



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso

Relações Filogenéticas das espécies do grupo de *Amphisbaena darwini* (Squamata: Amphisbaenidae) da ecorregião Savana Uruguaia com base em marcadores moleculares

Rodrigo Petry Eltz

Orientador: Márcio Borges-Martins

Porto Alegre, Novembro de 2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo suporte durante a graduação.

Ao Professor Márcio, pela orientação, pela idealização do trabalho e por proporcionar a realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Herpetologia, em especial à Renata que me ajudou muito durante a realização desse trabalho, e sem a qual o mesmo não seria possível.

Às alunas do PPGBM Carla e Paula pela ajuda com as análises moleculares e especialmente à Gislene que me ensinou quase tudo que eu sei sobre genética.

Ao Felipe Grazziotin por ter auxiliado na metodologia do trabalho.

À Renata Fagundes por ter auxiliado nos procedimentos do laboratório.

À curadora da coleção herpetológica do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), professora Gláucia, por ter disponibilizado espécimes para análise.

A todos os amigos da Biologia, pela companhia e amizade ao longo desses cinco anos.

À Fundação Grupo O Boticário e CNPq – Programa PROTAX, pelo financiamento que possibilitou a realização do trabalho.

Ao CNPq pelos equipamentos e financiamento parcial fornecidos pelo proc. 479412/2008-1, coordenado por Luiz R. Malabarba.

APRESENTAÇÃO

O trabalho é apresentado na forma de artigo científico, segundo as normas da revista ZOOTAXA para submissão de trabalho (anexo I).

Relações Filogenéticas das espécies do grupo de *Amphisbaena darwini* (Squamata: Amphisbaenidae) da ecorregião Savana Uruguaia com base em marcadores moleculares

RODRIGO P. ELTZ¹, RENATA PEREZ¹, MÁRCIO B. MARTINS¹

¹Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

contato: rodrigo.eltz@ufrgs.br

ABSTRACT

Amphisbaenia is a monophyletic group which contains six families. The relations among the species within the group are scarcely known and their nomenclature and taxonomy had been revised recently. In the family Amphisbaenidae there is a putative group of species associated with *Amphisbaena darwini* which is represented by approximately eight *taxa*, with unclear relations, occurring from the Northeast region of Brazil throughout Argentina and Uruguay. Some of these species have relatively sympatric distributions, especially along the ecoregions Savana Uruguaia and Mata Atlântica. This association was proposed in a previous study based on a few morphological characters, although the phylogenetic proximity among these *taxa* has never been tested. The present study aimed to raise hypothesis about the way these species relate within the order Amphisbaenia and evaluate if they recover a monophyletic group through using two mitochondrial molecular markers: 16S and ND2. Due to a rarity of amphisbaenids specimens at museums and the difficulty at obtaining tissue samples, We have chosen to include in the study only the four species of the complex that occur in the ecoregion Savana Uruguaia, from which tissue was available. We recovered the phylogenetic relations through the Maximum Parsimony method (MP) and through the Bayesian inference of phylogeny, including in the analysis 20 DNA sequence data generated in this study and 32 DNA sequence data obtained from GenBank, of which 21 correspond to species of the *A. darwini* complex and 31 belonging to the rest of the Amphisbaenidae family and other families of Amphisbaenia. Both analysis have shown that the group is monophyletic. The internal relations of the complex, however, are confused, indicating issues with the current taxonomy and species diagnosis within the group.

RESUMO

Amphisbaenia é um grupo monofilético que contém seis famílias. As relações entre as espécies do grupo ainda são pouco conhecidas e a nomenclatura e taxonomia tem sido revistas recentemente. Dentro da família Amphisbaenidae há um suposto grupo de espécies associadas taxonomicamente à *Amphisbaena darwini*. Este complexo de espécies é composto por cerca de oito táxons, de relações incertas, que ocorrem do nordeste do Brasil até o Uruguai e Argentina e apresentam relativa simpatria, especialmente ao longo da Savana Uruguaia

e o sul da Mata Atlântica. Essa associação de espécies foi proposta em um estudo anterior, baseada em alguns caracteres morfológicos, mas a proximidade filogenética entre estes táxons nunca foi testada. O presente estudo teve como objetivo elaborar uma hipótese de relacionamento das espécies do grupo de *Amphisbaena darwini* com as demais espécies de *Amphisbaenia*, avaliando se formam um agrupamento monofilético, utilizando-se dois marcadores do genoma mitocondrial: 16S e ND2. Devido à raridade de espécimes de anfisbenídeos em museus e a dificuldade na obtenção de tecidos, foram utilizadas no estudo apenas as quatro espécies relacionadas ao complexo que se distribuem ao longo da ecorregião Savana Uruguiaia, das quais se dispunha de tecido. Foram recuperadas as relações filogenéticas através do método da Máxima Parcimônia (MP) e da inferência Bayesiana da filogenia, incluindo-se na análise 20 seqüências geradas no presente estudo e 32 obtidas do GenBank, das quais 21 correspondem a espécimes pertencentes ao complexo de *A. darwini* e 31 pertencente ao restante da família *Amphisbaenidae* e outras famílias de *Amphisbaenia*. Ambas as análises retomaram o complexo como sendo um grupo. As relações internas do complexo são confusas, indicando problemas com a taxonomia e diagnose das espécies relacionadas ao grupo.

Key Words: Filogenia, mtDNA, *Amphisbaenia*, Pampa

1. Introdução

Amphisbaenia constitui um grupo monofilético de répteis Squamata (Kearney 2003; Kearney & Stuart 2004; Macey *et al.* 2004), composto por seis famílias. São animais de hábito fossorial, com quase todos os representantes apresentando ausência de membros. É um grupo pouco estudado, com mais de 190 espécies em 23 gêneros, ocorrendo na região Neotropical, Ilhas Caribenhas, Flórida, baixa Califórnia, partes do Mediterrâneo e Oriente Médio e África subsaariana (Kearney & Stuart 2004). A respeito da família *Amphisbaenidae*, o estudo filogenético mais recente teve base em caracteres moleculares e sugeriu a sinonimização dos gêneros brasileiros *Anops*, *Aulura*, *Bronia*, *Cercolophia* e *Leposternon* à *Amphisbaena*, indicando um desacordo entre os caracteres morfológicos utilizados para diagnose dos gêneros e os dados moleculares obtidos (Mott & Vieites 2009). Uma série de caracteres morfológicos utilizados nas reconstruções filogenéticas em *Amphisbaenia*, como perda de membros e outras características osteológicas, especialmente do crânio, parecem apresentar muitas homoplasias (Kearney & Stuart 2004). Os trabalhos que estudaram as relações filogenéticas de *Amphisbaenia* tiveram enfoque dentro de

Squamata ou relações das famílias dentro de *Amphisbaena* (Vidal & Hedges 2009; Townsend *et al.* 2004; Macey *et al.* 2004), sendo raros trabalhos que elucidem as relações das espécies dentro de famílias e gêneros.

Ao revisar as espécies do gênero *Amphisbaena* do sul da América do Sul, Gans (1966) reconheceu um complexo de espécies comumente identificadas como *Amphisbaena darwini* Duméril & Bibron, 1839. A associação entre as espécies deste grupo não é clara, porém todas apresentam algumas características morfológicas em comum, como: cerca de 200 anéis no corpo, menos de 40 segmentos no anel do meio do corpo e quatro poros pré-cloacais (Gans 1966). Neste complexo estão relacionadas oito espécies (Gans 1966, 2005): *Amphisbaena albocingulata* Boettger, 1885, *A. darwini*, *A. heterozonata* Burmeister, 1861, *A. hoguei* Vanzolini, 1950, *A. munoai* Klappenbach, 1960, *A. nigricauda* Gans, 1966, *A. prunicolor* (Cope 1885) e *A. trachura* Cope, 1885. Até recentemente algumas dessas espécies eram consideradas subespécies. Utilizando caracteres merísticos, Vanzolini (2002) elevou ao nível específico *Amphisbaena prunicolor* e *Amphisbaena albocingulata* anteriormente consideradas por Gans (1966) subespécies de *Amphisbaena prunicolor*. As espécies deste complexo estão distribuídas do nordeste brasileiro ao sul do Uruguai e Argentina, ocorrendo também no Paraguai. Na ecorregião Savana Uruguiaia e sul da Mata Atlântica existe uma relativa simpatria entre as espécies *A. munoai*, *A. trachura*, *A. darwini*, *A. prunicolor* (Figura 1). Perez (2011) reforçou, através de análises estatísticas comparativas, a idéia de grande similaridade presente nas espécies de *Amphisbaena* associadas à *A. darwini* e a dificuldade de identificação das mesmas. No mesmo estudo, Perez (2011) verificou a existência de uma estruturação geográfica apresentada na forma de uma variação na coloração em *Amphisbaena darwini*. Indivíduos do Uruguai, que é a localidade tipo da espécie assemelham-se aos indivíduos da região de planície costeira do Rio Grande do Sul. Já, os indivíduos da região do planalto que se distribuem até o estado de Santa Catarina, apresentam uma coloração mais escura, com intensa pigmentação na região anterior de cada segmento formando uma linha na região anterior dos anéis. Apesar dessa variação na coloração Perez não encontrou outras diferenças e considerou os dois grupos variações morfológicas dentro das espécies de *A. darwini*. Em relação à *Amphisbaena munoai*, Perez (2011) também identificou variação em tamanho e coloração associados à distribuição geográfica, identificando três subgrupos: o primeiro com distribuição na região

noroeste do Rio Grande do Sul, de coloração mais escura e maiores proporções; o segundo distribuído na região central e leste do Rio Grande do Sul, sendo de coloração mais clara e rosada e menores proporções; e o último distribuído no Uruguai, na localidade tipo de *A. munoai* e arredores, com coloração e proporções intermediárias. Apesar dessa variação morfológica, Perez não encontrou outras características que permitissem a diagnose destes grupos.

A associação das espécies deste complexo continua mal definida, sendo necessária uma análise filogenética para determinar o monofiletismo do grupo. Uma análise filogenética baseada em marcadores moleculares poderia auxiliar a elucidar essa questão, permitindo avaliar as relações evolutivas do grupo. Genes mitocondriais frequentemente oferecem um robusto potencial filogenético para a reconstrução de relações micro-evolutivas em animais (Boore 1999; Boore & Brown 1998; Macey *et al.* 2000).

Mott e Vieites (2009) reconstruíram as relações filogenéticas dentro da família Amphisbaenidae com foco nas espécies com ocorrência na América do Sul. No entanto, utilizaram em sua análise filogenética apenas duas espécies do complexo de *Amphisbaena darwini*: a espécie *Amphisbaena trachura* e a espécie *Amphisbaena munoai* as quais ficaram proximamente relacionadas e formaram uma politomia com as espécies *Amphisbaena kingi* (Bell, 1833) e *Amphisbaena angustifrons* Cope, 1861. Além desse, não há nenhum trabalho que reconstrua relações filogenéticas incluindo essas espécies. Nenhum dos caracteres utilizados no reconhecimento do complexo foi testado em uma filogenia para ver se representam sinapomorfias para o grupo. Dada a carência de informações sobre este grupo, realizamos uma análise filogenética de parte das espécies do complexo de *A. darwini*, com ênfase para os táxons com ocorrência na Savana Uruguaia e sul da Mata Atlântica. Nesta análise buscamos testar a monofilia do grupo e identificar sua relação com as demais espécies de *Amphisbaena*. A elaboração de hipóteses de relacionamento neste grupo é extremamente importante para a compreensão das relações biogeográficas entre as áreas abertas, como o Pampa, e outras áreas relacionadas na América do Sul.

2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

Infelizmente ainda existem poucos espécimes de anfisbenídeos em museus e coleções científicas (Vanzolini 1991; Kearney 2003) e a maioria das coleções que as contém, não possui bancos de tecidos desses animais. Este fator, agregado à dificuldade de coletar esses animais ao longo da distribuição das oito espécies, nos fez limitar a análise apenas às quatro espécies que ocorrem ao longo da ecorregião de Savana Uruguaia (*A. darwini*, *A. trachura*, *A. munoai*, *A. prunicolor*) (Figura 1, 2) das quais se dispõe de tecidos em coleções.

Foram seqüenciados DNA de 20 indivíduos, provenientes de 16 localidades, das seguintes espécies: *Amphisbaena darwini* (n=5), *Amphisbaena trachura* (n=6), *Amphisbaena munoai* (n=3), *Amphisbaena prunicolor* (n=3), *Amphisbaena kingi* (n=1) e *Amphisbaena* cf. *trachura* (n=2). Dada a variabilidade morfológica, que resulta em incertezas no reconhecimento específico em alguns táxons (Perez 2011), optamos por incluir o maior número possível de amostras disponível, de diferentes localidades, para cada espécie suposta. *Amphisbaena kingi* foi incluída, como parte do grupo externo, devido à possível proximidade com as espécies do grupo (Mott & Vieites 2009). Os indivíduos de *Amphisbaena* cf. *trachura* assim foram identificados inicialmente e infelizmente os testemunhos desses espécimes não foram encontrados na coleção impossibilitando uma identificação mais precisa. Os espécimes usados nesta análise estão depositados nas coleções herpetológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP) (Tabela 1). Além dos indivíduos supracitados, foram incluídas informações já publicadas a partir do Genbank (Benson *et. al* 2005) de 32 espécies de *Amphisbaenia*, pertencentes as 11 gêneros e cinco famílias, totalizando 52 indivíduos (tabela 1). Cada indivíduo foi seqüenciado para dois marcadores moleculares mitocondriais: o gene NADH desidrogenase subunidade dois (ND2) e o gene para RNA ribossomal 16S (16S).

2.2 Procedimentos laboratoriais

O DNA genômico total foi extraído de alíquotas de fígado, dos 20 indivíduos, preservadas em álcool 90% de acordo com a metodologia de Medrano *et al.* (1990) com modificações. As amostras de DNA extraído foram diluídas na proporção 1/10 ou 1/20, dependendo das concentrações de DNA. A amplificação dos marcadores foi feita através de reações em cadeia da polimerase (PCR). Os *primers* utilizados foram 16Sar-L (CGCCTGTTTATCAAAAACAT) e 16Sbr-H (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT) (Palumbi 1996) para a amplificação do marcador 16S e ND2-L5216 (GGCC CATACCCCGRAAATG) e ND2-H6313 (ACTCTTRTTTAAGGCTTTGAAGGC) (Sorenson *et. al* 1999) para o marcador ND2. As reações tinham volume final de 20µl, tendo as seguintes concentrações dos reagentes: 10–50 ng de DNA, 1x de tampão, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 0,2mM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer* e 0,5 U de Taq DNA Polimerase. Para o marcador 16S o programa do PCR consistia de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento de 52°C a 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Para o marcador ND2 o programa do PCR consistia em uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento de 50°C a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Controles negativos foram incluídos em todas as reações de amplificação para verificar a possível ocorrência de contaminação. Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corados com azul de bromofenol (BFB) e visualizados sob iluminação ultravioleta para verificação do sucesso das reações. As amostras foram posteriormente à amplificação, purificadas com o protocolo de purificação com EXOSAP 79 (Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare®).

Todos os procedimentos laboratoriais à exceção do seqüenciamento foram feitos no Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CNPq proc. 479412/2008-1, coordenado por Luiz R. Malabarba). O seqüenciamento foi feito apenas em uma direção, utilizando-se o *primer forward*, junto à empresa MACROGEN, na Coréia do Sul.

2.3 Alinhamento e análises filogenéticas

As 20 seqüências foram manualmente conferidas de acordo com seus respectivos eletroferogramas, para se verificar a confiabilidade das mesmas. Alinhou-se as 20 seqüências desse estudo juntamente com as 32 seqüências obtidas do Genbank no programa MAFFT (Katoh, Asimeno & Toh 2009). As seqüências do gene ND2, que codificam proteína foram traduzidas para aminoácidos utilizando o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011) para confirmação do alinhamento. Dados de diversidade nucleotídica, número de sítios polimórficos, número de mutações sinônimas e não sinônimas foram acessados utilizando o programa DnaSP (Librado & Rozas 2009).

O melhor modelo evolutivo para o marcador 16S e para o ND2 foi selecionado independentemente, utilizando o Critério de Informação Akaike (*Akaike Information Criterion–AIC*) implementado no programa JModelTest (Posada 2008). As seqüências dos dois marcadores foram concatenadas no programa Mesquite (Maddison & Maddison 2011) para se efetuar uma análise filogenética unificada do conjunto de dados composto pelos dois marcadores.

A análise filogenética foi realizada através do método de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB). A análise de MP foi realizada no programa TNT (Goloboff, Farris & Nixon 2003) utilizando buscas heurísticas com permutação de ramos por *tree-bisection-reconnection* (TBR). Para se verificar a confiabilidade dos ramos utilizou-se o suporte de Bremer (Bremer 1988), com a opção de retenção de árvores subótimas com até 25 passos extras. A Inferência Bayesiana foi conduzida utilizando o programa Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001). A análise consistiu-se de oito cadeias *Metropolis-Coupled Markov Chains* (MCMC) que rodaram por 10 milhões de gerações cada. Cadeias foram amostradas a cada 1000 gerações. O conjunto de dados foi particionado para a atribuição do modelo respectivo a cada marcador. Utilizou-se o programa Tracer (Rambaut & Drummond 2007) para se verificar a quantidade de árvores geradas antes da convergência por *burn in* e essas foram descartadas. Foi gerada a árvore consenso e foi calculada a probabilidade posterior. Nas duas análises filogenéticas as árvores foram enraizadas na espécie *Rhineura floridana* (Baird 1858) com base na literatura.

3. Resultados

3.1 Alinhamento e análises preliminares

O tamanho das seqüências foi de 743 pares de base (pb) no gene ND2 e 520 pb no gene 16S, sendo 512 sítios polimórficos e 451 sítios informativos para parcimônia no ND2 e 174 sítios polimórficos e 135 sítios informativos para parcimônia no 16S. Em relação à cadeia de aminoácidos do marcador ND2 foram detectadas 117 mutações sinônimas e oito mutações de substituição. A concatenação das seqüências de ambos marcadores resultou em seqüências de 1263 caracteres.

3.2 Máxima Parcimônia

Apenas uma árvore foi gerada pelo método de MP (Figura 3), com 4685 passos, um índice de consistência (CI) de 0,26 e índice de retenção (RI) de 0,36. As espécies *Amphisbaena darwini*, *A. munoai*, *A. prunicolor* e *A. trachura* formaram um agrupamento monofilético com suporte de Bremer de 21. A estrutura interna do grupo não apresentou monofila para nenhuma das espécies. Dois clados foram identificados, o clado A contendo os espécimes de *A. trachura* e dois indivíduos de *A. darwini* (446 e 447) e o clado B contendo as espécies *A. munoai*, *A. prunicolor*, os dois indivíduos identificados como *A. cf. trachura* e o restante dos indivíduos de *A. darwini*. O exemplar de *A. munoai* de São Jerônimo (seqüência obtida do genbank) foi agrupado com *A. prunicolor* 1249 e juntamente com a *A. munoai* 1863 (embora com baixo suporte), formaram o grupo irmão de *A. darwini* + *A. prunicolor*. Já os indivíduos *A. munoai* 1215 e *A. munoai* 206 formaram um ramo externo ao grupo *A. darwini* + *A. munoai* + *A. prunicolor*. O grupo irmão para este clado (A+B) é formado pelas espécies *Amphisbaena leseri* Gans, 1964A e *Amphisbaena kingi*.

3.3 Inferência Bayesiana

O modelo evolutivo selecionado para o gene 16S foi o GTR+G e o modelo para o gene ND2 foi o GTR+I+G. A árvore consenso gerada por Inferência Bayesiana apresenta

topologia similar à árvore gerada por Máxima Parcimônia, e as espécies deste estudo também retomaram um grupo monofilético (Figura 4). A estrutura interna do grupo também não apresentou monofila para nenhuma das espécies. Os mesmos dois clados observados na árvore de MP foram identificados, porém a relação das espécies incluídas no clado B foi diferente. O indivíduo de *Amphisbaena prunicolor* de Trindade do Sul (1249) ficou como grupo irmão dos indivíduos de *A. munoai* de Pedras Altas (1863) e São Jerônimo. O clado formado pelas quatro espécies do grupo interno ficou em uma politomia juntamente com as espécies *Amphisbaena kingi*, *Amphisbaena leeseri* e *Amphisbaena angustifrons*. Nenhuma das espécies do grupo apresentou monofilia.

4. Discussão

4.1 Relações do complexo de *Amphisbaena darwini* na família Amphisbaenidae

Nas análises de MP e IB as espécies pertencentes ao complexo de *Amphisbaena darwini* da Savana Uruguaia e sul da Mata Atlântica (*A. trachura*, *A. darwini*, *A. munoai* e *A. prunicolor*) retomaram um agrupamento monofilético, corroborando o arranjo taxonômico proposto por Gans (1966) que associou as espécies por similaridade morfológica. O valor de suporte de Bremer para o clado na MP foi de 21 passos adicionais e a probabilidade posterior na IB foi de 1 (=100%), indicando forte suporte à monofilia do grupo. O grupo irmão para o complexo inclui as espécies *Amphisbaena kingi*, *Amphisbaena leeseri* e *Amphisbaena angustifrons* (na IB), concordando com a filogenia disponível para Amphisbaenidae (Mott & Vieites 2009). *A. kingi* se distribui por toda Argentina, Uruguai e estado do Rio Grande do Sul, Brasil, tendo sobreposição da ocorrência com as espécies do complexo de *A. darwini*. *A. angustifrons* se distribui por toda Argentina e sul do Uruguai. *A. leeseri* ocorre no Paraguai e estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. *A. angustifrons* apresenta mais de 46 segmentos em um anel do meio do corpo (Gans & Diefenbach 1972), enquanto as espécies do grupo de *A. darwini* apresentam menos de 40. *A. kingi* e *A. leeseri* possuem, ambas, menos de 40 segmentos no anel do meio do corpo (Gans 1964A, Gans 1964B). *A. kingi* apresenta um crânio em formato de quilha, enquanto

A. angustifrons e *A. leeseri* apresentam o mesmo padrão de cabeça do grupo de *A. darwini*, de cabeça arredondada. *A. leeseri* apresenta apenas um par de poros pré-cloacais, enquanto *A. angustifrons*, *A. kingi* e todo o complexo de *A. darwini* apresentam quatro poros ou mais.

4.2 Relações internas do complexo de *Amphisbaena darwini*

Dos dois clados identificados no conjunto das espécies de *Amphisbaena darwini*, o clado A apresenta maior suporte na MP (clado A = 21; clado B = 14) e mesmo suporte que o clado B na IB (clado A = 1; clado B = 1). O clado A contém os sete espécimes da espécie *A. trachura* em um grupamento parafilético com *A. darwini* (446 e 447 ambos indivíduos de Rio Grande, RS). *A. trachura* apresenta como característica diagnóstica principal a presença de escamas tuberculadas na cauda, enquanto *A. darwini* apresenta escamas lisas (Gans, 1966). A existência de diferenças morfológicas dificulta a compreensão da estruturação parafilética do táxon em relação a *A. darwini*. Uma possível interpretação seria a de que a cauda tuberculada constituiria um estado plesiomórfico para o clado A (o grupo de *A. trachura*), tendo sido revertido para cauda com escamas lisas na espécie *A. darwini*. Essa hipótese sugere que a forma das escamas caudais não é um bom caractere taxonômico e os limites entre estas espécies devem ser revisados. Essa hipótese, no entanto, poderia ser testada em um estudo mais específico de filogeografia, com amostragem geográfica mais completa. Um estudo de genética de populações dentro de *A. trachura*, por exemplo, poderia revelar a presença de estruturação genética ou não dentro do táxon, podendo elucidar os limites específicos, assim como um estudo morfológico utilizando caracteres alternativos para anfisbenídeos que possam ser mais informativos, como caracteres de morfologia interna, ainda não utilizados. Mott e Vieites (2009) avaliaram que algumas espécies de anfisbenídeos que apresentam uma distribuição relativamente ampla, podem representar complexos de espécies e não uma unidade taxonômica única.

Amphisbaena darwini se apresentou como polifilética, tendo os indivíduos da região de planalto (96, 419, 617), no limite da distribuição norte da espécie, sido agrupados com os indivíduos de *A. prunicolor* de Porto Alegre, RS (P5387 e P4783) (clado B). Os indivíduos de *A. darwini* do clado A assemelham-se aos exemplares da espécie que ocorrem no Uruguai, que é a localidade descrita originalmente para a espécie. Perez (2011)

identificou a possível existência de dois subgrupos pertencentes à espécie *A. darwini*, o primeiro apresentando distribuição do Uruguai até o centro-leste do Rio Grande do Sul (corresponde ao táxon alocado no clado A) e o segundo ocorrendo na região de planalto, estendendo-se do Rio Grande do Sul à Santa Catarina (clado B). O segundo grupo apresenta uma coloração mais escura com pigmentação mais forte na região anterior de cada segmento, dando a impressão da formação de uma linha na porção anterior de cada anel. Apesar desta variação, Perez (2011) não observou outras características que permitissem a diagnose destes subgrupos e os considerou uma única unidade taxonômica. Os dados do presente estudo indicam que os dois subgrupos pertencentes à espécie *A. darwini* constituem unidades taxonômicas distintas, apresentando uma divergência evolutiva basal dentro do complexo de espécies de *A. darwini*, e sugerindo que os indivíduos chamados de *Amphisbaena darwini* com distribuição na região de planalto no norte do estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina constituem uma nova espécie a ser descrita. *Amphisbaena* é um táxon reconhecidamente carente de trabalhos atuais em taxonomia que auxiliem na identificação dos táxons. Este fato, associado à falta de representantes do grupo em coleções científicas tem levado a uma subestimação da real diversidade específica no grupo (Perez 2011).

Os indivíduos identificados como *Amphisbaena* cf. *trachura*, provenientes de Morrinhos do Sul, RS e Dom Pedro de Alcântara, RS, formaram um grupo irmão do clado *A. munoai*+*A. prunicolor*+*A. darwini*, e, pelo que os dados indicam, não são da espécie *A. trachura*. Infelizmente, os testemunhos de ambos os exemplares não foram encontrados na coleção, o que impossibilitou a confirmação da identificação visual. Entretanto, optamos por deixar os dados moleculares das espécies na análise, por contribuir com informação a cerca da avaliação do complexo de *A. darwini* dentro de Amphisbaenidae.

Na análise por MP, a espécie *A. prunicolor* teve os dois indivíduos de Porto Alegre (P5387, P4783) agrupados em um ramo e o indivíduo de Trindade do Sul (1249) agrupado com as *A. munoai* de São Jerônimo e Pedras Altas (1863), embora com suporte baixo (2 passos). O suporte de 17 passos indica um forte parentesco entre os indivíduos de *A. prunicolor* de Porto Alegre com os indivíduos de *A. darwini* da região do planalto. Na análise Bayesiana os dois indivíduos de *A. prunicolor* de Porto Alegre também agruparam com os indivíduos de *A. darwini* da região do planalto. Em ambas as análises as relações de

A. munoai e *A. prunicolor* ficaram bastante confusas e a partir do conjunto de dados não é possível inferir uma hipótese que explique essa relação entre as duas espécies. Nas árvores obtidas, os indivíduos pertencentes à *Amphisbaena munoai* da região noroeste do estado (Cerro Largo, RS e Augusto Pestana, RS), que apresentam coloração mais escura e proporções corporais maiores, se agruparam assim como os indivíduos da região leste do estado (Pedras Altas, RS e São Jerônimo, RS) que apresentam coloração mais clara e proporções menores, corroborando os dados de Perez (2011) que identificou a existência de uma diferenciação morfológica na espécie relacionada à distribuição geográfica. Isso sugere que *Amphisbaena munoai* possa representar um complexo de espécies.

Perez (2011) postula que os nomes das espécies relacionadas ao complexo de *A. darwini* identificado por Gans (1966) permaneceram praticamente inalterados até hoje. Esta estabilidade se deve mais à falta de revisões taxonômicas do que a real funcionalidade dos nomes. Algumas espécies apresentam variações não descritas e os limites entre alguns táxons são mal definidos, o que torna as diagnoses não funcionais e constitui um problema para a distinção das espécies. Nossos dados reforçam estas afirmações e indicam a existência de espécies crípticas, que vem mascarando a real diversidade taxonômica deste grupo.

4.3 Considerações finais

O presente estudo, aliado aos dados da bibliografia, indica que há uma subestimação da real riqueza de espécies de *Amphisbaena* além de um extenso problema taxonômico dentro do complexo de espécies de *A. darwini*. Mais estudos, focando a sistemática do grupo, são necessários, incluindo indivíduos de mais populações e de todas as espécies, abordando tanto caracteres morfológicos que se mostrem mais eficientes na diagnose específica como marcadores moleculares adicionais aos utilizados neste estudo a fim de revelar melhor as relações dentro do grupo.

Apesar da incongruência dos nossos achados com a taxonomia vigente dentro do grupo, os dados do estudo demonstraram que o complexo de espécies de *A. darwini* constitui um agrupamento monofilético dentro da família Amphisbaenidae. Para uma análise futura é importante que se incluam as outras quatro espécies associadas ao complexo e se utilize outros marcadores a fim de testar nossas hipóteses.

Referências

Baird, S.F. (1858) Description of new genera and species of North American lizards in the museum of the Smithsonian Institution. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 1858, 253–256

Bell, T. (1833) Mr. Bell exhibited specimens of two reptiles, forming part of his collection, which he regarded as the types of two genera hitherto undescribed. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1833, 98–99.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. & Wheeler, D.L. (2005) GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33, 34–38.

Boore, J.L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27, 1767–1780.

Boore, J.L. & Brown, W.M. (1998) Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 668–674.

Bremer, K. (1988) The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42, 795–803.

Burmeister, C.H.C. (1861) Reise durch die La Plata-Staaten mit besonderer Rücksicht auf die physische Beschaffenheit und den Culturzustand der Argentinischen Republik. *Ausgeführt in den Jahren 1857, 1858, 1859 und 1860*. Halle: H.W. Schmidt, 2 vols. 1: vi1502; 2: vi1538

Cope, E.D. (1861) Remarks defining the following species of Reptilia Squamata. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 13, 75–77.

Cope, E. D. (1885) Twelfth contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the American Philosophical Society*, v 22, 118, 167–194.

Duméril, A.M.C. & Bibron, G. (1839) *Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des reptiles. Errata. De l'ordre des Lézards ou des Sauriens*. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris, 5, I + VIII + 1–856pp.

Gans, C. (1966) Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia) 3. The small species from South America commonly identified as *Amphisbaena darwini*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 134, 3, 185–416.

Gans, C. (1964A) Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia: Reptilia) - New records of *Amphisbaena silvestrii* Boulenger, and the description of a new two pored species from the northern Chaco. *Copeia*, 3, 553–561.

Gans, C. (1964B) Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). A systematic review of *Anops* Bell, 1833. *American Museum Novitates*, 2186, 1–26.

Gans, C. (2005) Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 289, 1–130.

Gans, C., Diefenbach, C.O.C. (1972) Description and geographical variation of the South American *Amphisbaena angustifrons*: the southernmost amphisbaenian in the world (Reptilia, Amphisbaenia). *American Museum Novitate*, 2494, 1–20.

Goloboff, P., Farris, J. & Nixon, K. (2003) T.N.T: tree analysis using new technology. *Cladistics*, 24, 774–786.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.

Katoh, K., Asimenos, G. & Toh, H. (2009) Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. In *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis* edited by D. Posada *Methods in Molecular Biology* 537, 39–64.

Kearney, M. (2003) Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent fossil forms. *Herpetological Monographs*, 17, 1–74.

Kearney, M. & Stuart, B.L. (2004) Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *The Royal Society*, 271, 1677–1683.

Klappenbach, M.A. (1960) Notas herpetológicas. I. *Amphisbaena munoai* n. sp. (Amphisbaenidae). *Comunicaciones en Zoología do Museo Historia Naturel Montevideo*, 4, 1–2.

Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.

Macey, J.R., Papenfuss, T.J., Kuehla, J.V., Fourcadea, H.M. & Boorea, J.L. (2004) Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 1–88.

Macey, J.R., Schulte II, J.A. & Larson, A. (2000) Evolution and phylogenetic information content of mitochondrial genomic structural features illustrated with acrodont lizards. *Systematic Biology*, 49, 257–277.

Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Available from <http://mesquiteproject.org> (accessed 5 nov 2011).

Medrano, J.F., Aasen, E. & Sharrow, L. (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1), 43.

Mott, T. & Vieites, D.R. (2009) Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 190–200.

Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular systematic*. Sinauer Associates, Sunderland, pp.205–247.

Perez, R. (2011) *Revisão do status taxonômico de Amphisbaena prunicolor (Cope, 1885) e Amphisbaena albocingulata Boettger, 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae)*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Porto Alegre, Brasil, pp. 88

Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.

Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (Acessado em novembro de 2011)

Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T. & Mindell, D.P. (1999) Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12, 105–114.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.

Townsend, T.M., Larson, A., Louis, E. & Macey, J.R. (2004) Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology*, 53, 735–757.

Vanzolini, P.E. (1950) Contribuições ao conhecimento dos lagartos brasileiros da família Amphisbaenidae Gray, 1825. I. Sobre uma nova subespécie insular de *Amphisbaena darwini* D. & B., 1839. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 9, 69–77.

Vanzolini, P. E. (1991) Biometry and geographical differentiation of *Amphisbaena roberti* Gans, 1964 (Reptilia, Amphisbaenia). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 37(24), 363–377.

Vanzolini, P.E. (2002) An aid to the identification of the South American species of *Amphisbaena* (Squamata, Amphisbaenidae). *Papéis Avulsos de Zoologia do MZUSP*, 42, 15, 351–362.

Vidal, N., Hedges, S.B. (2009) The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. *Comptes Rendus Biologies*, 332, 129–139.

Tabela 1. Táxons incluídos no estudo. Os códigos nas colunas dos genes correspondem ao número de acesso das sequências no Genbank. As sequências geradas nesse estudo serão armazenadas no Genbank somente após a publicação do trabalho. *Mott, 2009 identificou o espécime como *Amphisbaena darwini*.

Táxon	Código na coleção	Município, estado	País	16S	ND2
<i>Amphisbaena alba</i>	UFMT 3468	Guarantã do Norte, MT	Brasil	FJ441706	FJ441949
<i>Amphisbaena anaemariae</i>	CHUNB 38647	Brasília, DF	Brasil	FJ441668	FJ441911
<i>Amphisbaena angustifrons</i>	MONTERO3	Tucuman	Argentina	FJ441707	FJ441950
<i>Amphisbaena bolivica</i>	MONTERO11	Salta	Argentina	FJ441670	FJ441913
<i>Amphisbaena caeca</i>	MVZ 232753	Manatí, Porto Rico	EUA	FJ441671	FJ441914
<i>Amphisbaena camura</i>	MPEG 21463	Aquidauana, MS	Brasil	FJ441672	FJ441915
<i>Amphisbaena cunhai</i>	LSUMZH 13969	Manaus, AM	Brasil	FJ441673	FJ441916
<i>Amphisbaena darwini</i> 419	UFRGS 4978	Campo Belo do Sul, SC	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena darwini</i> 446	UFRGS 5006	Rio Grande, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena darwini</i> 447	UFRGS 5005	Rio Grande, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena darwini</i> 617	UFRGS 5085	Bom Jesus, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena darwini</i> 96	UFRGS 4856	Capão Alto, SC	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena fuliginosa</i>	MZUSP 82798	Aripuanã, MT	Brasil	FJ441684	FJ441927
<i>Amphisbaena hastata</i>	MTR 3662	Mocambo do Vento, BA	Brasil	FJ441678	FJ441921
<i>Amphisbaena ignatiana</i>	MZUSP 93480	Santo Inácio, BA	Brasil	FJ441680	FJ441923
<i>Amphisbaena leeseri</i>	CHUNB 41351	Mateiros, TO	Brasil	FJ441694	FJ441937
<i>Amphisbaena mertensi</i>	MPEG 21462	Marília, SP	Brasil	FJ441676	FJ441919
<i>Amphisbaena munoai</i>	MCP 14749	São Jerônimo, RS	Brasil	FJ441687	FJ441930
<i>Amphisbaena munoai</i> 1215	UFRGS 5298	Cerro Largo, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena munoai</i> 1863	UFRGS 5684	Pedras Altas, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena munoai</i> 206	UFRGS 4896	Augusto Pestana, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena prunicolor</i> 1249	UFRGS 5318	Trindade do Sul, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena prunicolor</i> P4783	MCP 4783	Porto Alegre, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena prunicolor</i> P5387	MCP 5387	Porto Alegre, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena schmidti</i>	MVZ 232756	Manatí, Porto Rico	EUA	FJ441681	FJ441924
<i>Amphisbaena silvestri</i>	UFMT 3997	Cuiabá, MT	Brasil	FJ441689	FJ441932
<i>Amphisbaena cf. trachura</i> 1132	UFRGS 5285	Morrinhos do Sul, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena cf. trachura</i> 1138	UFRGS 5292	Dom Pedro de Alcântara, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena trachura</i> *	MCP 14723	São Jerônimo, RS	Brasil	FJ441693	FJ441936
<i>Amphisbaena trachura</i> 1003	UFRGS 5258	Santana do Livramento, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena trachura</i> 1862	UFRGS 5683	Pedras Altas, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena trachura</i> P17277	MCP 17277	Torres, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena trachura</i> 317	UFRGS 4928	Alegrete, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena trachura</i> 616	UFRGS 5084	Bom Jesus, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena trachura</i> P11797	MCP 11791	São Francisco de Paula, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena vermicularis</i>	CHUNB 35349	Paraná, TO	Brasil	FJ441686	FJ441929
<i>Amphisbaena kingi</i>	MCP 14720	São Jerônimo, RS	Brasil	FJ441726	FJ441969
<i>Amphisbaena kingi</i> 1404	UFRGS 5399	Manoel Viana, RS	Brasil	-	-
<i>Amphisbaena anomala</i>	MPEG 22141	Sto. Antônio de Tauá, PA	Brasil	FJ441713	FJ441956
<i>Bipes canaliculatus</i>	MVZ 233341	Las Calas, MIC	México	AY605484	AY605484
<i>Blanus cinereus</i>	BC93	Pallares, Badajoz	Espanha	EF036388	DQ902265
<i>Amphisbaena brasiliana</i>	UFMT 3998	Guarantã do Norte, MT	Brasil	FJ441708	FJ441951
<i>Amphisbaena kraoh</i>	CHUNB 30676	Jalapão, TO	Brasil	FJ441692	FJ441935
<i>Amphisbaena saxosa</i>	MTR 8831	Lajeado, TO	Brasil	FJ441710	FJ441953
<i>Amphisbaena cuiabana</i>	UFMT 3546	Campo Novo dos Parecis, MT	Brasil	FJ441696	FJ441939
<i>Amphisbaena roberti</i>	MTR 6770	Lajeado, TO	Brasil	FJ441711	FJ441954
<i>Geocalamus acutus</i>	MVZ 232837	Região de Dodoma	Tanzânia	FJ441724	FJ441967
<i>Amphisbaena infraorbitalis</i>	UFMT 3479	Guaporé, MT	Brasil	FJ441723	FJ441966
<i>Amphisbaena microcephala</i>	MTR 1340	UHE Rosal, ES	Brasil	FJ441718	FJ441961
<i>Amphisbaena polystega</i>	MTR 3608	Mocambo do Vento, BA	Brasil	FJ441721	FJ441964
<i>Rhineura floridana</i>	MVZ 233342	Hillsborough, Flórida	EUA	AY605473	AY605473
<i>Trogonophis wiegmani</i>	MVZ 162544	Provincia de Ben Slimane	Marrocos	FJ441667	FJ441910

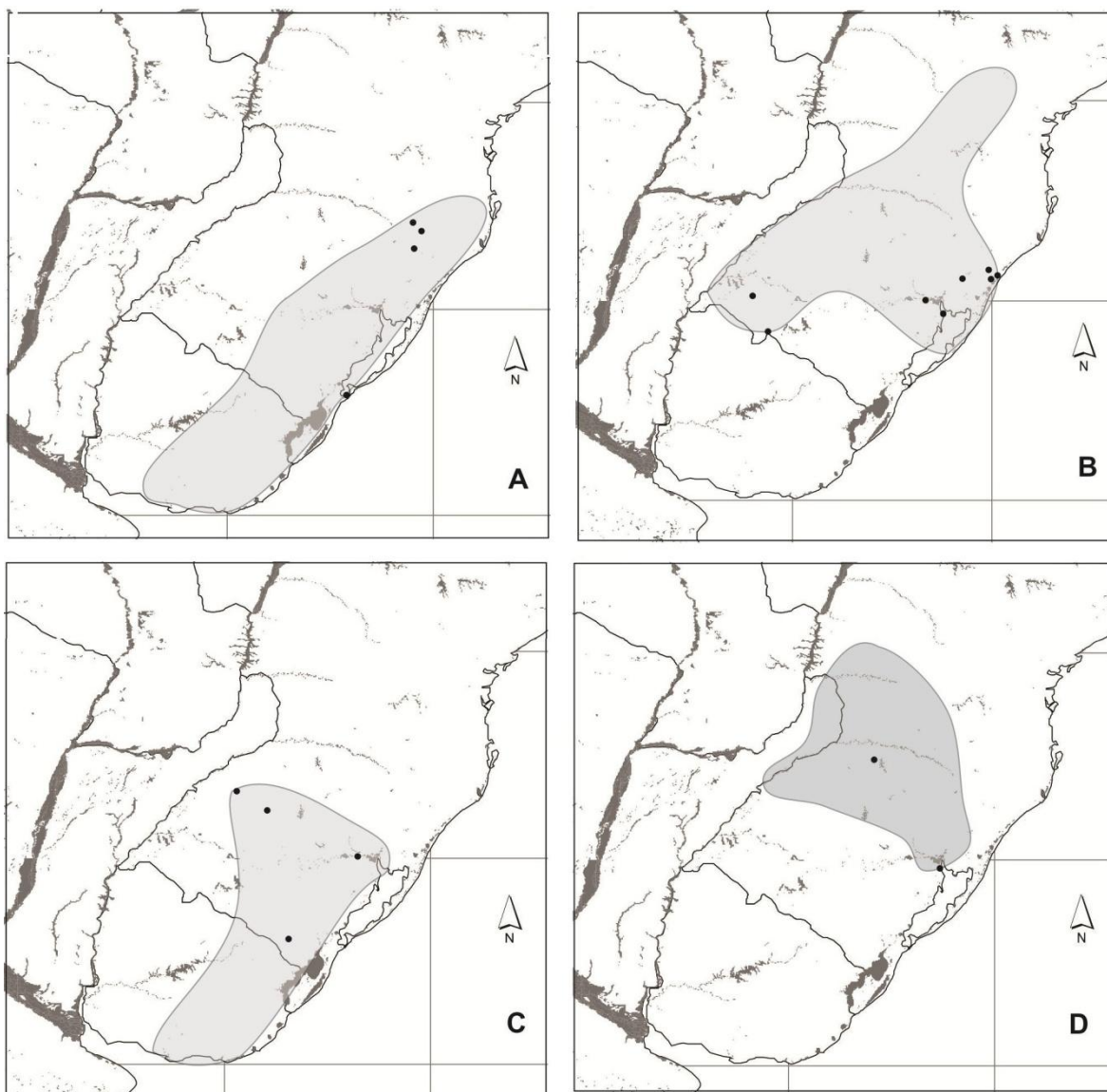


Figura 1. Mapas de distribuição das quatro espécies do complexo de *Amphisbaena darwini* incluídas no estudo. (A) *Amphisbaena darwini*; (B) *Amphisbaena trachura*; (C) *Amphisbaena munoai*; (D) *Amphisbaena prunicolor*. Os pontos nos mapas correspondem às localidades dos indivíduos do complexo utilizados nesse estudo.



Figura 2. Espécies pertencentes ao complexo de *Amphisbaena darwini* incluídas no estudo. (A) *Amphisbaena darwini*; (B) *Amphisbaena trachura*; (C) *Amphisbaena munoai*; (D) *Amphisbaena prunicolor*. Fotos: Márcio Borges-Martins

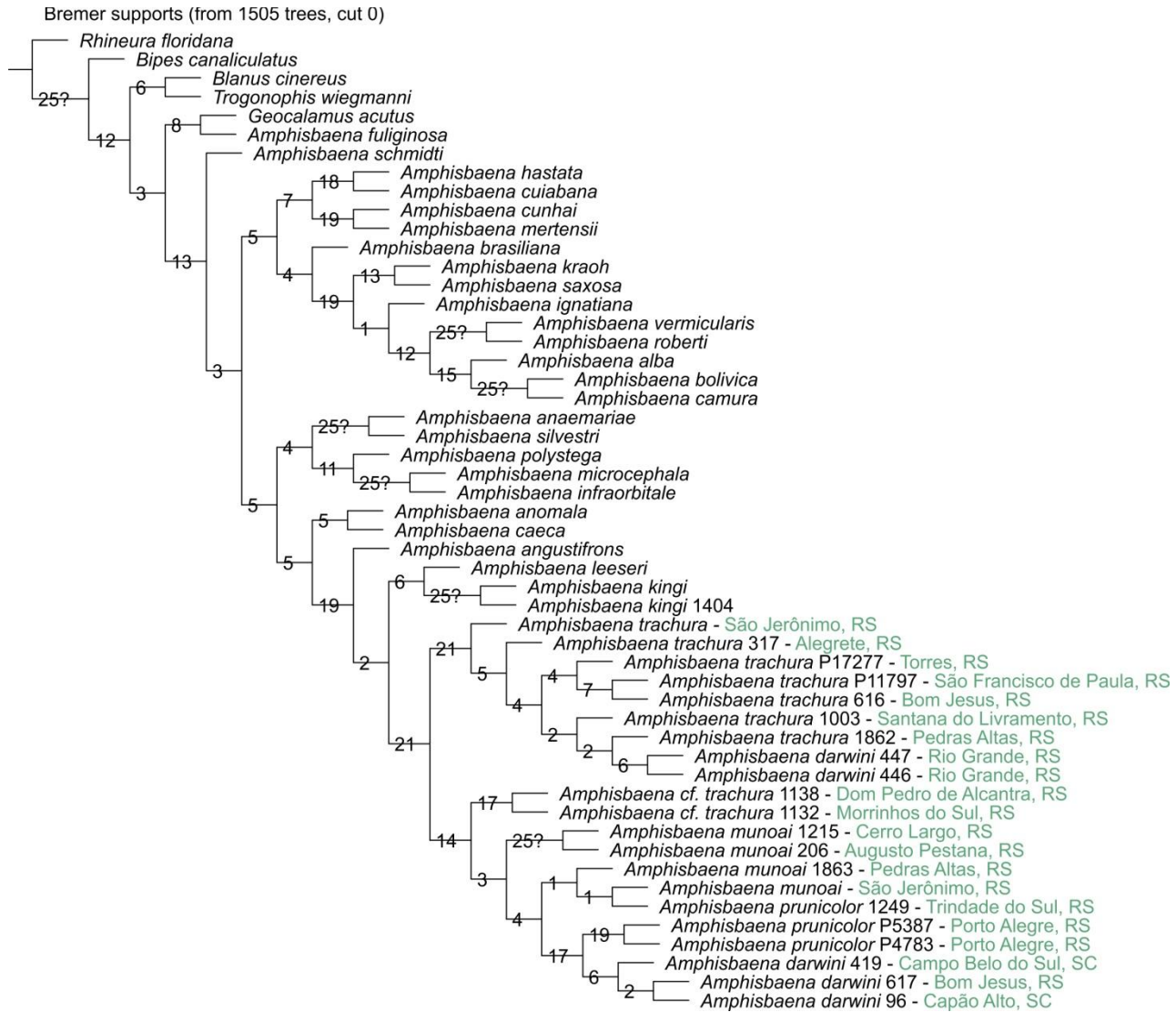


Figura 3. Árvore gerada pelo método da Máxima Parcimônia (MP) com seqüências dos genes mitocondriais 16S e ND2. Os valores nos ramos correspondem ao índice de Bremer (25 passos). A árvore tem 4685 passos, CI = 0,26, RI = 0,36.

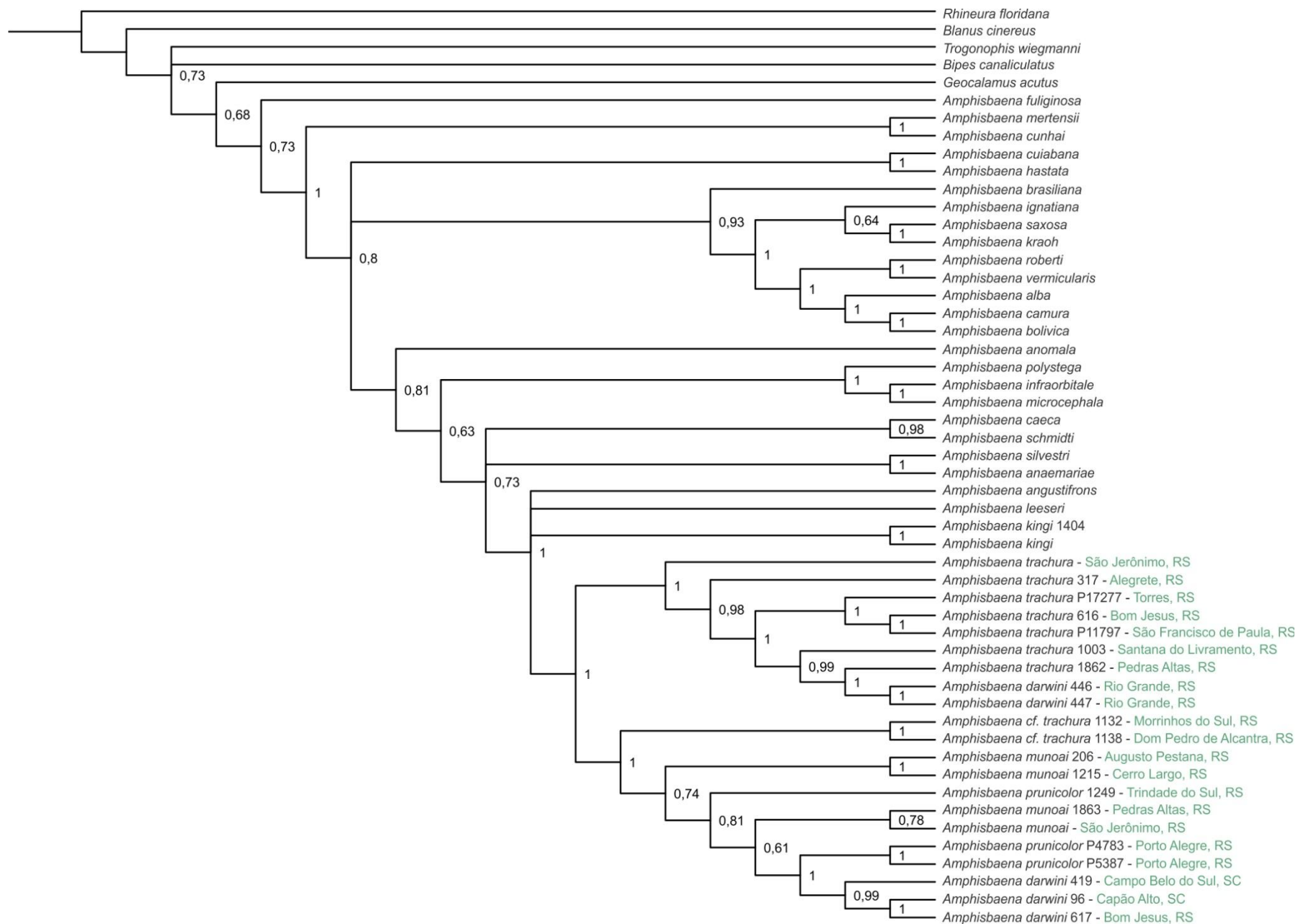


Figura 4. Árvore consenso gerada por Inferência Bayesiana a partir de seqüências dos genes mitocondriais 16S e ND2. Os valores nos ramos correspondem às probabilidades posteriores.

Anexo I

REGRAS PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITO - ZOOTAXA

<http://www.mapress.com/zootaxa/support/author.html#Submission>

Information for authors

- **Aim and scope**
 - Research article
 - Correspondence
 - Special issues with collected papers (e.g. Festschrift)
- **Preparation of manuscripts**
- **Submission of manuscripts**
- **Review process**
- **Publication**
 - Page charge and colour plates
 - Open access
 - Reprints

Aim and scope

Zootaxa is a peer-reviewed international journal for rapid publication of high quality papers on any aspect of systematic zoology, with a preference for large taxonomic works such as monographs and revisions. *Zootaxa* considers papers on all animal taxa, both living and fossil, and especially encourages descriptions of new taxa. All types of taxonomic papers are considered, including theories and methods of systematics and phylogeny, taxonomic monographs, revisions and reviews, catalogues/checklists, biographies and bibliographies, identification guides, analysis of characters, phylogenetic relationships and zoogeographical patterns of distribution, descriptions of taxa, and nomenclature. Open access publishing option is strongly encouraged for authors with research grants and other funds. For those without grants/funds, all accepted manuscripts will be published but access is secured for subscribers only. All manuscripts will be subjected to peer review before acceptance. *Zootaxa* aims to publish each paper within one month after the acceptance by editors.

Based on length, two categories of papers are considered.

1) **Research article**

Research articles are significant papers of four or more printed pages reporting original research. Papers between 4 and 59 printed pages are published in multi-paper issues of 60, 64 or 68 pages. Monographs (60 or more pages) are individually issued and bound, with ISBNs.

Zootaxa encourages large comprehensive taxonomic works. There is no upper limit on the length of manuscripts, although authors are advised to break monographs of over 1000 pages into a multi-volume contribution simply because books over 1000 pages are difficult to bind and too heavy to hold.

Very short manuscripts with isolated descriptions of a single species are generally discouraged, especially for taxa with large number of undescribed species. These short manuscripts may be returned to authors without consideration. Short papers on species of economic, environmental or phylogenetic importance may be accepted at the discretion of editors, who will generally encourage and advise authors to add value to the paper by providing

more information (e.g. checklist of or key to species of the genus, biological information.....). Short papers of 4 or 5 pages accepted for publication may be shortened for publication in the Correspondence section.

2) Correspondence

High quality and important short manuscripts of normally 1 to 4 pages are considered to fill blank pages in multi-paper issues. *Zootaxa* publishes the following six types of correspondence:

- opinions and views on current issues of interests to systematic zoologists (e.g. *Zootaxa* 1577: 1-2)
- commentary on or additions/corrections to papers previously published in *Zootaxa* (e.g. *Zootaxa* 1494: 67-68)
- obituary in memory of deceased systematic zoologists (e.g. *Zootaxa* 545: 67-68)
- taxonomic/nomenclatural notes of importance
- book reviews meant to introduce readers to new or rare taxonomic monographs (interested authors/publishers must write to subject editors before submitting books for review; editors then prepare the book review or invite colleagues to prepare the review; unsolicited reviews are not published)
- and short papers converted from manuscripts submitted as research articles but are too short to qualify as formal research articles.

These short contributions should have no more than **20 references** and its **total length should not exceed four printed pages (except editorials)**. Neither an abstract nor a list of key words is needed; major headings (Introduction, Material and methods...) should NOT be used, except for new taxon heading and references. A typical correspondence should consist of (1) a short and concise title, (2) author name and address (email address), (3) a series of paragraphs of the main text, and (4) a list of references if any. For correspondence of 3 or 4 pages, the first or last paragraph may be a summary.

Commentaries on published papers are intended for scholarly exchange of different views or interpretations of published data and should not contain personal attack; authors of concerned papers may be invited to reply to comments on their papers.

Special issues

Special issues with collected papers such as a Festschrift (see *Zootaxa* 1325 and *Zootaxa* 1599) within the scope of the journal are occasionally published. Guest editors should send the proposal to the chief editor for approval and instructions. Although guest editors for special issues are responsible for organising the peer review of papers collected within these issues, they must follow *Zootaxa*'s style, standard and peer review procedures. If any papers by the guest editors are to be included in the special issue, then these papers must be handled by editors/colleagues other than the editor(s) involved. Special issues must be 60 or more pages. Normally funding is required to offset part of the production cost. Author payment for open access is strongly encouraged. Reprints can be ordered for the entire issue or for individual papers.

Preparation of manuscripts

1) *General*. All papers must be in English. Authors whose native language is not English are encouraged to have their manuscripts read by a native English-speaking colleague before submission. Nomenclature must be in agreement with the *International Code of Zoological Nomenclature* (4th edition 1999), which came into force on 1 January 2000. Author(s) of species name must be provided when the scientific name of any animal species is first mentioned (the year of publication needs not be given; if you give it, then provide a full reference of this in the reference list). Authors of plant species names need not be given. Metric systems should be used. If possible, use the common font New Times Roman and use as little formatting as possible (use only **bold** and *italics* where necessary and indentations of paragraphs except the first). Special symbols (e.g. male or female sign) should be avoided because they are likely to be altered when files are read on different machines (Mac versus PC with

different language systems). You can code them as m# and f#, which can be replaced during page setting. The style of each author is generally respected but they must follow the following general guidelines.

2) The **title** should be concise and informative. The higher taxa containing the taxa dealt with in the paper should be indicated in parentheses: e.g. A taxonomic revision of the genus *Aus* (Order: family).

3) The **name(s) of all authors** of the paper must be given and should be typed in the upper case (e.g. ADAM SMITH, BRIAN SMITH & CAROL SMITH). The address of each author should be given in *italics* each starting a separate line. E-mail address(es) should be provided if available.

4) The **abstract** should be concise and informative. Any new names or new combinations proposed in the paper should be mentioned. Abstracts in other languages may also be included in addition to English abstract. The abstract should be followed by a list of **key words** that are not present in the title. Abstract and key words are not needed in short correspondence.

5) The arrangement of the **main text** varies with different types of papers (a taxonomic revision, an analysis of characters and phylogeny, a catalogue etc.), but should usually start with an **introduction** and end with a list of **references**. References should be cited in the text as Smith (1999), Smith and Smith (2000) or Smith *et al.* 2001 (3 or more authors), or alternatively in a parenthesis (Smith 2000; Smith & Smith 2000; Smith *et al.* 2001). All literature cited in the text must be listed in the references in the following format (see a [sample page here](#) in PDF).

A) Journal paper:

Smith, A. (1999) Title of the paper. *Title of the journal in full*, volume number, page range.

B) Book chapter:

Smith, A. & Smith, B. (2000) Title of the Chapter. *In*: Smith, A, Smith, B. & Smith, C. (Eds), *Title of Book*. Publisher name and location, pp. x–y.

C) Book:

Smith, A., Smith, B. & Smith, C. (2001) *Title of Book*. Publisher name and location, xyz pp.

C) Internet resources

Author (2002) *Title of website, database or other resources*, Publisher name and location (if indicated), number of pages (if known). Available from: <http://xxx.xxx.xxx/> (Date of access).

Dissertations resulting from graduate studies and non-serial proceedings of conferences/symposia are to be treated as books and cited as such. Papers not cited must not be listed in the references.

Please note that (1) **journal titles must be written in full (not abbreviated)**; (2) journal titles and volume numbers are followed by a ", "; (3) page ranges are connected by "n dash", not hyphen "-", which is used to connect two words. For websites, it is important to include the last date when you see that site, as it can be moved or deleted from that address in the future.

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 that means numerals mainly, most frequently sizes, dates and page numbers (e.g. 1977–1981; figs 5–7) and also geographic or name associations (Murray–Darling River; a Federal–State agreement). (3) Em-dash or em-rule (the length of an 'm') are used far more infrequently, and are used for breaks in the text or subject, often used much as we used parentheses. In contrast to parentheses an em-dash can be used alone; e.g. What could these results mean—that Niel had discovered the meaning of life? En-dashes and em-dashes should not be spaced.

6) Legends of **illustrations** should be listed after the list of references. Small illustrations should be grouped into plates. When preparing illustrations, authors should bear in mind that the journal has a matter size of 25 cm by 17 cm and is printed on A4 paper. For species illustration, line drawings are preferred, although good quality B&W or colour photographs are also acceptable. See a guide [here](#) for detailed information on preparing plates for publication.

7) **Tables**, if any, should be given at the end of the manuscript. Please use the table function in your word processor to build tables so that the cells, rows and columns can remain aligned when font size and width of the table are changed. Please do not use Tab key or space bar to type tables.

8) **Keys** are not easy to typeset. In a typical dichotomous key, each lead of a couplet should be typed simply as a paragraph as in the box below:

```
1 Seven setae present on tarsus I ; four setae present on tibia I; leg I longer than the body; legs black in color ...  
Genus A  
- Six setae present on tarsus I; three setae present on tibia I; leg I shorter than the body; legs brown in color ... 2  
2 Leg II longer than leg I ... Genus B  
- Leg II shorter than leg I ... Genus C
```

Our typesetters can easily convert this to a proper format as in this [PDF file](#).

Deposition of specimens

Whenever possible, authors are advised to deposit type specimens in national or international public museums or collections. Authors are also advised to request registration numbers of deposited material in advance of the acceptance of papers to avoid unnecessary delay of publication. Some countries (e.g. Australia) require that primary type specimens be deposited in collections of the country of origin; authors are advised to take this into consideration.

Submission

Please follow the above basic guidelines and check if your manuscript has been prepared according to the style and format of the journal. Authors are encouraged to submit manuscripts by e-mail as attachments to the subject [Editors](#) responsible for your taxa or subject areas; manuscripts on small insect orders without subject editors should be submitted to Dr **Ernest Bernard** (ebarnard@utk.edu); manuscripts on other invertebrate taxa without subject editors should be submitted to the [Chief editor](#).

Prior to submitting a manuscript and figures to an editor, please check our [website](#) if there are two or more editors per subject, and then contact one of these to announce your intention to submit a manuscript for review. Please indicate the size of the manuscript, the number of figures and the format of these files. Your editor can then respond with special instructions, especially for the submission of many image files.

When you submit your manuscript to your editor, it will be more expedient to the review process if you offer the names of three or more potential reviewers with their complete postal and email addresses. It is also important to include the following statements in your cover letter:

1) All authors agree to its submission and the Corresponding author has been authorized by co-authors; 2) This Article has not been published before and is not concurrently being considered for publication elsewhere (including another editor at Zootaxa); 3) This Article does not violate any copyright or other personal proprietary right of any person or entity and it contains no abusive, defamatory, obscene or fraudulent statements, nor any other statements that are unlawful in any way.

Otherwise, your manuscript will not be processed.

For manuscripts with numerous illustrations, which might be saved as separate TIFF or JPG files, for the purpose of review, it will be easier and more efficient for the subject editors and reviewers to have the figures converted into

one larger PDF (Portable Document Format) file, instead of requiring the subject editor to save many files, cutting and copying these into a string of messages/files to the reviewers. You should retain the original figures in a higher resolution format for the final production of the accepted paper. For the text, PDF file along with RTF (Rich Text format) files are preferred. The advantage of submitting a rtf file for the text part of the manuscript is that the reviewers can emend the manuscript electronically. If you can not prepare PDF files, then submit text in RTF and the figures in TIFF (line drawing scanned at 600 dpi and half tone at 300 dpi; please use LZW compression, if you can, to reduce the size of e-files for easy transmission); if halftone TIFF files are too big (exceeding 2 MB), then submit them in jpeg. See [here](#) for detailed information on preparing plates for publication.

Vector files (charts, maps etc) are best submitted as EMF.

If you do not have access to e-mail, you can send three copies of the manuscript by post. Please double space your ms and leave ample margins for printed manuscripts.

Authors of accepted papers will be asked to submit an electronic version of the manuscript so that the publisher needs not to re-key or scan the ms. At this stage, the text part of the ms must be submitted as RTF or MS Word files and figures as TIFF files. Authors please be aware that line drawings must be scanned at 600 or 900 dpi as line art (=1 bit); they must NOT be scanned as 8 bit or full colour images. Please read details [here](#).

In submitting the final version of revised manuscript to editors, authors are asked to provide the following information to all proper typesetting and indexing of the manuscript:

- 1) Corresponding author name and email
- 2) Author last name and running title (<40 characters; to be used in footer)
- 3) Number of plates and cited references
- 4) High taxon name (i.e. taxon section in Zootaxa website) and number of new taxa described in the paper

Authors need to complete and return an Assignment of Copyright form when paper is accepted for publication. Authors of institutions that do not allow transfer of copyrights to publishers (e.g. government institutions such as USDA, CSIRO) should attach a copyright waiver or similar documents.

Review process

When a manuscript is received by the Editor, he/she will have it reviewed by at least two peers qualified to evaluate the manuscript and he/she normally asks the reviewers to complete the review in one month. However, the reviewing process will normally take longer, depending on the length of the manuscript and reviewer's responses.

Publication

Once the manuscript is accepted by your subject editor, final files, produced according to Zootaxa requirement, will be forwarded by your subject editor to the chief editor, who will then link with author and the printer to ensure that the paper is published without unnecessary delay. Normally the proof will be sent to the author for checking 1 to 3 weeks after the final files are accepted. The paper will usually be published with two weeks (for larger papers it will take longer) once the corrections to the proof are received.

Page charge and colour plates. There is **no page charge** for publishing with *Zootaxa*. Publication of **colour figures/photographs** in online edition is also free of charge (print version in black and white). If colour plates in the print edition are desired, authors will be asked to contribute towards the full cost. Current rates: 300 USD for the first colour page; 200 USD for each additional colour page.

Open access. Zootaxa endorses the open access of taxonomic information and has published more open access taxonomic papers than any other journal. Authors who have funds to publish are strongly encouraged to pay a fee of 20 US\$ per printed page to give free online access of their papers to all readers at this site or their own site. Open access papers are read by more people and are expected to have higher citation rates.

Reprints. Each author will be given a **free e-reprint** (PDF) for personal use (printing a copy for own use or exchange with other researchers, but not for deposition in a library/website/ftp-site for public access).

Printed copies of each paper/monograph in the form of the regular reprint can also be produced by the Publisher for purchase by authors at cost to authors, with a discount based on the number of copies ordered.