	16,0	13,7	13,1	14,0	15,5	14,2	13,6	18,4	13,7	10,2	14,6	14,3	14,5	14,4	

Figuras
Figura 1:

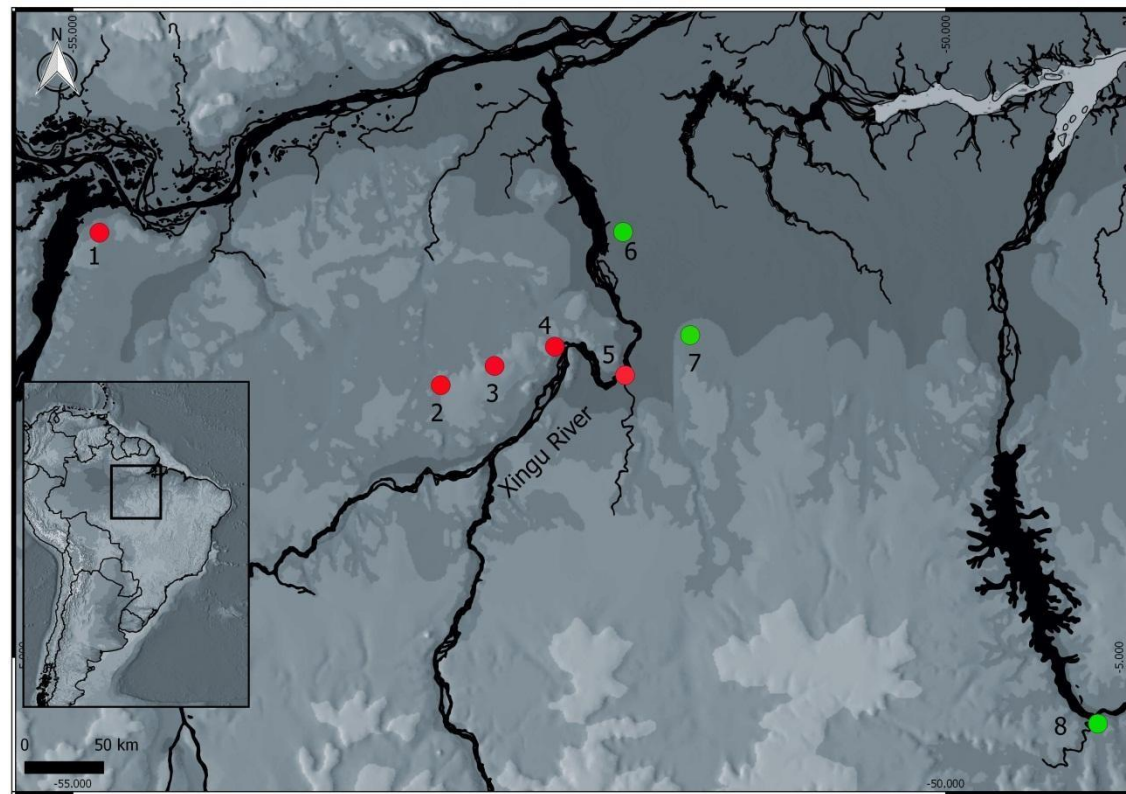


Figura 2:

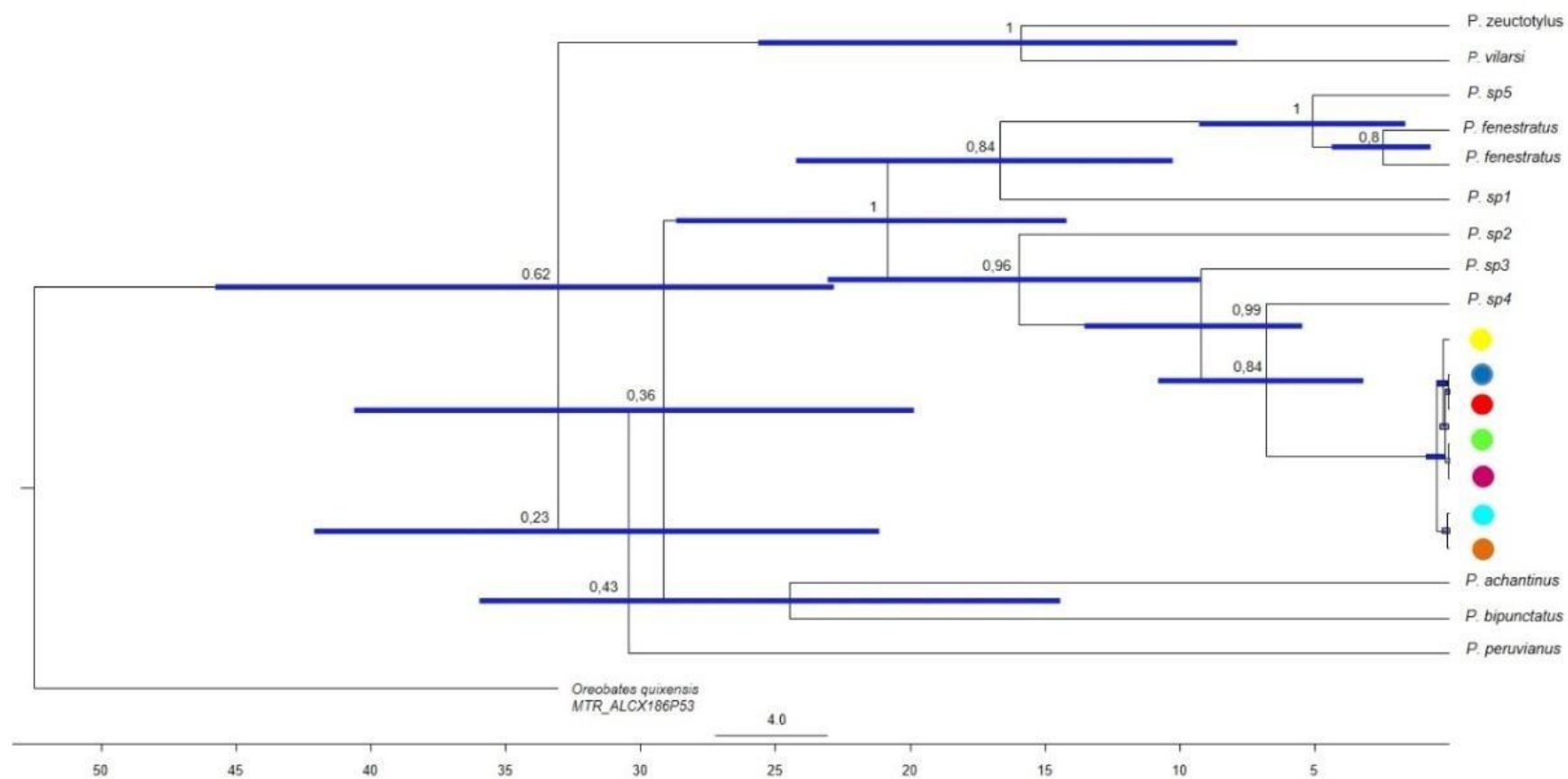
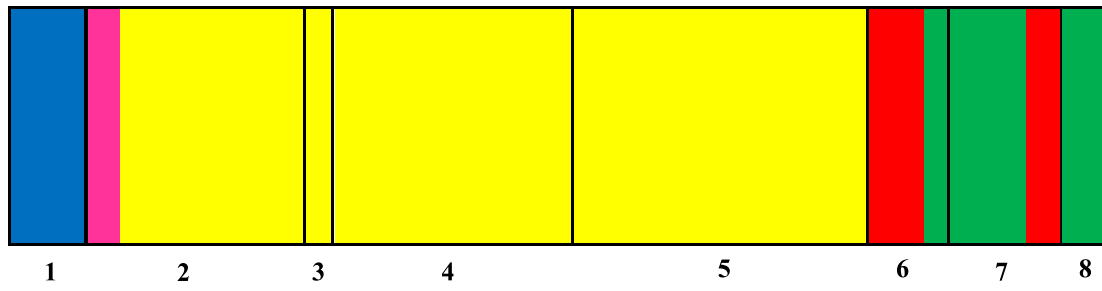
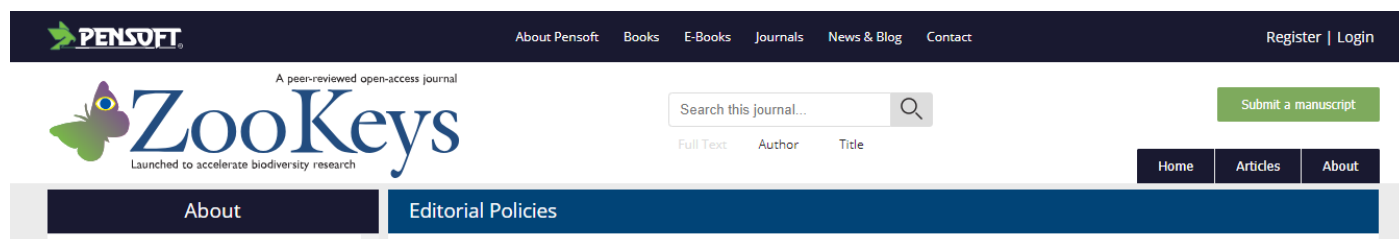


Figura 3:



ANEXO

ANEXO – I: Normas da Revista



Title: The title should be in a sentence case (only scientific, geographic or person names should be with a first capital letter, i.e. *Elater ferrugineus* L., Germany, etc.), and should include an accurate, clear and concise description of the reported work, avoiding abbreviations. The higher taxa within the title should be separated with commas and not with a semicolon, e.g.: (Coleoptera, Elateridae, Elaterini).

Authors and Affiliations: Provide the complete names of all authors, and their addresses for correspondence, including e.g., institutional affiliation (e.g. university, institute), location (street, boulevard), city, state/province (if applicable), and country. One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the individual contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and their affiliations should be listed after the **Acknowledgements section**.

Abstract and Keywords: Please have your abstract and keywords ready for input into the submission module. Keywords should be in alphabetical order and ideally differ from the words used in the title.

Body Text: All papers should be in grammatically correct English. Non-native English speaking authors are required to have their manuscripts checked by a native English speaker prior to submission. Use either British/Commonwealth or American English provided that the language is consistent within the paper. A manuscript must be written with precision, clarity, and economy. The voice - active or passive - and the tense used should be consistent throughout the manuscript. Avoid the use of parenthetical comments and italics or bold for emphasis. This journal discourages the use of quotation marks except for direct quotations, words defined by the author, and words used in unusual contexts. Short quotations should be embedded in the text and enclosed in double quotation marks (""). Long quotations should be on a separate line, italicized, but without quotation marks. Single quotation marks are to be used only for a quotation that occurs within another quotation.

Spacing, Fonts, and Page Numbering: Single-space all material (text, quotations, figure legends, tables, references, etc.). Separate paragraphs with a blank line. Use a 12-point font (preferably Times New Roman or Arial).

Capitals: First capital letters should be used only in the beginning of a sentence, in proper names and in headings and subheadings, as well as to indicate tables, graphs and figure/s within the text. Software programmes should be written with capital letters (e.g., ANOVA, MANOVA, PAUP).

Italicization/Underlining: Scientific names of species and genera, long direct quotations and symbols for variables and constants (except for Greek letters), such as *p*, *F*, *U*, *T*, *N*, *r*, but not for *SD* (standard deviation), *SE* (standard error), *DF* (degrees of freedom) and *NS* (non significant) should be italicized. These symbols in illustrations and equations should be in italics to match the text. Italics should not be used for emphasis, and not in abbreviations such as *e.g.*, *i.e.*, *et al.*, *etc.*, *cf.* Underlining of any text is not acceptable.

Abbreviations: Abbreviations should be followed by „.' (full stop or period; for instance: *i.e.*, *e.g.*, *cf.*, *etc.*). Note that you shouldn't add a full stop at the end of abbreviated words if the last letter of the abbreviation is the same as the last letter of the full word. For example, you should abbreviate "Eds", "Dr", "Mr" without full stop at the end. All measures, for instance *mm*, *cm*, *m*, *s*, *L*, should be written without full stop.

On the use of dashes: (1) Hyphens are used to link words such as personal names, some prefixes and compound adjectives (the last of which vary depending on the style manual in use) (2) En-dash or en-rule (the length of an 'n') is used to link spans. In the context of our journal en-dash should be used to link numerals, sizes, dates and page numbers (*e.g.*, 1977– 1981; figs 5–7; pp. 237–258); geographic or name associations (Murray–Darling River; a Federal–State agreement); and character states combinations such as long–pubescent or red– purple. (3) Em-dash or em-rule (the length of an 'm') should be used rarely, only for introducing a subordinate clause in the text that is often used much as we use parentheses. In contrast to parentheses an em-dash can be used alone. En-dashes and em-dashes should not be spaced.

Footnotes: Avoid footnotes in the body text of the manuscript. It is always possible to incorporate the footnote into the main text by rewording the sentences, which greatly facilitates reading. Additionally, footnotes are not always handled well by the journal software, and their usage may cause a failure of submission. Footnotes are acceptable only below tables; instead of numbers, please use (in order): †, ‡, §, ¶, #, ††, ‡‡, §§, ||, ¶¶, ##.

Geographical coordinates: It is strongly recommended to list geographical coordinates as taken from GPS or online gazetteer, or georeferencer. Geographical coordinates must be listed in one of the following formats:

Definition: The locality consists of a point represented by coordinate information in the form of latitude and longitude. Information may be in the form of

- Degrees, Minutes and Seconds (DMS),
- Degrees and Decimal Minutes (DDM), or
- Decimal Degrees (DD).

Records should also contain a hemisphere (E or W and N or S) or, with Decimal Degrees, minus (–) signs to indicate western and/or southern hemispheres.

Examples:

- Example 1: 36° 31' 21" N; 114° 09' 50" W (DMS)

- Example 2: 36° 31.46"N; 114° 09.84"W (DDM)
- Example 3: 36.5243° S; 114.1641° W (DD)
- Example 4: -36.5243; -114.1641 (DD using minus signs to indicate southern and western hemispheres)

Note on accuracy: Because GPS units are very commonly used today to record latitude/longitude, many authors simply give the GPS readings for their localities. However, these readings are much too accurate. For example, a GPS unit might give the latitude in decimal seconds as 28°16'55.87"N. Since one second of latitude is about 30 m on the ground, the second figure after the decimal in 55.87 represents 30 cm, yet a typical handheld GPS unit is only accurate at best to a few metres.

We therefore recommend two ways to report GPS-based locations. If you give the GPS reading without rounding off, make sure you include an uncertainty figure as a context for the over-accurate GPS reading. We recommend the Darwin Core definition of uncertainty (<http://rs.tdwg.org/dwc/terms/index.htm#coordinateUncertaintyInMeters>):

"The horizontal distance (in meters) from the given decimalLatitude and decimalLongitude describing the smallest circle containing the whole of the Location."

If you only give the GPS reading, please round it off to an implied precision appropriate to the error in the measurement, or to the extent of the area sampled. We suggest rounding off

- to the nearest second in degree-minute-second format (28°16'56"N), which implies roughly ± 25 -30 m at middle latitudes
- to four decimal places in decimal degree format (28.2822°N), which implies roughly ± 10 -15 m at middle latitudes
- to two decimal places in decimal minute format (28°16.93'N), which implies roughly 15-20 m at middle latitudes

Altitude: Many GPS users simply record the elevation given by their GPS unit. However, GPS elevation is NOT the same as elevation above sea level. GPS units record the elevation above a mathematical model of the earth's surface. The difference between this elevation and elevation above sea level can be tens of metres. In any case, the accuracy of a GPS elevation is often the same as the usual accuracy in horizontal position, so a GPS elevation such as '753 m' is much too accurate and should be rounded off to 'ca 750 m'.

We **strongly recommend** the use of Example 2 (the DDM format). The other three are also possible but will be recalculated to DDM during the process of online mapping from the HTML version of the paper.

The only restriction on format is in creating a KML (Keyhole Markup Language) file. KML latitudes and longitudes must be in the DD format shown above in Example 4.

Please also consider submitting a **table of localities** with your manuscript, either as a spreadsheet or in CSV text format. By doing so you will make your specimen localities much more easily available for use in biodiversity databases and geospatial investigations. The geospatial table will be put online as supplementary material for your paper. A minimum table will have three fields: species (or subspecies) name, latitude and longitude. A full table will

have the same data for each specimen lot as appears in the text of your paper. Please check latitude/longitude carefully for each entry.

Units: Use the International System of Units (SI) for measurements. Consult Standard Practice for Use of the International System of Units (ASTM Standard E-380-93) for guidance on unit conversions, style, and usage.

Statistics: Use leading zeroes with all numbers, including probability values (e.g., $P < 0.001$). For every significant F-statistic reported, provide two df values (numerator and denominator). Whenever possible, indicate the year and version of the statistical software used.

Web (HTML) links: Authors are encouraged to include links to other Internet resources in their article. This is especially encouraged in the reference section. When inserting a reference to a web-page, please include the **http://** portion of the web address.

Supplementary files: Larger datasets can be uploaded separately as Supplementary Files. Tabular data provided as supplementary files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls), as an OpenOffice spreadsheets (.ods) or comma separated values file (.csv). As with all uploaded files, please use the standard file extensions.

Headings and subheadings: Main headings: The body text should be subdivided into different sections with appropriate headings. Where possible, the following standard headings should be used: **Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References**. These headings need to be in bold font on a separate line and start with a first capital letter. Please do not number headings or subheadings.

- **Introduction** – The motivation or purpose of your research should appear in the Introduction, where you state the questions you sought to answer, and then provide some of the historical basis for those questions.
- **Methods** – Provide sufficient information to allow someone to repeat your work. A clear description of your experimental design, sampling procedures, and statistical procedures is especially important in papers describing field studies, simulations, or experiments. If you list a product (e.g., animal food, analytical device), supply the name and location of the manufacturer. Give the model number for equipment used. Supply complete citations, including author (or editor), title, year, publisher, and version number, for computer software mentioned in your article.
- **Results** – Results should be stated concisely and without interpretation.
- **Discussion** – Focus on the rigorously supported aspects of your study. Carefully differentiate the results of your study from data obtained from other sources. Interpret your results, relate them to the results of previous research, and discuss the implications of your results or interpretations. Point out results that do not support speculations or the findings of previous research, or that are counter-intuitive. You may choose to include a Speculation subsection in which you pursue new ideas suggested by your research, compare and contrast your research with findings from other systems or other disciplines, pose new questions that are suggested by the results of your study, and suggest ways of answering these new questions.

- **Conclusion** – This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.
- **References** – The list of References should be included after the final section of the main article body. A blank line should be inserted between single-spaced entries in the list. Authors are requested to include links to online sources of articles, whenever possible!

Where possible, the standard headings should be used in the order given above. Additional headings and modifications are permissible.

Subordinate headings: Subordinate headings (e.g. Field study and Simulation model or Counts, Measurements and Molecular analysis), should be left-justified, italicized, and in a regular sentence case. All subordinate headings should be on a separate line.

English Language Editing

This journal has well-defined policies for English language editing. Involving mandatory outsourced language editing services would considerably increase the price of the Article Processing Charges, which would become an additional obstacle for persons and institutions to publish in the journal. Therefore we rely both on the conscience of our authors to provide stylistically written texts and our editors and reviewers to filter out badly written manuscripts.

Authors are required to have their manuscripts edited by a native English speaker **BEFORE** submission. Authors have to confirm by checking a tick box in the submission process that they have followed the above requirement:

The text is checked by a native English speaker, duly acknowledged in the manuscript. I am aware that non-edited manuscripts could be rejected prior to peer-review.

The submission process includes an option to request a professional linguistic and copy editing at a price of **EURO 15 per 1800 characters**:

The text has not been checked by a native speaker and I request thorough editing prior to peer review at a price. I agree to cover the costs even if my manuscript is not accepted for publication.

The authors are **NOT** obliged to use our linguistic services, but they must ensure that their manuscripts have been checked by a native speaker.

Citations and References

Citations within the text: Before submitting the manuscript, please check each citation in the text against the References and vice-versa to ensure that they match exactly. Citations in the text should be formatted as follows: Smith (1990) or (Smith 1990), Smith et al. (1998) or (Smith et al. 1998) and (Smith et al. 1998, 2000, Brock and Gunderson 2001, Felt 2006).

References: It is important to format the references properly, because all references will be linked electronically as completely as possible to the papers cited. It is desirable to add a DOI (digital object identifier) number for either the full-text or title and abstract of the article as an addition to traditional volume and page numbers. If a DOI is lacking, it is recommended to add a link to any online source of an article. Please use the following style for the reference list (or download the Pensoft EndNote style): here

Published Papers:

Polaszek A, Alonso-Zarazaga M, Bouchet P, Brothers DJ, Evenhuis NL, Krell FT, Lyal CHC, Minelli A, Pyle RL, Robinson N, Thompson FC, van Tol J (2005) ZooBank: the open-access register for zoological taxonomy: Technical Discussion Paper. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 62: 210-220.

Accepted Papers:

Same as above, but "in press" appears instead the year in parentheses.

Electronic Journal Articles:

Mallet J, Willmott K (2002) Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology and Evolution* 18 (2): 57-59. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00061-7).

Paper within conference proceedings:

Orr AG (2006) Odonata in Bornean tropical rain forest formations: Diversity, endemism and applications for conservation management. In: Cordero Rivera A (Ed.) *Forest and Dragonflies. Fourth WDA International Symposium of Odonatology, Pontevedra (Spain), July 2005*. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow, 51-78.

Book chapters:

Mayr E (2000) The biological species concept. In: Wheeler QD, Meier R (Eds) *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. Columbia University Press, New York, 17-29.

Books:

Goix N, Klimaszewski J (2007) *Catalogue of Aleocharine Rove Beetles of Canada and Alaska*. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow, 166 pp.

Book with institutional author:

International Commission on Zoological Nomenclature (1999) *International code of zoological nomenclature*. Fourth Edition. London: The International Trust for Zoological Nomenclature.

PhD thesis:

Dalebout ML (2002) *Species identity, genetic diversity and molecular systematic relationships among the Ziphiidae (beaked whales)*. PhD thesis, Auckland, New Zealand: University of Auckland.

Link/URL:

BBC News: Island leopard deemed new species <http://news.bbc.co.uk/>

Citations of Public Resource Databases: It is highly recommended all appropriate datasets, images, and information to be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be

provided in parentheses after the entity on first use. Examples of such databases include, but are not limited to:

- ZooBank (www.zoobank.org)
- Morphbank (www.morphbank.net)
- Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)
- BOLD (www.barcodinglife.org)

Providing accession numbers to data records stored in global data aggregators allows us to link your article to established databases, thus integrating it with a broader collection of scientific information. Please hyperlink all accession numbers through the text or list them directly after the References in the online submission manuscript.

All journal titles should be spelled out completely and should **NOT** be italicized.

Provide the publisher's name and location when you cite symposia or conference proceedings; distinguish between the conference date and the publication date if both are given. Do not list abstracts or unpublished material in the References. They should be quoted in the text as personal observations, personal communications, or unpublished data, specifying the exact source, with date if possible. When possible, include URLs for articles available online through library subscription or individual journal subscription, or through large international archives, indexes and aggregators, e.g., PubMedCentral, Scopus, CAB Abstracts, etc. URLs for pdf articles that are posted on personal websites only should be avoided.

Authors are encouraged to cite in the References list the publications of the original descriptions of the taxa treated in their manuscript.

Illustrations, Figures and Tables

Figures and illustrations are accepted in the following image file formats:

EPS (preferred format for diagrams)

TIFF (at least 300dpi resolution, with LZW compression)

PNG (preferred format for photos or images)

JPEG (preferred format for photos or images)

GIF

BMP

SVG

Should you have any problems in providing the figures in one of the above formats, or in reducing the **file below 20 MB**, please contact the Editorial Office at journals@pensoft.net

Figure legends: All figures should be referenced consecutively in the manuscript; legends should be listed consecutively immediately after the References. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals – i.e. Figure 1, 2, 3 etc.); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Illustrations of measurable morphological traits should bear mute scale bars, whose real size is to be given in the figure captions.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

On the use of Google Maps

Please do **NOT** use maps produced by Google Earth and Google Maps in your publications, as these are subject of copyright! Here is an excerpt from Google Maps/Earth Additional Terms of Service:

Restrictions on Use. Unless you have received prior written authorization from Google (or, as applicable, from the provider of particular Content), you must not: (a) copy, translate, modify, or make derivative works of the Content or any part thereof; (b) redistribute, sublicense, rent, publish, sell, assign, lease, market, transfer, or otherwise make the Products or Content available to third parties; (c) reverse engineer, decompile or otherwise attempt to extract the source code of the Service or any part thereof, unless this is expressly permitted or required by applicable law; (d) use the Products in a manner that gives you or any other person access to mass downloads or bulk feeds of any Content, including but not limited to numerical latitude or longitude coordinates, imagery, and visible map data; (e) delete, obscure, or in any manner alter any warning or link that appears in the Products or the Content; or (f) use the Service or Content with any products, systems, or applications for or in connection with (i) real time navigation or route guidance, including but not limited to turn- by-turn route guidance that is synchronized to the position of a user's sensor-enabled device; or (ii) any systems or functions for automatic or autonomous control of vehicle behavior; (g) use the Products to create a database of places or other local listings information.

Tables: Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Small tables can be embedded within the text, in portrait format (note that tables on a landscape page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review. Do not use tabs to format tables or separate text. All columns and rows should be visible, please make sure that borders of each cell display as black lines. Colour and shading should not be used; neither should commas be used to indicate decimal values. Please use a full stop to denote decimal values (i.e., 0.007 cm, 0.7 mm).

Larger datasets can be uploaded separately as Supplementary Files. Tabular data provided as supplementary files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls), as an OpenOffice

spreadsheets (.ods) or comma separated values file (.csv). As with all uploaded files, please use the standard file extensions.

Taxonomic Treatments

General guidelines

By publishing in this journal you are already creating a modern taxonomic product that is more accessible than previous print only works. The following guidelines are provided to ensure that other elements of the work follow modern standards and enable the full advantage of the ARPHA platform.

- Include unique specimen identifiers for type material. Unique identifiers are for example museum collections specimen IDs. Unique identifiers can be provided also by international taxon-based databases that do not indicate ownership, such as AntWeb.org for ants, for example.
- Holotype should not deposited in private collections.
- Include images of type material or representative species. Imaging is not a technical problem anymore and is provided by many institutional collections or international taxon-based services (again, AntWeb.org is a good example as they will provide free imaging of ant type material if necessary).
- Specimen data of material examined provided as auxiliary file as a .txt or .csv file or table at end of document, based on the Darwin Core standard. Specimen file should include unique specimen identifiers when possible.
- Include latitude, longitude, elevation, habitat, microhabitat information of primary type material. For format of geographical coordinates see section "Main text" above.

Provide dichotomous key of taxa or related taxa (i.e. species group) or links to online-based keys.

Single species descriptions should be clearly justified with regard as to why a more detailed larger scale, comparative revision was not conducted. For descriptions of single species see also section "Focus and Scope".

Sequence data

Manuscripts containing novel amino acid sequences (e.g. primer sequences) will only be accepted if they carry an International Nucleotide Sequence Databases (INSD) accession number from the European Biology Laboratory (EMBL), GenBank Data Libraries (GenBank) or DNA Data Bank of Japan (DDBJ). We strongly recommend that authors include institutional catalog numbers for specimens preserved in collections, and information identifying sequences that are derived from type specimens (see below) when they deposit data in genetic databanks. A summary table with the INSD accession [catalog] numbers should be included in either Materials and Methods or Data Resources section of the paper. If specimens were not vouchered (tissued specimens should be vouchered whenever possible!), collection locality data and possibly photographs of tissue specimens must be provided. A nomenclature for genetic sequences for types and confidently identified nontype specimens has been proposed by Chakrabarty et al. (2013); a sequence from a holotype is identified as genseq-1, one from a paratype is identified as genseq-2, one from a topotype is genseq-3, etc. The genetic marker(s) used should also be incorporated into the nomenclature (e.g. genseq-2 COI).

Examples

Table 1. Ranking Sequence Reliability. Ranking of source materials of genetic sequences based on reliability of taxonomic identification. Examples of the source material are listed in the third column with the last column providing the corresponding GenSeq nomenclature (after Chakrabarty et al. (2013)).

Reliability Ranking	Source Materials	Examples	Corresponding GenSeq Nomenclature
Highest 1st	Primary Types	Holotype, Lectotype, Syntype, Isosyntype, Neotype, Isotype	genseq-1
2nd	Secondary Types	Paratype, Paralectotypes, etc.	genseq-2
3rd	Topotypes (vouchered), or non-type specimens listed in original description or redescription	Topotype, Non-type specimen listed in original description or redescription	genseq-3
4th	Collections-vouchered non-types (not from original description or redescription)	Vouchered specimen	genseq-4
5th	Photo voucher only	No specimen voucher but photo voucher available	genseq-5
Lowest	No voucher	Non-vouchered	No classification

Table 2. Example Reporting Table. Examples of how links between genetic sequences and vouchers in institutional collections could be displayed as a table in publications reporting new sequences.

Species	Specimen Catalog #	GenBank #		GenSeq Nomenclature
		COI	ND1	
<i>Typhleotris mararybe</i>	LSUMZ 13636 (holotype)	HM590594	HM590606	genseq-1 COI, ND1

<i>Paretroplus tsimoly</i>	AMNH 229558 (paratype)	JZ590596	NA	genseq-2 COI
<i>Nandopsis haitiensis</i>	UMMZ 236321 (topotype)	BK590595	BK590607	genseq-3 COI, ND1
<i>Halieutichthys intermedius</i>	FMNH 96353 (non-type specimen voucher)	AY722169	AY722306	genseq-4 COI, ND1
<i>Equulites absconditus</i>	NMNH 12345PV2 (photo voucher)	NA	BG34621	genseq-5 ND1

International Code of Zoological Nomenclature

This journal will publish papers that strictly adhere to the rules of the last edition of the International Code of Zoological Nomenclature and its amendment. Authors are also advised to follow all recommendations of the Code and to consult the guidelines below, as well as ICZN's manual Best practice in the use of the scientific names of animals prior to submitting the manuscript.

General: Each **first mentioning** of an animal species name within the text must be provided with author(s)' name(s). **Year of publication** of an animal species should be given in taxonomic revisions with quotation of the work providing the original species' description in the list of references.

New names: When new taxonomic acts are proposed, they should be explicitly indicated as being new by adding the respective abbreviation after the taxon name i.e., sp. n., comb. n., nomen n. Authors of newly described taxa should be given any time the taxon is mentioned, if different from the publication authors.

Examples:

- Genus X-us Smith, new genus (author(s) of the publication and authority (-ies) of the taxon is/are identical);
- X-us albus Jones & Peters, new species (the publication is authored by persons different in composition or combination from the authority (-ies) of the taxon itself, e.g. Smith, Jones & Peters or Peters & Jones).

We highly recommend that authors of new species are also included as co-authors of the work where the taxa are described. If the authors of the work do not want to include the authors of the taxonomic name then to be absolutely certain that the authority for the name is unequivocal there should be a statement in the work saying that these authors (of the name) are responsible for making the name available under the code (Article 50.1.2, etc.) i.e. they are responsible for coining the name and for satisfying all other criteria for availability.

New family-group names: Although all family group names are derived/based on their type genus, the type genus is to be compulsorily designated in any description of a family-group name published after 31st December 1999 (Article 16.2). It is not sufficient that the type genus is mentioned as belonging to the new family-group name; it must be stated that this is the type genus. We recommend a single type line as: Type-genus: *Musca* Linnaeus, 1758.

New genus-group names: The origin ("etymology", or "derivatio nominum") of name and its gender should be indicated. The type-species and the character of the proposed taxonomic act should be specified for new genus-group names. The type species name should be given in its original combination with an author and year. If the type species is now considered a junior synonym there need to be a clear mention of that. The fixation type should derive from the International Code of Zoological Nomenclature (see Articles 68 & 69; original designation, monotypy, absolute tautonymy, Linnaean tautonymy, subsequent monotypy, subsequent designation).

Example:

- *Sympycnus* Loew

Type-species: *Porphyrops annulipes* Meigen, 1824 by subsequent designation of Coquillett (1910: 610) = *pulicarius* Fallen, 1823.

New species-group names: According to the ICZN Art. 11.9, but also Art. 11.3 the origin "etymology", or "derivatio nominum") new species-group names should be supplemented by information on whether the epithet is an 1) adjective or participle in the nominative singular; 2) noun in the nominative singular; 3) a noun in the genitive case; 4) an adjective used a substantive in the genitive case; or 5) an arbitrary combination of letters (ICZN Art. 11.3). For **species-group names**, there are two separate statements of type information that are needed:

- the statement of species' type locality – that is the exact place whence the primary type origins, including exact collecting dataplace with geographical coordinates, geographical or political unit (Area/ District/ State) and country; also, if possible, supplementary locality information should be included – habitat type, method of collecting, date, collector's names, host name (for parasites), etc.
- there should be a separate statement about the type specimen, exact quotation of its original label, condition of specimen (dry pinned, in alcohol, slide, fossil, etc.) and repository (organization's name and city).

Examples:

For a **new species**:

- **Type-locality:** USA, Virginia: Fairfax County, Kingstowne, 38°46'N, 77°07'W, broad-leaf forest, under bark, 10 July 2000, J. Smith leg.
- **Type-specimen:** Holotype male, pinned, with genitalia in a separate microvial. Original label: "USA, VA, Fairfax, Kingstowne, 38°46'N, 77°07'W, 12 Oct 2003, BJ & FC Thompson" "USNM ENT 00033805" [Code 49 barcode], "HOLOTYPE / *Xylota* / x-us / Thompson [red handwritten label].

For a **previously described species**:

Lectotype male, pinned ... [details] here designated to fix the concept of *X-us albus* Jones and to ensure the universal and consistent interpretation of the same. Or ... [details then] by designation of Smith (1976: 999).

Previously published names: For a **previously published name**, please provide the year of description. Also use the parentheses convention for subsequent new combinations.

[Etymology]

Authors of new species name should state exactly what the epithet is in terms of the ICZN, as outlined in Article 11.9.1.1 to 11.9.1.4 as well as 11.3. A name may be a word in or derived from Latin, Greek or any other language (even one with no alphabet), or be formed from such a word. In short, a name can be declared as arbitrary combination (the best solution) or must be or be treated as:

I) a word of two or more letters, or a compound word, and, if a Latin or latinized word must be, or be treated as:

1. an adjective or participle in the nominative singular (as in *Echinus esculentus*, *Felis marmorata*, *Seioptera vibrans*), or
2. a noun in the nominative singular standing in apposition to the generic name (as in *Struthio camelus*, *Cercopithecus diana*), or
3. a noun in the genitive case (e.g. *rosae*, *sturionis*, *thermopylarum*, *galliae*, *sanctipauli*, *sanctae-helenae*, *cuvieri*, *merianae*, *smithorum*), or
4. an adjective used as a substantive in the genitive case and derived from the specific name of an organism with which the animal in question is associated (as in *Lernaeocera lusci*, a copepod parasitic on *Trisopterus luscus*).

II) An adjectival species-group name proposed in Latin text but written otherwise than in the nominative singular because of the requirements of Latin grammar is available provided that it meets the other requirements of availability, but it is to be corrected to the nominative singular if necessary.

Arranging sections within species treatments (sections in square brackets are requested for new descriptions only!):

[Name]

[Material]

- [Type material]
- Other material

[Diagnosis]

[Description]

[Etymology]

Distribution

Ecology (including phenology)

Conservation status (optional, we encourage authors to follow the IUCN categories and criteria, please see http://www.iucnredlist.org/static/categories_criteria_3_1#critical))

Discussion (optional, but very desirable)

Materials and Methods

In line with responsible and reproducible research, as well as FAIR (Findability, Accessibility, Interoperability and Reusability) data principles, we highly recommend that authors describe in detail and deposit their science methods and laboratory protocols in the open access repository protocols.io.

Once deposited on protocols.io, protocols and methods will be issued a unique digital object identifier (DOI), which could be then used to link a manuscript to the relevant deposited protocol. By doing this, authors could allow for editors and peers to access the protocol when reviewing the submission to significantly expedite the process.

Furthermore, an author could open up his/her protocol to the public at the click of a button as soon as their article is published.

Stepwise instructions:

1. Prepare a detailed protocol via protocols.io.
2. Click **Get DOI** to assign a persistent identifier to your protocol.
3. Add the DOI link to the Methods section of your manuscript prior to submitting it for peer review.
4. Click **Publish** to make your protocol openly accessible as soon as your article is published (optional).

Update your protocols anytime.

Supplementary Files

Online publishing allows an author to provide datasets, tables, video files, or other information as supplementary information, greatly increasing the impact of the submission. Uploading of such files is possible in Step 6 of the submission process.

The maximum file size for each Supplementary File is 20 MB.

The Supplementary Files will not be displayed in the printed version of the article but will exist as linkable supplementary downloadable files in the online version.

While submitting a supplementary file the following information should be completed:

- File format (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

All supplementary files should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'See supplementary file 1: Movie 1' for the original data used to perform this analysis.

Ideally, the supplementary files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. Suitable file formats are:

For supplementary documentation:

- **PDF** (Adobe Acrobat)

For animations:

- **SWF** (Shockwave Flash)

For movies:

- **MOV** (QuickTime)
- **MPG** (MPEG)

For datasets:

- **XLS** (Excel spreadsheet)
- **CSV** (Comma separated values)
- **ODS** (OpenOffice spreadsheets)

As for images, file names should be given in the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard file extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).