

LUCAS HENRIQUE DE ALMEIDA

**PERLIDAE (PLECOPTERA) DA SERRA DE PARANAPIACABA,
ESTADO DE SÃO PAULO:**

**integrando informações morfológicas e moleculares na identificação de
espécies**

ASSIS

2018

LUCAS HENRIQUE DE ALMEIDA

**PERLIDAE (PLECOPTERA) DA SERRA DE PARANAPIACABA,
ESTADO DE SÃO PAULO:
integrando informações morfológicas e moleculares na identificação de
espécies**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador(a): Prof. Dr. Pitágoras da Conceição Bispo

Bolsista: FAPESP, p. 2015/22008-9

ASSIS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

A447p Almeida, Lucas Henrique de
Perlidae (plecoptera) da Serra de Paranapiacaba, estado de São Paulo: integrando informações morfológicas e moleculares na identificação de espécies / Lucas Henrique de Almeida. Assis, 2018. 129 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. Pitágoras da Conceição Bispo

1. Insetos aquáticos. 2. Paranapiacaba, Serra de (PR e SP). 3. Taxonomia integrativa. 4. Genética molecular. 5. Biodiversidade. I. Título.

CDD 344.042

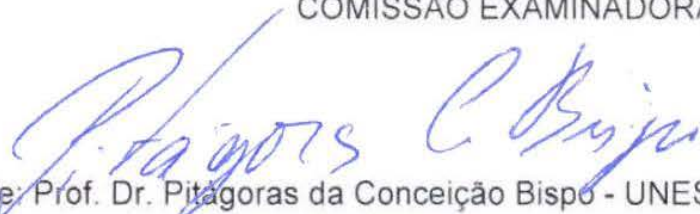
Lucas Henrique de Almeida

**PERLIDAE (PLECOPTERA) DA SERRA DE
PARANAPIACABA, ESTADO DE SÃO PAULO:
integrando informações morfológicas e
moleculares na identificação de espécies**

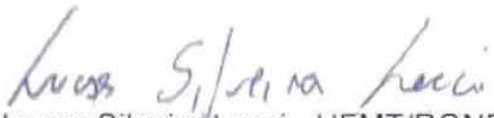
Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestrado Acadêmico em BIOCÊNCIAS (Área de Conhecimento: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA)

Data da Aprovação: **28/02/2018**

COMISSÃO EXAMINADORA


Presidente: Prof. Dr. Pitágoras da Conceição Bispo - UNESP/ASSIS


Membros: Prof. Dr. Sérgio Nascimento Stampar - UNESP/ASSIS


Prof. Dr. Lucas Silveira Lecci - UFMT/RONDONÓPOLIS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pitágoras C. Bispo, pela amizade, exemplo, confiança e ensinamentos, e por ter me orientado pela taxonomia de Plecoptera.

Aos meus pais, Flávio Norberto de Almeida e Livia Maria P. P. de Almeida, por me inspirarem e serem o motivo do meu empenho, pelo apoio e incentivo dados a mim durante toda minha vida, graduação e mestrado.

Aos meus irmãos, Flávio Jr. e Gustavo, por todo apoio, incentivo e torcida, e por terem me lembrado, em muitos momentos, o valor do esforço e dedicação.

À Marina Miguel Ferreira, por ter entrado em minha vida, pelo amor, carinho, incentivo, paciência e todo resto que aqui se encaixa, sendo fundamental nessa etapa.

Aos amigos Carla Floriano, Everton Dias e Tácio Duarte, por terem sido decisivos em muitos momentos para que o meu Mestrado desse certo, devo muito a vocês.

Ao motorista e amigo Luis Francisco Sanches de Oliveira, meu irmão Gustavo e meu amigo Lucas Bassi Costa por me acompanharem durante a coleta na região da Serra de Paranapiacaba.

Aos técnicos de laboratório Alan e Gilberto (*Giba*) por sempre me auxiliarem em tudo que precisei.

Ao Prof. Dr. Sérgio N. Stampar, pelo auxílio prestado solucionando algumas dúvidas no campo da molecular.

Aos integrantes da República Calango: Aron, Guilherme (*Pardella*), João Victor, Layni e Márcio (*Coxa10*), terem feito da minha estadia em Assis uma lição de companheirismo e irmandade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Aquática: Prof. Dr. Ciro C. Z. Branco, Albane, Fábio, Jorge, Lucas Kortz, Mônica, Régis, Rogério, Tássia, Thiago, por terem feito parto do meu dia a dia no laboratório, tornando-o muito mais interessante e produtivo.

À Felipe Leonardo Miguel Ferreira, por ser um amigo que ganhei e por ter realizado a revisão do inglês quando necessitei.

Aos amigos, Gustavo (*Frango*), Orlando, Renato (*Zé*), todos os amigos do Futebol Sagrado e do MITOSe (*melhor time da biologia que já existiu*), pelo apoio de sempre e pela convivência todos esses anos.

Ao Dr. Lucas Silveira Lecci, por autorizar e ceder material para complementar meus estudos.

À Faculdade e Engenharia de Bauru (UNESP-Bauru) pelo empréstimo do veículo 4x4, sem o qual a pesquisa não teria obtido o mesmo sucesso.

Ao financiamento de minha bolsa de mestrado processo nº 2015/22008-9, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao financiamento de projeto de pesquisa processo nº 2012/21196-8, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos funcionários e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da FCL Assis, pelo apoio, suporte e confiança.

E agradeço muito a todos aqueles que merecem, mas que eventualmente eu tenha esquecido.

ALMEIDA, Lucas Henrique de. **Perlidae (Plecoptera) da Serra de Paranapiacaba, Estado de São Paulo: integrando informações morfológicas e moleculares na identificação de espécies**. 2018. 129 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2018.

RESUMO

Plecoptera compreende uma ordem de insetos aquáticos com aproximadamente 3500 espécies conhecidas, sendo distribuídas em 16 famílias. No Brasil são registradas apenas duas famílias, sendo Gripopterygidae e Perlidae. Neste trabalho foram estudadas as espécies de Perlidae da Serra de Paranapiacaba, incluindo os Parques Estaduais Carlos Botelho (PECB), Intervalos (PEI) e Turístico do Alto Ribeira (PETAR), Estado de São Paulo. Com o objetivo de integrar o conhecimento taxonômico ao molecular, obtendo identificações de adultos e a associação adulto-ninfa utilizando *DNA Barcode*. Foram registradas 14 espécies, sendo *Anacroneuria* representado por nove espécies: *A. boraceiensis*, *A. debilis*, *A. fiorentini*, *A. flintorum*, *A. iporanga*, *A. itajaimirim*, *A. polita*, *A. subcostalis* e *A. tupi*. *Kempnyia* por quatro espécies: *K. auberti*, *K. colossica*, *K. flava* e *K. neotropica*. *Macrogynoplax* por apenas uma espécie: *M. veneranda*. Foram realizados dois novos registros (*Anacroneuria debilis* e *A. fiorentini*), duas descrições de imaturos (*A. flintorum* e *A. tupi*) e uma sinonimização (*Kempnyia petersorum*). Adicionalmente, é fornecida uma chave de identificação de adultos da região.

Palavras-chave: Molecular. Insetos aquáticos. Diversidade. Taxonomia integrativa.

ALMEIDA, Lucas Henrique de. **Perlidae (Plecoptera) from Serra de Paranapiacaba, São Paulo State: integrating morphological and molecular information to identify species**. 2018. 129 f. Dissertation (Masters in Biosciences). – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2018.

ABSTRACT

Plecoptera comprises an order of aquatic insects with approximately 3500 species, distributed in 16 families. In Brazil, only two families are recorded, being Gripopterygidae and Perlidae. In this work, were studied the species of Perlidae from Paranapiacaba mountains, including the Carlos Botelho State Park (PECB), Intervales State Park (PEI), and Alto Ribeira Tourist State Park (PETAR), São Paulo State. With the objective of integrating the taxonomic knowledge to the molecular, obtaining identifications of adults and the adult-nymph association using the DNA Barcode. Were recorded fourteen species, being *Anacroneuria* represented by nine species: *A. boraceiensis*, *A. debilis*, *A. fiorentini*, *A. flintorum*, *A. iporanga*, *A. itajaimirim*, *A. polita*, *A. subcostalis* and *A. tupi*. *Kempnyia* by four species: *K. auberti*, *K. colossica*, *K. flava* and *K. neotropica*. *Macrogynoplax* by only one species: *M. veneranda*. Were made two new records (*Anacroneuria debilis* and *A. fiorentini*), two descriptions of nymphs (*A. flintorum* and *A. tupi*), and one synonymization (*Kempnyia petersorum*). In addition, a key is provided for the identification of adults from the region.

Keywords: Molecular. Aquatic insects. Diversity. Integrative taxonomy.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
Insetos de ambientes lóticos	10
Ordem Plecoptera	11
Histórico Taxonômico	14
Contexto Brasileiro	17
Associação entre ninfas e adultos	19
Taxonomia integrativa	21
Análise molecular	24
Perlidae da Serra de Paranapiacaba	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Coletas	26
Identificação e caracterização morfológica	28
Ferramentas moleculares e análises de dados	29
ARTIGO 1. <i>Anacroneuria flintorum</i> Froehlich 2002: notes, distribution, and life stages association using molecular tools	31
Abstract	32
Introduction	32
Material and methods	34
Results and discussion	35
Acknowledgments	48
References	48
ARTIGO 2. Perlidae (Plecoptera) from Paranapiacaba mountains, State of São Paulo, Brazil: notes, new records, synonymy and life stages association using molecular tools	55
Abstract	55
Introduction	56

Material and methods	57
Results and discussion	60
Key identification to male adult of Perlidae	86
Acknowledgments	98
References	98
CONCLUSÕES GERAIS	108
REFERÊNCIAS	109
ANEXO I	129

INTRODUÇÃO

Insetos de ambientes lóticos

As regiões montanhosas brasileiras abrigam uma rica rede hidrográfica com características físico/químicas específicas e com uma elevada diversidade. Em regiões montanhosas, em ambientes lóticos de baixas e médias ordens (até 4ª ordem, *sensu* Strahler, 1957), a maior porção da fauna macroscópica é representada pelos insetos aquáticos, principalmente das ordens Coleoptera, Diptera, Ephemeroptera, Hemiptera, Megaloptera, Odonata, Plecoptera e Trichoptera. Estes insetos, em sua grande maioria, possuem estágios imaturos aquáticos e adultos terrestres. Por esta característica, sofrem os efeitos negativos das atividades antrópicas tanto sobre os ambientes aquáticos (redução da qualidade da água e da integridade física do ambiente lótico), quanto sobre os ambientes terrestres, margens e bacia (remoção da vegetação, erosão, etc). Assim, os insetos aquáticos podem ser importantes indicadores do grau de conservação dos ecossistemas lóticos e da bacia hidrográfica.

Reconhecer os diferentes táxons nos permite visualizar de forma mais completa a biodiversidade, permitindo delinear estratégias mais eficientes de conservação e de monitoramento ambiental. No caso de insetos aquáticos, a taxonomia é basicamente baseada nos adultos machos, por outro lado, conhecer os estágios imaturos é essencial, uma vez que é neste estágio que os indivíduos habitam os ambientes aquáticos, os tornando valiosos instrumentos em estudos de biomonitoramento. Sendo assim, a documentação de adultos e estágios imaturos de insetos aquáticos, pode nos dar condições para compreender os principais fatores

ecológicos e evolutivos que geram e mantem a diversidade, além de auxiliar nos estudos de biomonitoramento.

Ordem Plecoptera

A ordem Plecoptera possui aproximadamente 3500 espécies descritas, distribuídas em 16 famílias, habitando todas as regiões do mundo, com exceção da Antártica (Zwick, 2000; Fochetti & Tierno de Figueroa, 2008). Os registros fósseis mais antigos datam do período Carbonífero Superior, há cerca de 300 milhões de anos (Béthoux *et al.*, 2012).

Os plecópteros são insetos que possuem ciclo de vida aquático quando imaturos e terrestres alados quando adultos. Caracterizam-se por possuírem desenvolvimento incompleto, geralmente corpo achatado dorso-ventralmente, tamanho entre 4 e 60 mm, antenas filiformes, dois cercos no final do abdômen e asas posteriores que se dobram em forma de leque quando em repouso, sendo alguns grupos predadores, ao passo que outros são detritívoros e raspadores (Zwick, 1980; Stewart & Harper, 1996; Lecci & Froehlich, 2006; Froehlich, 2012).

Nos adultos, os dois pares de asas articuladas são do tipo membranosas e se dobram sobre o abdômen. Estas são caracterizadas por possuírem *arculus*, e pelas asas posteriores apresentarem a nervura RP fundida com M na base (Béthoux, 2005). A asa anterior é alongada e relativamente estreita, ao passo que a posterior é mais curta e possui geralmente um lobo anal bem desenvolvido que se dobra em leque quando em repouso (Pennak, 1978). Dobra esta que explica o nome da ordem, *pleco* = entrelaçar, dobrar; *pteron* = asa (Froehlich, 2012). Algumas espécies possuem asas reduzidas (Illies, 1963), ou ausentes (McLellan, 2001).

A cabeça dos plecópteros é prognata e na maioria dos casos achatada, apresentando ampla articulação com o pronoto. Possuem dois ou três ocelos e dois olhos compostos desenvolvidos, as antenas são filiformes, multisegmentadas e longas (Stark *et al.*, 2009). Tarsos tri-segmentados (Stark *et al.*, 2009). O corpo é geralmente um pouco achatado dorso-ventralmente, pouco esclerosado, apresentando coloração entre o marrom escuro e o cinza e em algumas espécies colorações vibrantes. O abdômen é formado por onze segmentos sendo dez distintos e visíveis, no macho o nono esternito e na fêmea o oitavo formam uma placa subgenital. No 11º segmento existe um par de cercos multissegmentados e longos e um par de paraproctos, os cercos podem ser reduzidos para um ou dois segmentos em algumas espécies (Hynes, 1976; Stewart & Harper, 1996; Froehlich, 2012). As gônadas possuem formato de "laço", nos machos a vesícula seminal localiza-se na porção anterior do "laço", os ovários ou testículos apresentam-se fundidos na região mediana (Zwick, 2000).

Os machos de alguns grupos apresentam em sua placa subgenital uma estrutura chamada martelo (geralmente cônico e esclerosado), importante em algumas espécies de Arctoperlários, por dar início a troca de sinais sonoros entre os adultos com o objetivo de encontrar um parceiro para o acasalamento, comportamento chamado de "*drumming*". O macho bate seu martelo contra o substrato, com isso emite uma frequência específica respondida pelas fêmeas virgens da espécie, posteriormente o macho aproxima-se da fêmea ocorrendo a cópula (Stewart, 1997).

O ovipositor é ausente nas fêmeas da ordem, porém, quando presente é um prolongamento dos esternos 8 e 9 ou apenas do 8 (Zwick, 1980). Na maioria das espécies a colocação dos ovos acontece durante o vôo, começando com o acúmulo

dos ovos no final do abdômen formando uma massa ou aglomerado, quando chega o momento a fêmea mergulha o abdômen na água corrente liberando a massa ovos, que afunda e prende-se em algum substrato (Hynes, 1976; Pennak, 1978; Zwick, 2000).

Os indivíduos adultos são voadores fracos e por isso são encontrados nas proximidades dos riachos. Apresentam hábitos alimentares variados, alguns não se alimentam e outros bebem apenas água, como por exemplo, os perlídeos que possuem as peças bucais atrofiadas (Hynes, 1976), ao passo que aqueles que se alimentam, irão consumir líquens (Froehlich, 1969), algas verdes, frutos ou botões foliares (Hynes, 1976).

Os imaturos são comumente encontrados no substrato de riachos de corredeira com águas limpas e altamente oxigenadas. Por tais motivos são utilizados, em países da América do Norte e Europa, como bioindicadores de qualidade de água em programas de biomonitoramento, juntamente com os imaturos de Ephemeroptera e Trichoptera (Rosenberg & Resh, 1993).

As ninfas jovens consomem material particulado fino e, ao longo do crescimento, se tornam predadoras, raspadoras ou fragmentadoras. As ninfas respiram através do tegumento ou de brânquias filamentosas, dispostas ao longo do tórax e/ou no final do abdome, as quais são importantes caracteres taxonômicos. A natação acontece por ondulações laterais do corpo, graças a presença de fortes músculos oblíquos entre os segmentos corpóreos (Zwick, 1980, 2000). O tempo de desenvolvimento do estágio imaturo varia de espécie para espécie e em função das condições ambientais, podendo durar de três meses a anos (Romero, 2001) e variar de 12 a 36 instares (Pennak 1978).

Histórico Taxonômico

Linnaeus (1758), em seu trabalho *Systema Naturae*, agrupou os plecópteros em Neuroptera junto as atuais ordens Ephemeroptera, Megaloptera, Neuroptera, Odonata e Trichoptera. Geoffroy (1762) criou o gênero *Perla* agrupando as espécies conhecidas atualmente como plecópteros (Zwick, 1980). Burmeister (1839) separou a ordem Plecoptera das demais, por conta das suas asas posteriores levemente mais curtas e a presença de um lobo anal desenvolvido que se dobra. Além de separar a ordem também a relacionou com Orthoptera, e posteriormente com Megaloptera e Trichoptera pela semelhança apresentada por suas asas anteriores (Zwick, 2009). Ainda hoje, a posição de Plecoptera dentro de Hexapoda está em discussão, sendo que existem hipóteses indicando que a ordem possa ser grupo-irmão de todos os Neoptera ou de todos os Polyneoptera, ao passo que alguns trabalhos sugerem que Plecoptera possui parentesco próximo com Embioptera ou Phasmatodea (Zwick, 2009).

Klapálek (1909) e Enderlein (1909) dividiram a ordem Plecoptera em duas subordens levando em conta as características do aparelho bucal. Klapálek nomeou aqueles com palpo maxilar subcilíndrico de Setipalpia ou Subpalpia, já os com palpos filiformes, de Filipalpia. Enquanto Enderlein dividiu a ordem de outra maneira, diferentemente de Klapálek, sugerindo como critério a presença ou ausência de mandíbulas nos adultos, constituindo dessa forma duas subordens, a Systellognatha e a Holognatha (Zwick, 2000).

Anteriormente, Burmeister (1839) já teria separado ambos os grupos utilizando os mesmos caracteres que Klapálek e Enderlein, configurando uma sinonímia dos sistemas de classificação. Depois de quase um século, Frison (1935)

constatou que nem todos os plec6pteros que apresentavam palpos longos possuam mandbulas reduzidas nos adultos. Illies (1965) criou uma terceira subordem Archiperlaria, originaria da divis6o do grupo Filipalpia, por possuirem grande tamanho, colora7o brilhante, al6m de outros caracteres. De acordo com Zwick (1974), as subordens Filipalpia e Archiperlaria estariam unidas apenas pela aus6ncia de determinados caracteres, e apenas a subordem Setipalpia possuiriam caracteres derivados, como mandbulas reduzidas do adulto e alongamento dos tarsos.

Atualmente, o trabalho de Zwick (2000) apresenta a proposta de classifica7o mais aceita, na qual os plec6pteros est6o divididos em duas subordens. Uma originaria da Laur6sia, de nome Arctoperlaria, e a outra de origem gondw6nica austral, chamada Antarctoperlaria (Zwick, 2000) (Figura 1). Arctoperlaria 6 formada por dois grupos, sendo que cada um deles possui seis fam6lias, Euholognatha (Capniidae, Leuctridae, Nemouridae, Notonemouridae, Scopuridae e Taeniopterygidae) e Systellognatha (Chloroperlidae, Perlidae, Perlodidae, Peltoperlidae, Pteronarcyidae e Styloperlidae). Seu nome faz refer6ncia aos seus representantes que s6o encontrados em sua maioria no Hemisf6rio Norte ou Regi6o Hol6rtica. Apenas duas fam6lias, Notonemouridae e Perlidae, ocorrem no Hemisf6rio Sul. J6 Antarctoperlaria possui nome que remete 6 distribui7o circum-ant6rtica de seus representantes, encontrados no Hemisf6rio Sul excetuando-se a 6frica e Madagascar. Esta subordem 6 constitu6da de duas superfam6lias, Eusthenioidea, que 6 dividida em duas fam6lias (Diamphipnoidae e Eustheniidae), e Griptopterygoidea, que tamb6m possui duas fam6lias (Austroperlidae e Griptopterygidae) (Zwick, 2000).

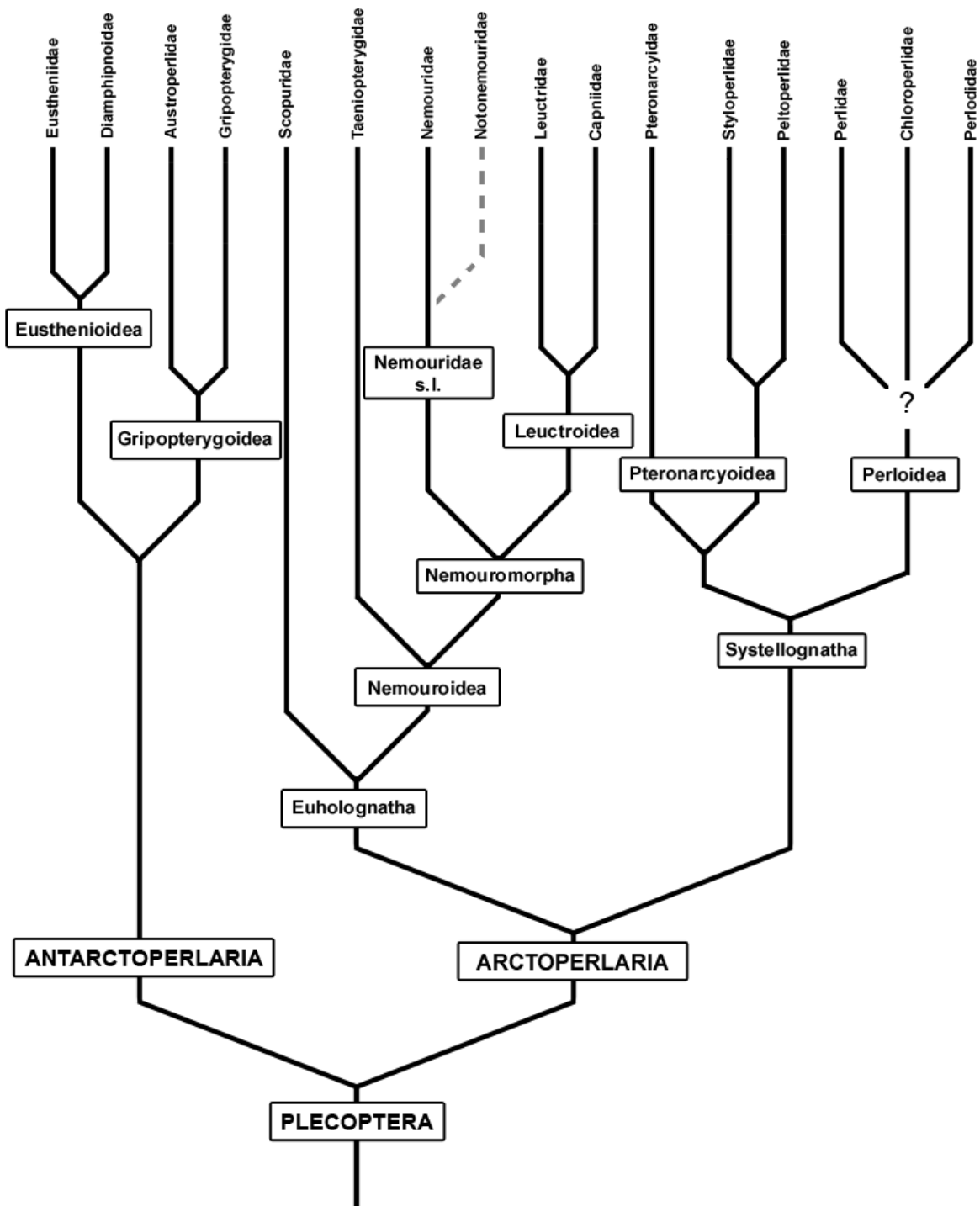


FIGURA 1. Filogenia de Plecoptera, modificado de Zwick (2000).

Contexto Brasileiro

No Brasil, os representantes da ordem Plecoptera totalizam mais de 150 espécies descritas (Lecci & Froehlich, 2006), distribuídas em duas famílias, Gripopterygidae e Perlidae (Froehlich, 1981; Bispo & Froehlich, 2008; Bispo & Lecci, 2011). Ambas compreendem quatro gêneros cada, sendo Gripopterygidae representada por *Gripopteryx* (Pictet 1841), *Paragripopteryx* Enderlein 1909, *Tupiperla* Froehlich 1969 e *Guaranyperla* Froehlich 2001, e Perlidae por *Anacroneuria* Klapálek 1909, *Enderleina* Jewett 1960, *Kempnyia* Klapálek 1914 e *Macrogynoplax* Enderlein 1909.

Da mesma forma que as demais ordens de insetos aquáticos, há uma escassez de informações taxonômicas da ordem Plecoptera para algumas regiões do Brasil. O conhecimento referente a ordem melhorou principalmente, após os trabalhos taxonômicos de Jewett (1959, 1960), Illies (1963, 1966), Froehlich (1969, 1984, 1988, 1990, 1994, 1998) e Zwick (1972, 1973a). Mesmo assim, e com os trabalhos atuais, pouco se conhece sobre os estágios imaturos (como exceção ver Bispo & Froehlich, 2008; Bispo et al., 2013; Novaes et al., 2012; Avelino-Capistrano et al., 2011a, 2011b e 2014, 2016; Ribeiro & Gorayeb, 2014, 2015; Ribeiro et al., 2015).

Traçando a situação dos estudos realizados para cada região do país é possível notar que o número de espécies descritas atualmente é com certeza subestimado. O conhecimento da fauna de Plecoptera da Amazônia brasileira tem melhorado devido aos trabalhos de Ribeiro-Ferreira (1996), Froehlich (2002, 2003), Ribeiro-Ferreira & Froehlich (1999, 2001) e Ribeiro & Rafael (2005, 2007). A região Nordeste, possui trabalhos antigos (Navás, 1926; Klapálek, 1922) e tem recebido

novos estudos, principalmente para o Estado da Bahia, como por exemplo, Lecci & Froehlich (2011b), Righi-Cavallaro *et al.* (2013), Duarte & Lecci (2016), Duarte *et al.* (2014a, 2014b). Para o Centro Oeste existem os trabalhos de Bispo *et al.* (2005, 2014), Bispo & Froehlich (2004, 2007), Froehlich (2007), Righi-Cavallaro & Lecci (2010) e Novaes & Bispo (2014c). A região Sudeste é a que apresenta o melhor conhecimento e mais trabalhos publicados, principalmente para o Estado de São Paulo, devido aos trabalhos do Prof. C. G. Froehlich e colaboradores (ver Froehlich, 2011b). A região Sul apresenta somente os trabalhos de Jewett (1959), Froehlich (2002b), De Ribeiro & Froehlich (2007), Novaes & Bispo (2014a, 2014b) e Novaes *et al.* (2016). A subestimação do número de espécies fica clara pela ausência de registros para a ordem em alguns estados da região Norte e Nordeste (Froehlich 2011).

Considerando os gripopterigídeos brasileiros, *Gripopteryx* (Pictet 1841) possui dezesseis espécies descritas, *Paragripopteryx* Enderlein 1909 apresenta doze espécies e *Tupiperla* Froehlich 1969 treze. Estes gêneros podem ser encontrados desde a região Sul até as regiões montanhosas da região Central (Froehlich, 2012), e até a região Nordeste pelo litoral (Lecci & Froehlich, 2011b). Apenas *Guaranyperla* Froehlich 2001 apresenta distribuição restrita, sendo encontrado em algumas cadeias montanhosas do Sudeste do Brasil (Froehlich, 2012).

Considerando os perlídeos brasileiros, *Anacroneuria* Klapálek 1909 possui aproximadamente 80 espécies e é o gênero dominante em Plecoptera com a maior distribuição na região Neotropical (Froehlich 2012), podendo ser encontrado em praticamente todo o país. *Enderleina* Jewett 1960 possui seis espécies e é restrito à região amazônica. *Kempnyia* Klapálek 1914, com 37 espécies, ocorre da região Sul

até o centro do Brasil, chegando pelo litoral até o Estado da Bahia. *Macrogynoplax* Enderlein 1909 apresenta sete espécies, destas apenas uma é encontrada em regiões montanhosas do Estado de São Paulo, sendo as demais encontradas na região amazônica (Ribeiro & Gorayeb, 2016).

Associação entre ninfas e adultos

Needham & Broughton (1927) realizaram a primeira descrição de um imaturo da ordem Plecoptera para a Região Neotropical. A ninfa do gênero *Anacroneuria* era proveniente da Colômbia e foi descrita com base no aparelho bucal e na quetotaxia dos cercos e das pernas. Mais tarde, Samal (1932), utilizando material do Chile, realiza a descrição da ninfa de *Diamphiphoa virescentipenis* (Blanchard), evidenciando detalhes da cabeça, pronoto, mesonoto, aparelho bucal e o último segmento abdominal. Posteriormente, Hynes (1948) e Aubert (1956) descreveram as ninfas de *Anacroneuria araucana* Kimmins e *Andiperla willinki* Aubert, respectivamente.

Illies (1958, 1963, 1964a, 1964b, 1964c, 1965) realizou trabalhos que contribuíram muito para o conhecimento acerca das ninfas da Região Neotropical. Em seus trabalhos foram descritas vinte ninfas, destacando a morfologia do aparelho bucal, quetotaxia e a forma e a distribuição das brânquias.

Após estes trabalhos e até os anos 2000, outros trabalhos foram publicados descrevendo ninfas. Maldonado *et al.* (2002) descrevem ninfas de *Anacroneuria* para a região da Venezuela. Stark & Kondratieff (2004), descrevem ninfas também de *Anacroneuria* para o México e Meso America. McLellan (2001, 2005, 2006) fez grande contribuição descrevendo diversas ninfas de Gripopterygidae, principalmente

para a região da Argentina e Chile. Ainda para a mesma região, Vera (2005a, 2005b, 2006a, 2006b, 2006c, 2007), Pessacq (2008, 2009) e Pessacq & De Paul Marcela (2015) publicaram trabalhos incluindo descrição de ninfas desta mesma família.

No Brasil, Froehlich (1984b) realizou a descrição da ninfa de *Macrogynoplax veneranda* Froehlich, sendo o primeiro registro do gênero para a Região Sudeste e a primeira descrição de ninfa para o gênero. Froehlich (1990, 1993) descreveu oito ninfas de Gripopteryx. A primeira descrição de ninfa de *Kempnyia*, da espécie *K. tijucana* Dorvillé & Froehlich, foi feita por Dorvillé & Froehlich (2001). Posteriormente, Bispo & Froehlich (2008) descrevem a ninfa de *K. neotropica* (Jacobson & Bianchi) e Bispo *et al.*, (2013) a de *K. colossica* (Navás). Avelino-Capistrano *et al.* (2011b, 2014, 2016) colaboraram descrevendo as ninfas de *K. gracilenta* (Enderlein), *K. reticulata* (Klapálek), *K. alterosarum* Froehlich, *K. petersorum* Froehlich, *K. obtusa* Klapálek e *K. couriae* Avelino-Capistrano, Barbosa & Takiya. Para *Anacroneuria* as descrições mais atuais de ninfas são de Avelino-Capistrano *et al.* (2011a), Novaes *et al.* (2012) e Ribeiro *et al.* (2015).

Na maioria dos estudos citados, a associação foi realizada através da criação das ninfas. No entanto, esta tem se demonstrado uma tarefa difícil, já que as ninfas são muito sensíveis às mudanças dos padrões físicos e químicos da água, como por exemplo, temperatura, velocidade da água e oxigênio dissolvido. Estes requisitos ambientais específicos dificultam a criação das ninfas em laboratório.

Needham (1899) apresentou um método de criação utilizando uma gaiola, que deveria ser colocada em um trecho lântico e com substrato do próprio riacho. Em 1931, Claassen desenvolveu algo bastante parecido com o de Needham, só que nesse método as ninfas deveriam ser observadas e alimentadas até emergirem. Para contornar os problemas da criação das ninfas, Kapoor (1972) desenvolveu um

mecanismo de madeira com um tanque e uma bomba d'água de fluxo contínuo. As metodologias demonstradas por estes autores foram feitas com base em ninfas da Região Neártica, com biologia bastante diferente das neotropicais. Assim, não necessariamente os métodos supracitados tem êxito quando aplicados em ninfas neotropicais e em muitos casos é necessário fazer adaptações.

Ribeiro & Rafael (2005) conseguiram, para a Região Amazônica, sucesso na criação das ninfas dentro dos riachos, assim como Bispo *et al.* (2013) na Região Sudeste. Os criadouros artificiais também têm demonstrado grande eficácia (ver Ribeiro, 2004; Avelino-Capistrano, 2010, 2011a, 2011b; Dorvillé, 1998). Em trabalho publicado em 2012, na tentativa de criar ninfas de correnteza, Novaes *et al.* (2012) utilizaram um mecanismo semelhante ao de Kapoor (1972), confeccionado em acrílico.

Mesmo com o aprimoramento das técnicas de associação de ninfas a adultos através da criação do estágio imaturo, poucas ninfas estão descritas. A aplicação de ferramentas moleculares talvez seja a alternativa mais eficiente para solucionar os problemas enfrentados nas tentativas de criação dos estágios imaturos (Mynott *et al.*, 2011). Como aplicação desta estratégia para a fauna brasileira de Plecoptera temos os trabalhos de Avelino-Capistrano *et al.* (2014, 2016).

Taxonomia integrativa

Proporcionar rapidamente a identificação correta dos táxons tem se mostrado um grande desafio, sobretudo, diante de um cenário de rápida degradação ambiental e altas taxas de extinção local. Por outro lado, o interesse de novos pesquisadores pela taxonomia tem diminuído, dificultando a construção do

conhecimento e o acesso às informações taxonômicas (CBD, 2008). Adicionalmente, a carência de verba para fomentar pesquisas básicas na área (CBD, 2008) tem dificultado este processo. Como consequência, a documentação da diversidade de táxons tem sido difícil, criando obstáculos para outras áreas de conhecimento.

Nos últimos anos, a comunidade científica tem discutido as possibilidades para diminuir as consequências do impedimento taxonômico na produção do conhecimento sobre a biodiversidade. Produzir guias de identificação, investir em coleções científicas, garantir investimentos em pesquisas básicas, formar novos taxonomistas e implementar métodos auxiliares à identificação morfológica são as principais sugestões propostas (Godfray, 2002; Carvalho *et al.*, 2007; CBD, 2008), sendo a última a que tem recebido maior destaque, como por exemplo, utilização de ferramentas moleculares e tecnologias da informática.

A junção dos métodos tradicionais e as novas ferramentas tem sido chamada de Taxonomia Integrativa (Goldstein & DeSalle, 2010; Pires & Marinoni, 2010), a qual busca solucionar problemas taxonômicos ainda não resolvidos. Um dos grandes diferenciais desta nova taxonomia é o uso de marcadores moleculares, utilizados efetivamente para auxiliar na delimitação de espécies de diferentes grupos (Hebert *et al.*, 2003a). Muitos destes marcadores fazem parte do DNA mitocondrial (*mtDNA*) que, por apresentarem elevada taxa mutacional, possuem herança materna (podendo haver exceções) e a ausência de recombinação, são capazes de distinguir espécies, mesmo que estas sejam proximamente relacionadas.

Além disso, a ortologia (descendência de um mesmo ancestral) dos genes do *mtDNA*, possibilita que a quantidade e a composição dos genes continuem consideravelmente conservadas entre os metazoários (Hillis *et al.*, 1996). Mesmo

assim, existem situações que podem trazer dificuldades em estudos com genes ortólogos, como por exemplo a heteroplasmia, que é a ocorrência conjunta de dois ou mais haplótipos de *mtDNA* num único indivíduo (Avice, 2000); a possibilidade de duplicação do gene alvo e a presença *numts* ou pseudogenes. Destes, é importante relatar que a heteroplasmia já é bem documentada em insetos (Solignac *et al.*, 1983; Paduan & Ribolla, 2008; Magnacca & Brown, 2010).

Hebert *et al.* (2003a) sugeriram o uso de um fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), com cerca de 650 pares de bases (pb) partindo da base 58 da extremidade 5', como marcador universal de confiabilidade para a identificação no nível específico, o qual foi dado o nome de *DNA barcode*. A ideia é que a pequena sequência de DNA funcionaria como um código de barras identificando espécies através da sequência das quatro bases nitrogenadas do DNA (adenina, citosina, guanina e timina).

Pensando em identificar toda a biodiversidade possível, um banco de dados foi criado, o *DNA Barcode of Life Data System* (BOLD). Neste banco de dados as sequências de COI obtidas das espécies seriam depositadas após identificação por taxonomistas, sendo este banco de dados de acesso público. Este sistema ainda ofereceria um sistema de comparação entre sequências, para que fosse possível a identificação de espécies.

A técnica do *DNA barcode* foi primeiramente aplicada apenas para identificar espécie, porém, com o tempo o método ganhou novas utilidades, por exemplo: identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004a; Smith *et al.*, 2006), reconstrução filogenética (Tavares *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008) e conservação (Hajibabaei *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010).

Análise molecular

O trabalho de Hebert *et al.* (2003a) demonstrou que o marcador molecular COI foi eficaz na identificação de espécies, porém, a amostragem para Plecoptera foi pequena, abrangendo apenas seis famílias em sua análise. A ordem Lepidoptera recebeu uma análise mais detalhada, com mais exemplares, que resultou em 100% de êxito nas identificações, demonstrando o potencial do COI. A partir de então, trabalhos com a ordem Plecoptera utilizando o COI como marcador começaram a ser realizados com diversas finalidades, como por exemplo, identificação de espécies crípticas (Boumans & Baumann, 2012; Graf *et al.*, 2008), associação de ninfas e adultos (Mynott *et al.*, 2011; Tierno de Figueroa *et al.*, 2011) e reconstruções filogenéticas (Fochetti *et al.*, 2011).

No método de *DNA barcode*, as distâncias entre as sequências são calculadas com quase em suas diferenças, desta maneira é esperado que as distâncias intraespecíficas sejam menores que as interespecíficas. Nos trabalhos de Hebert *et al.* (2003a, 2003b), a distância encontrada para a variação intraespecífica para a ordem Lepidoptera foi de 3%, já Zhou *et al.*, (2009) encontraram 2% de variação intraespecífica para as ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (EPT). Desde então, estes valores têm sido utilizados por diversos pesquisadores como referência para separar espécies em suas análises (Graf *et al.*, 2008; Tierno de Figueiroa *et al.*, 2011).

Para a ordem Plecoptera, alguns estudos já foram realizados, como por exemplo: em uma análise de 34 indivíduos; Tierno-de-Figueroa *et al.* (2011) encontraram variação intraespecífica de 0 a 2,8% ao estudarem dois grupos de *Isoperla* (Perlidae). Para o Brasil, Avelino-Capistrano *et al.* (2014) ao estudarem o

gênero *Kempnyia* encontraram variação intraespecífica de 0 a 15,1%, é importante lembrar que algumas espécies dessa análise necessitam de estudos mais específicos, em função dos altos valores de divergência encontrados, as variações morfológicas demonstradas na literatura e sua distribuição geográfica. Em outro estudo Avelino-Capistrano *et al.* (2016), descrevendo nova espécie para o mesmo gênero, encontrou divergência interespecífica de 16,4 a 23,9%.

As divergências intra e interespecíficas em função da escala geográfica tem produzido discussões entre os pesquisadores. Se a distância geográfica aumentar as divergências intraespecíficas aumentarão, ao mesmo tempo as divergências interespecíficas diminuem, gerando dificuldade e menor sucesso na identificação de espécimes desconhecidos (Bergsten *et al.*, 2012). É necessário conhecimento regional e histórico de especiação para diminuir os efeitos geográficos e isolamento reprodutivo, a fim de interpretar os resultados utilizando esta abordagem corretamente (Bergsten *et al.*, 2012).

Perlidae da Serra de Paranapiacaba

A fauna de Perlidae para esta região é bastante conhecida principalmente devido ao trabalho de Bispo & Froehlich (2004), que catalogou as espécies da família para o PEI. Neste trabalho são catalogadas uma espécie de *Macrogynoplax*, cinco de *Kempnyia* e nove de *Anacroneuria*. O trabalho em questão focou apenas com espécimes adultos, não havendo associação de imaturos. Duas ninfas foram descritas posteriormente nos trabalhos de Bispo & Froehlich (2008) e Bispo *et al.* (2013), descrevendo respectivamente as ninfas de *K. neotropica* (Jacobson & Bianchi) e *K. colossica* (Navás). Estes trabalhos foram concentrados no PEI, e

possivelmente a fauna documentada até o momento não represente toda a diversidade de Perlidae existente na Serra de Paranapiacaba. Além disso, poucas ninfas são conhecidas, mesmo para as espécies do PEI.

Para efeito ilustrativo, no Estado de São Paulo são conhecidas 33 espécies da família Perlidae, sendo que destas apenas dez espécies possuem ninfas descritas. Na região da Serra de Paranapiacaba, foco do presente trabalho, são descritas 14 espécies desta mesma família, porém, apenas cinco espécies possuem suas ninfas descritas.

Dessa forma, é possível que a região apresente ocorrências de espécies diferentes das já encontradas, tendo em vista que os trabalhos realizados se concentraram no PEI. Além disso, é necessário descrever os estágios imaturos das espécies, para que estas possam ser utilizadas em programas de biomonitoramento ambiental e para completar ainda mais o conhecimento para a região e para o Brasil.

No presente trabalho, coletas de espécimes de Perlidae (Plecoptera) foram realizadas na Serra de Paranapiacaba com os objetivos de identificar morfologicamente as espécies ocorrentes na região e posteriormente obter as sequências de parte do gene mitocondrial COI para cada uma delas, obter a associação adulto-ninfa utilizando as sequências do COI e descrever as ninfas das espécies associadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

Os espécimes foram coletados na Serra de Paranapiacaba, mais especificamente ao longo do Contínuo Ecológico de Paranapiacaba, nos Parques

Estaduais Turístico do Alto do Ribeira (PETAR), Intervalos (PEI) e Carlos Botelho (PECB), região conhecida por conservar um dos maiores remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, com mais de 120.000 hectares de área protegida (<http://www.ambiente.sp.gov.br/parque-intervalos/>).

A Serra de Paranapiacaba é uma das áreas de Mata Atlântica mais bem preservadas do Brasil e localiza-se na Serra do Mar do Estado de São Paulo. A Serra do Mar consiste em um sistema montanhoso com altitude máxima próxima a 2200 metros e percorre aproximadamente 1000 quilômetros em extensão, percorrendo a costa brasileira do Estado do Espírito Santo ao sul de Santa Catarina, abrangendo a região mais populosa do país, (http://www.rbma.org.br/anuario/mata_06_smar.asp).

As coletas foram realizadas sob lua nova, situação na qual existe maior probabilidade de se coletar um número satisfatório de adultos. A partir do crepúsculo, os adultos foram coletados por atração luminosa utilizando luz mista contra um pano branco (Vanzolini & Papávero, 1967) tendo como fonte de energia um gerador a gasolina. Adicionalmente, foram utilizadas bandejas com álcool 96% com luz ultravioleta e branca alimentadas por bateria (Calor & Mariano, 2012). Estas coletas foram realizadas próximas aos riachos. Durante o dia, os adultos foram coletados em meio a vegetação com o auxílio de puçás, já as ninfas em ambientes lóticos utilizando rede D. Todo material coletado foi fixado diretamente em álcool absoluto e armazenado em freezer -20 °C para garantir a preservação do DNA.

A maior parte do material analisado foi coletado pelo autor (LHA) e colaboradores (Gustavo Alberto de Almeida e Lucas Bassi Costa), pelo orientador (PCB), por Claudio Gilberto Froehlich (CGF), Henrique Paprocki (HP), Adriano Sanches Melo (ASM) e Lucas Silveira Lecci (LSL).

Identificação e caracterização morfológica

A análise morfológica e identificação dos espécimes foram realizadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio e de um microscópio óptico. Os machos adultos e as ninfas foram identificados com base, principalmente nos trabalhos de Zwick (1972, 1973a), Dorvillé & Froehlich (1997), Froehlich (1969; 1984; 1988; 1990; 1996, 2001, 2004), Bispo & Froehlich (2004, 2008), Bispo & Lecci (2011), Avelino-Capistrano *et al.* (2011a), Bispo *et al.* (2013) e através de comparações com espécimes de museus. A associação das ninfas aos adultos foi realizada utilizando ferramentas moleculares (e.g. Avelino-Capistrano *et al.*, 2014) e a descrição das ninfas foi realizada conforme procedimento adotado em Bispo & Froehlich (2008), Novaes *et al.* (2012) e Bispo *et al.* (2013). Todo material coletado foi depositado no Laboratório de Biologia Aquática da Unesp de Assis.

A caracterização das espécies em pranchas foi realizada com base nos espécimes coletados e na coleção do laboratório, sendo obtidas fotografias em alta resolução da cabeça e pronoto dos espécimes através de um microscópio estereoscópio Leica 450a, que posteriormente receberam tratamento no Adobe Photoshop CS3 Extended. A placa subgenital e a genitália do macho foram desenhadas com o auxílio de câmara clara acoplada a um microscópio óptico Leica DM1000, em lente objetiva de aumento de 4x e 10x respectivamente. Com base nos desenhos foram feitas ilustrações utilizando o programa Adobe Illustrator CS6.

Para obter a placa subgenital e a genitália foi necessário a preparação dos espécimes. Neste processo, a parte final do abdômen foi separada e em seguida clareada em KOH (concentração de 10% em temperatura ambiente durante 12 horas). No dia seguinte, a peça foi banhada rapidamente em ácido acético para

neutralização do KOH. Posteriormente, em álcool, foram retirados resquícios musculares e em seguida a placa subgenital e a armadura penial foram analisadas, armazenadas em microtubos e conservadas com glicerina pura ou álcool absoluto.

Após a identificação, espécimes adultos de cada espécie e morfotipos de ninfas de elevado ínstar ainda não conhecidas tiveram seus DNAs extraídos, amplificados e levados para sequenciamento.

Ferramentas moleculares e análises de dados

A extração do DNA e obtenção do setor do gene mitocondrial COI foram realizadas a partir de partes dos espécimes coletados, principalmente pernas. As partes não utilizadas dos espécimes foram armazenadas em microtubos contendo álcool absoluto, devidamente etiquetados (data, coletor, local e código de acesso ao GenBank), e acondicionados a -20° C em freezer como material testemunho na Coleção Entomológica do Laboratório de Biologia Aquática da Faculdade de Ciências e Letras da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Assis, SP.

Foi realizada a associação entre adultos e ninfas com base no gene mitocondrial COI. Neste caso foram utilizadas as sequências obtidas para os adultos (devidamente identificados) e as sequências de ninfas de cada morfótipo amostrado. A associação foi realizada com base em árvores obtidas a partir da análise das sequências COI, levando em conta os morfótipos das ninfas e os adultos machos identificados.

Para extrair o DNA foi utilizado DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A amplificação do DNA foi realizada via PCR (Polymerase Chain

Reaction), neste processo foram utilizados os primers LCO-1490 combinado ao HCO-2198 (Folmer *et al.*, 1994, Simon *et al.*, 1994).

Os procedimentos moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Aquática da UNESP/Assis. A purificação e o sequenciamento do DNA foram realizados em empresa especializada (e.g. Macrogen, Helixxa, entre outras). As sequências prontas foram alinhadas com a utilização do programa MEGA (versão 6; Tamura *et al.*, 2013), através do método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Os haplótipos tiveram a distância entre eles aferida par-a-par pelo método Kimura 2 parâmetros (K2P), já os grupos monofiléticos foram delimitados pelo uso do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbour-Joining* – NJ). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa MEGA.

Resultados

Como resultado da Dissertação, confeccionamos dois manuscritos, um deles já publicado na revista *Zootaxa*, ambos estão de acordo com as normas de publicação da revista *Zootaxa* (ANEXO I) e são apresentados a seguir.

ARTIGO 1. *Anacroneuria flintorum* Froehlich 2002: notes, distribution, and life stages association using molecular tools. *Zootaxa* 4370 (4): 409-420.

LUCAS HENRIQUE DE ALMEIDA^{1,5}, MAÍSA DE CARVALHO GONÇALVES³,
MARCOS CARNEIRO NOVAES⁴, RAYNER CONSTANTINO PARESQUI³ &
PITÁGORAS DA CONCEIÇÃO BISPO².

1: *Laboratório de Biologia Aquática, Programa de Pós-Graduação em Biociências, FCLA, Universidade Estadual Paulista, Assis, São Paulo, Brazil. E-mail: lucasalmeida768@yahoo.com.br.*

2: *Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Ciências Biológicas, FCLA, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, SP, Brazil. E-mail: pcbispo@gmail.com.*

3: *Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES/CEUNES), Rodovia BR 101 Norte, Km 60, Bairro Litorâneo, São Mateus - ES, CEP 29932-540, Brazil (<http://insetosaquaticos.com.br/>)*

4: *Laboratório de Ecologia Comportamental de Aracnídeos, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Sociedade, Universidade Estadual de Goiás, Morrinhos - GO, CEP 75650-000*

5: *Corresponding author. E-mail: lucasalmeida768@yahoo.com.br. FCLA, UNESP. Avenida Dom Antônio, 2100. CEP 19806-900. Parque Universitário. Assis – SP. Brazil.*

Abstract

Specimens of the perlid stonefly *Anacroneuria flintorum* from different regions in Brazilian Atlantic Forest along the Atlantic coast of Brazil were studied. In this paper, the nymph of *A. flintorum* is described based on reared specimens and molecular associations. Additionally, we provide new locality records and comments about variation of the species.

Keywords: Neotropical, COI, aquatic insects, streams, nymph description.

Resumo

Espécimes do plecóptero perlídeo *Anacroneuria flintorum* de diferentes regiões da Mata Atlântica Brasileira ao longo da costa Atlântica do Brasil foram estudados. Neste artigo, a ninfa de *A. flintorum* é descrita baseada na criação de espécimes e associações moleculares. Adicionalmente, nós fornecemos novos registros de localidade e comentários sobre a variação da espécie incluindo espécimes tenerais.

Palavras chave: Neotropical, COI, insetos aquáticos, riachos, descrição da ninfa.

Introduction

The Perlidae Latreille, 1802 is the most diverse family among the Plecoptera Burmeister, 1839 with approximately 1,000 described species from the Nearctic, Palearctic, Afrotropical, and Neotropical regions (Fochetti & Tierno de Figueroa, 2008; DeWalt *et al.*, 2017). In Brazil, this family is represented by four genera: *Anacroneuria* Klapálek, 1909, *Macrogynoplax* Enderlein, 1909, *Kempnyia* Klapálek, 1914 and *Enderleina* Jewett, 1960. *Anacroneuria* includes about 330 described

species (Froehlich, 2010; DeWalt *et al.*, 2017) of which approximately 80 are known from Brazil (Novaes *et al.*, 2016; Almeida & Duarte, 2017).

Most species descriptions of Neotropical Plecoptera are based on adult males (Stark *et al.*, 2009). Nymphs of Plecoptera are usually confined to pristine and well-oxygenated lotic habitats, which makes rearing to the adult stage more difficult in the laboratory. For this reason, the immature-adult associations in Neotropics are scarce (Novaes *et al.*, 2012; Avelino-Capistrano *et al.*, 2011a, 2011b, 2014). For example, among the 80 or so species of *Anacroneuria* described from Brazil, only eight have the nymphs associated and described (Righi-Cavallaro & Lecci, 2010; Avelino-Capistrano *et al.*, 2011a; Novaes *et al.*, 2012; Righi-Cavallaro & Froehlich, 2013; Ribeiro & Gorayeb, 2014; Gonçalves *et al.*, 2017). To remedy this problem, molecular tools have been used to associate adults with its immature (Avelino-Capistrano *et al.*, 2014). The mitochondrial gene, cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) has been shown to be useful to diagnose species for different groups of aquatic insects and other arthropods (Miller *et al.*, 2005; Caterino & Tishechkin, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Hayashi & Sota, 2010; Trivinho- Strixino *et al.*, 2012; Avelino-Capistrano *et al.*, 2014; Avelino-Capistrano *et al.*, 2016).

Anacroneuria flintorum Froehlich, 2002 was described from the Rio de Janeiro State, Brazil. This species occurs in streams along of the Atlantic Forest in southern and southeastern Brazil (Bispo & Froehlich, 2004; De Ribeiro & Froehlich, 2007; Froehlich, 2010; Gonçalves *et al.*, 2017). In this paper, the nymph of *A. flintorum* is described based on material obtained by rearing of late-instar nymphs in the field and by molecular association. Furthermore, we provide new geographic records and comments about the variation of the species including teneral specimens including teneral specimens.

Material and methods

Specimens collected. The specimens studied were collected in streams draining the Atlantic Forest in the states of Espírito Santo, São Paulo, and Santa Catarina, Brazil. Adults were collected using light traps (Vanzolini & Papávero, 1967; Calor & Mariano, 2012) and nymphs by using a D-frame kick net. Recently collected specimens were preserved in 100% ethanol and stored at -20°C. Additional material was preserved in 80% ethanol. Photographs were taken with a stereomicroscope model Leica M205A. The specimens studied are deposited in the Coleção do Laboratório de Biologia Aquática (CLBA), Universidade Estadual Paulista, and Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC), Universidade Federal do Espírito.

Nymph description and association. The description of the nymphs follows Froehlich (1984), Dorvillé & Froehlich (2001), Bispo & Froehlich (2008), Avelino-Capistrano *et al.* (2011a, 2011b), Novaes *et al.* (2012), and Bispo *et al.* (2013). Nymphal associations were made by rearing individuals in the field and using molecular tools. Nymphs were reared from a second order stream (Strahler, 1957) located in Parque Estadual de Intervalos, São Paulo State, Brazil. Molecular association included specimens from the states of Espírito Santo and São Paulo. The analyses were completed in the following laboratories: Laboratório de Biologia Aquática, Universidade Estadual Paulista; Laboratório de Genética e Conservação Animal, Universidade Federal do Espírito Santo, and Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos, Universidade Federal do Espírito Santo.

Molecular tools. DNA extractions were prepared using DNeasy® Blood, Tissue Kit (Qiagen) and Wizard® SV Genomic DNA Purification System Kit (Promega®). Legs or muscles of the thorax of specimens were used, and each

specimen received a voucher code (LP, PPI or PLE + number). Sequences of mitochondrial gene COI (Cytochrome c oxidase subunit I) were amplified based on standardized protocol of polymerase chain reaction (PCR), using the primers LCO-1490 or C1-J-1718 and HCO-2198 (Folmer *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1994). Purification and bidirectional sequencing of amplicons was realized by Helixxa® (Brazil) and Macrogen® (South Korea). The chromatograms were edited in MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) to obtain consensus sequences, which were aligned with Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). The sequence distances were calculated using Kimura-2- parameter (K2P) and the tree was obtained using neighbor-joining (NJ) with 500 bootstrap replicates. All information of voucher specimens is presented in Table 1.

Abbreviations. Collectors: Lucas Henrique de Almeida (LHA); Pitágoras da Conceição Bispo (PCB); Claudio Gilberto Froehlich (CGF); Henrique Paprocki (HP), Adriano Sanches Melo (ASM); Frederico Falcão Salles Team (FFST). Locations: Brazil (BR); state of Espírito Santo (ES); state of Minas Gerais (MG); state of Paraná (PR); state of Santa Catarina (SC); state of São Paulo (SP); Parque Estadual Carlos Botelho (PECB); Parque Estadual de Intervalos (PEI); Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR); Parque Estadual Campos do Jordão (PECJ); Laboratório de Biologia Aquática (LABIA); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZSP); Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC); Universidade Estadual Paulista (UNESP); Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Results and discussion

***Anacroneuria flintorum* Froehlich 2002**

Anacroneuria flintorum Froehlich, 2002: 93; Bispo & Froehlich, 2004: 99; De Ribeiro & Froehlich, 2007: 55; Froehlich, 2010: 56; Baldin *et al.* 2013: 394; Gonçalves *et al.* 2017: 146.

Material examined. BR, SP: Iporanga, Gruta da Tapagem, 15.xi.1991, 1 male; PEI, Rio do Carmo, 19.ii.1992, 1 male; PEI, Rio do Carmo, 16.ii.1993, 2 males; PEI, Rio Poços Altos, 10.xi.1993, CGF & HP col., 2 males; PETAR, Rio Betari, Bairro da Serra, 20.viii.1996, light trap, ASM col., 1 male; PEI, Córrego Lajeado, 24.ii.1999, 2 males; PEI, Córrego Lajeado, 17.ix.1999, 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 27.x.1999, 3 males; PEI, Rio do Carmo, 28.x.1999, 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 23.xi.1999, 7 males; PEI, Ribeirão Água Comprida, 06.i.2000, 8 males; PEI, Rio Poços Altos, 01.ii.2000, 2 males; PEI, Rio do Carmo, 25.iii.2000, 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 24°17'38"S, 48°25'04"W, 30.x.2002, ASM col., 1 male; PECB, Rio Taquaral, 09.ix.2006, 1 male; PEI, Córrego Roda D'Água, 13.xii.2014, light trap, PCB col., 1 female; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 14.xii.2014, light trap, PCB col., 1 male and 1 female; PEI, Córrego do Mirante, 15.xii.2014, light trap, PCB col., 1 female; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 08.ii.2017, light trap, LHA *et al.* col., 1 male; PEI, Ribeirão Bocaina, bridge, 24°16'13"S, 48°27'09"W, 12.ii.2017, light trap, LHA *et al.* col., 1 male; PETAR Núcleo Santana, Riacho Furnas, 24°32'03"S, 48°42'02"W, 14.ii.2017, light trap, LHA *et al.* col., 2 males; PETAR Núcleo Santana, Rio Roncador, 24°32'00"S, 48°42'06"W, 15.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; PECB, Braço do Rio Taquaral, 24°03'31"S, 47°59'41"W, 05.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph; PECB, Ribeirão de Pedras, 24°03'40"S, 47°59'51"W, 06.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph;

PECJ, Córrego Campo do Meio 22°41'28"S, 45°28'26"W, 28.i.2009, light trap, 2 males. **BR, ES:** Caparaó, Rio Santa Marta, 18.ii.2016, FFST col., 3 females and 7 nymph; Caparaó, Pedra Menina, Base, 14-15.ii.2016, FFST col., 2 females; Caparaó, Pedra Menina, Base, 15-16.ii.2016, FFST col., 6 females and 1 male. **BR, MG:** Araponga, Serra do Brigadeiro, Vale das Luas, 14.i.2014, FFST col. 1 nymph. **BR, SC:** Chapadão, 28°12'09"S, 49°23'14"W, 15.ii.2013, light trap, L.C. Pinho, A.P. Amaral, 1 male; Orleans, Rio da Serra, 28°12'43"S, 49°27'28"W, 16.ii.2013, light trap, L.C. Pinho, A.P. Amaral col., 1 male.

Description and association of nymph

Molecular association. We associated adults with nymphs of *A. flintorum* (including teneral adults) from the states of Espírito Santo and São Paulo. The COI divergences ranged from 0–0.9% for specimens from the São Paulo State and from 0–0.7% from Espírito Santo State. Intraspecific divergences ranged from 0–3.9%, probably due the geographic variation. For all species studied, interspecific divergences ranged from 12.4%, between *A. flintorum* (PLE481a) and *A. sp. 2* (PPI15) to 20.6% between *A. flintorum* (PLE479a) and *A. debilis* (Pictet, 1841) (PLE480b). A dendrogram and the matrix with pair divergence between specimens based on COI sequences are presented in Fig. 1 and Table 2.

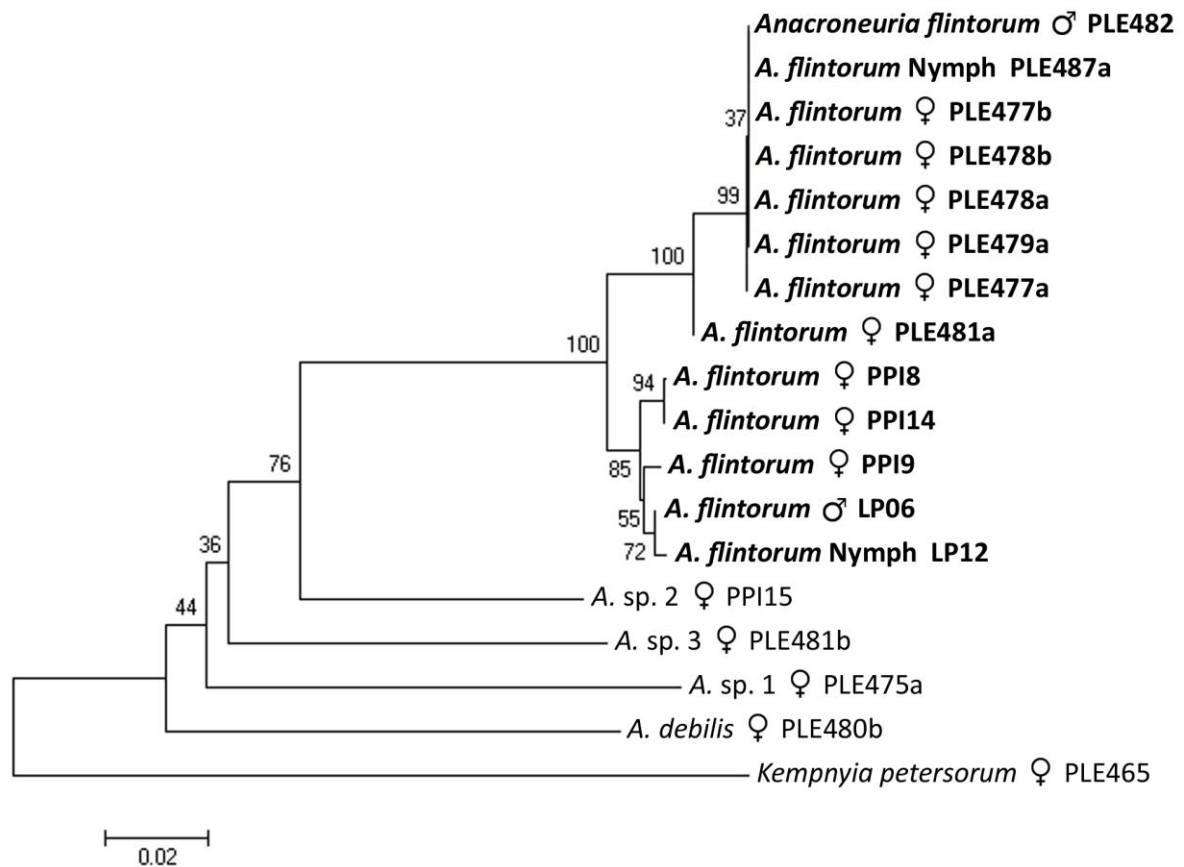


FIGURE 1. Neighbor-joining tree for cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences (433 bp) from *Anacroneuria flintorum* Froehlich and related stoneflies from Espírito Santo and São Paulo States, Brazil, modeled by Kimura-2-parameter (K2P).

Description of nymph. General color dark brown in dorsal view and light yellow in ventral view. Head dark brown with light yellow areas near post-frontal suture, occiput and frontoclypeal region; M-line complete, with well-defined limits; eyes and ocelli black; ocelli with a translucent layer (Figure 2A); clypeus dark brown; labrum light yellow; maxillae light yellow with lacinia light brown and galea brown; mandible black with median region dark brown with five pointed teeth on distal margin, mostly decreasing in size toward base, but 3th and 4th teeth have the same size (Figure 3A, 3B and 3C). Pronotum dark brown with thin median line and scattered rugosities light yellow (Figure 2A). Wing pad light with contour partial dark brown (Figure 2C). Leg

brown; forefemur with a central pale line without setae and with lateral surface covered by sparse bristles, in dorsal view; forefemur anteriorly and posteriorly with higher density of thick bristles, and posteriorly with fringe of hairs; tibia anteriorly with sparse thick bristles, and posteriorly with a row of thick bristles and a well-developed band of hairs (Figure 3D). Abdomen dark brown, almost black, with a drop-shaped light spot in the 10th tergum (Figure 2B). Cerci brown with thick bristles; segments differ in shape and size from base to apex (Figure 3E). Thoracic gills (Figure 2D): ASC1, AT2, AT3 and PT3. *Measurements* (n=4): head width 3-5 mm; head length 2-3 mm; antennae length 7-8 mm; pronotum width 3-3.5 mm; pronotum length 1.5-2 mm; cercal length 9-12 mm; total length 10-15mm.

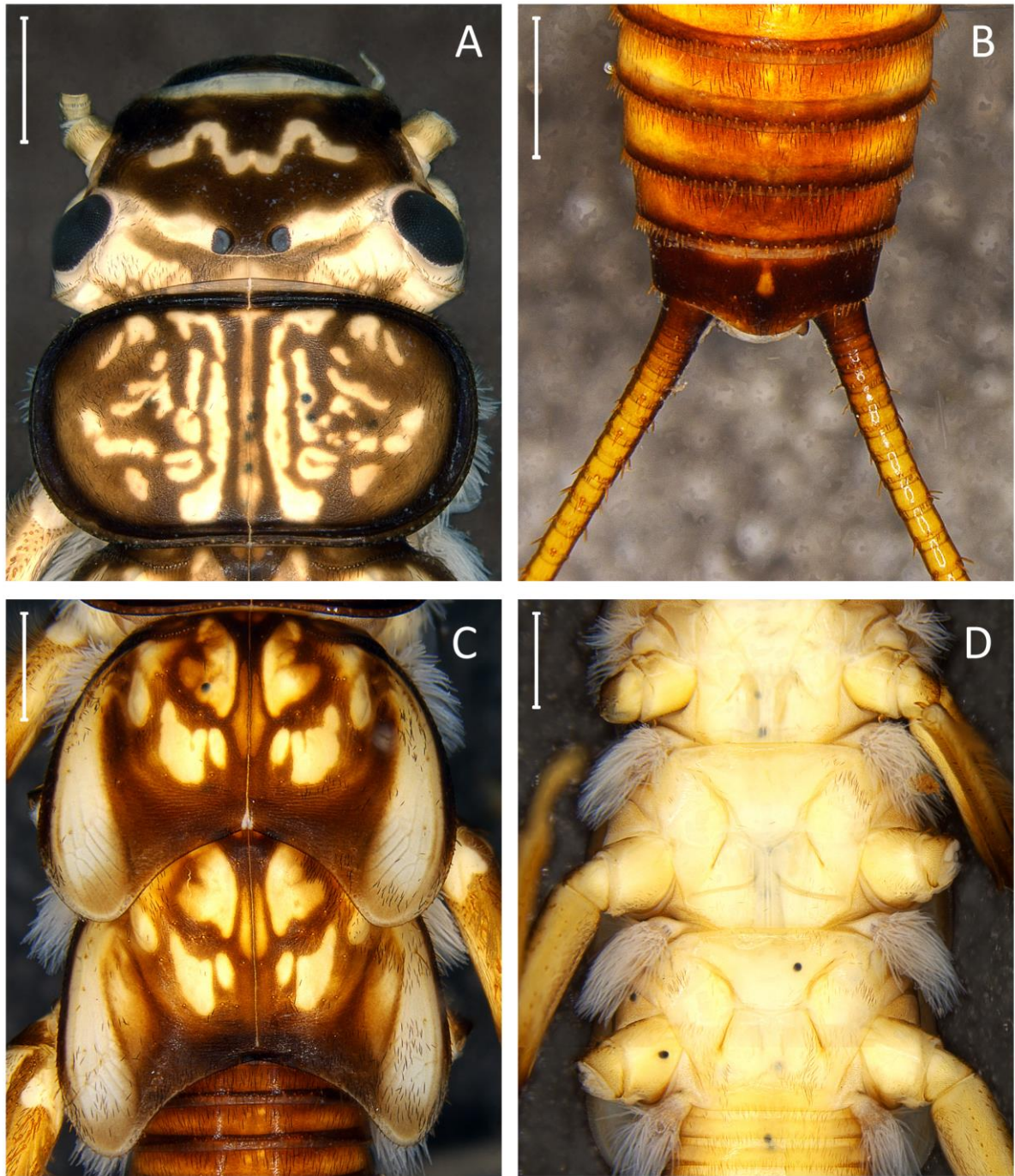


FIGURE 2. Nymph of *Anacroneuria flintorum*: head and pronotum (A), abdominal segments and cercus (B), mesonotum and metanotum in dorsal view (C) and ventral view (D). Scale: 1 mm.

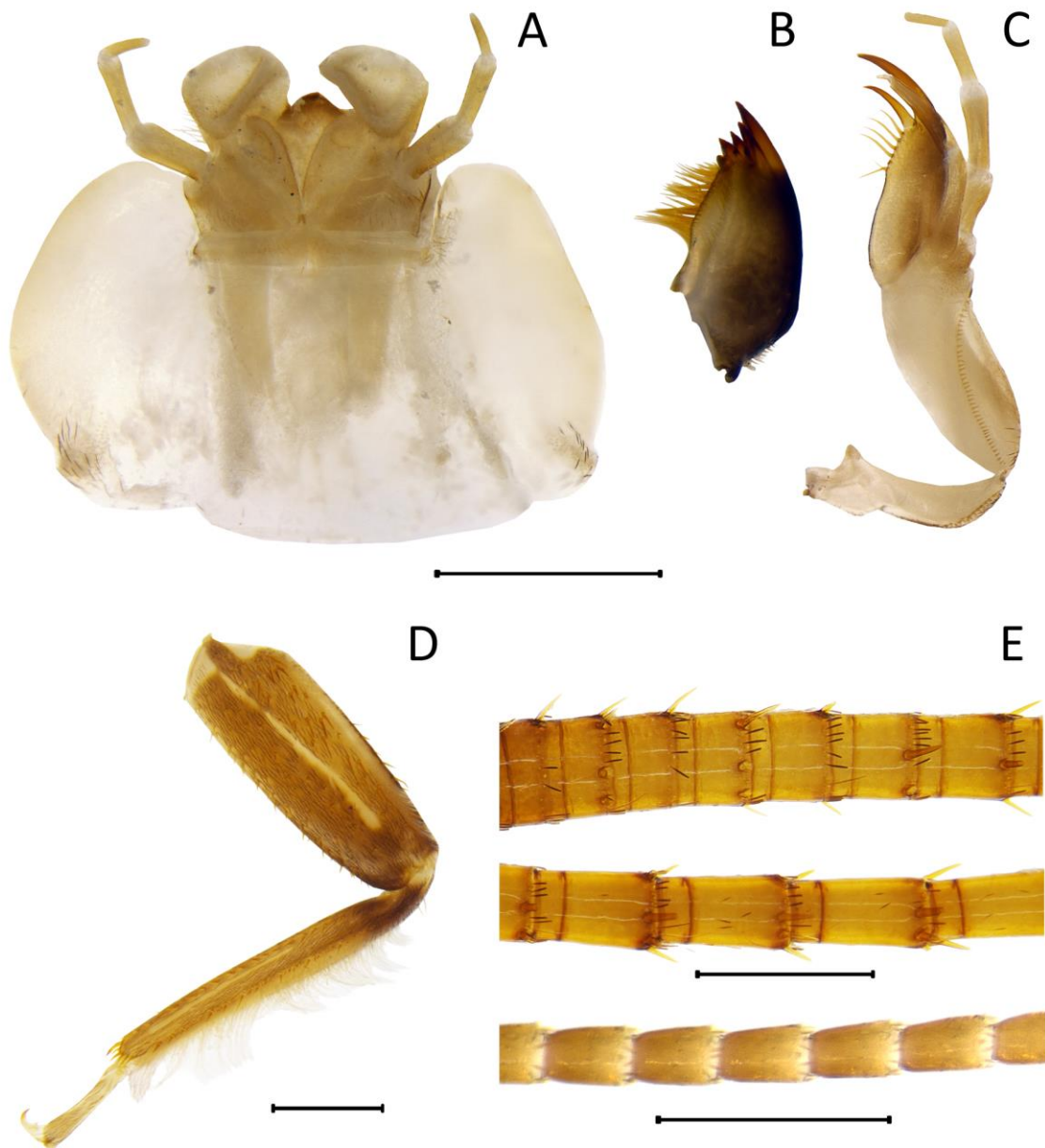


FIGURE 3. Nymph of *Anacroneuria flintorum*: labium (A), right mandible (B), right maxilla (C), pronotum left leg, dorsal view (D); cerci in proximal, medial and distal view (E). Scales: 0.5 mm for A, B and C; 0.5 mm for D; 0.5 mm and 0.25 mm for E, respectively.

Adult morphological variation. Examination of specimens from different regions of Atlantic Forest (states of Espírito Santo, Minas Gerais, Santa Catarina, and São Paulo) indicated morphological variation. Forewing length of male adults of A.

flintorum range from 10 to 15.2 mm (specimens studied herein and Bispo & Froehlich, 2004; Froehlich, 2010, and Baldin *et al.*, 2013). The dorsal color pattern of head of adult of *A. flintorum* can be variable, even within the same population (Bispo & Froehlich, 2004). In addition, it is possible to observe that the dark brown color of recently collected specimens can become ochraceous when preserved in 80% and 100% ethanol for an extended period of time (Fig. 4). Therefore, it is difficult to identify the species by color pattern alone. For identification, it is essential to study the male penial armature, which in *A. flintorum* is elongated, tapering progressively from base to the apex and has hooks well separated from distal vesicles (Froehlich, 2002; Bispo & Froehlich, 2004). However, the keel of penial armature may diverge in specimens from the same population and in different populations. In dorsal view, the keel varies from rounded (male specimens from Rio de Janeiro State), pointed (male specimens from PECJ), to convergent or parallel lines (male specimens from PEI). The specimens collected farther north of the species distribution (e. g. ES, RJ and North of SP) have penial armature more robust than specimens from further south (e.g. South of SP and SC).

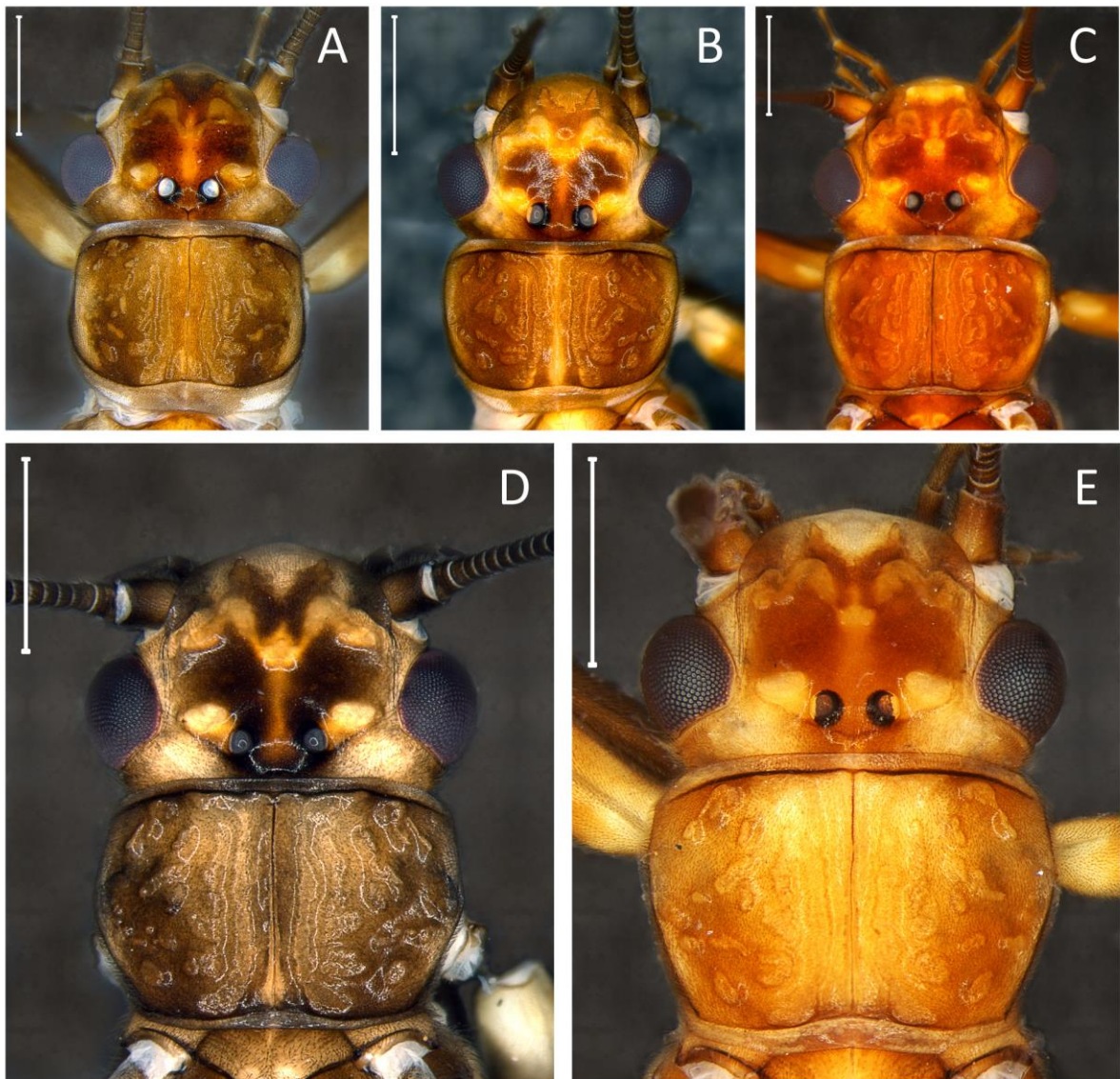


FIGURE 4. Males from ES (A), SC (B), PECJ (C) and Paranapiacaba mountains (D and E). Male collected in 2014 (D) and male collected in 1999 (E) preserved in alcohol.

Teneral specimens. Teneral specimens of *A. flintorum* studied are generally brown in color with pale areas along the body; head and pronotum brown with a pale outline. In these specimens, the pronotum does not have lateral folds at the edges, wings are totally pale and the thoracic segments present remnants of gills (Figure 5D, 5E and 5F). A similar pattern to *A. flintorum* is also present in *A. debilis* (Almeida & Duarte, 2017) suggesting that several species may be similar when teneral.

Therefore, species described as having pale areas on the head and pronotum and milky wings (e.g. *A. petersi* Froehlich, 2002) may have been based on teneral specimens, requiring caution for use in identifications.



FIGURE 5. Fully developed specimen: head and pronotum (A), pronotum and mesonotum in lateral view (B) and mesonotum and forewings (C). Teneral specimen: head and pronotum (D), pronotum and mesonotum in lateral view (E), mesonotum and forewings (F). Lateral folds pointed in B and remnants of gills in thoracic segments in E. Scale: 1 mm.

Remarks. The nymph of *A. flintorum* has a different pattern than the other known *Anacroneuria* nymphs described from Brazil (Righi-Cavallaro & Lecci, 2010; Avelino-Capistrano *et al.*, 2011a; Novaes *et al.*, 2012; Righi-Cavallaro & Froehlich, 2013; Ribeiro & Gorayeb, 2014; Gonçalves *et al.*, 2017). The color pattern of the head and

the drop-shaped light spot in the last abdominal segment are apparently characteristic for this species. In addition to description of the nymph, we present new species records from the states of Minas Gerais and Santa Catarina. *Anacroneuria flintorum* has been collected from streams from protected areas of the Atlantic Forest (Fig. 6). In general, these streams are pristine and have fast currents and rocky substrates, and undisturbed channels and banks. This suggests that *A. flintorum* may be a sensitive taxon to environmental disturbances.

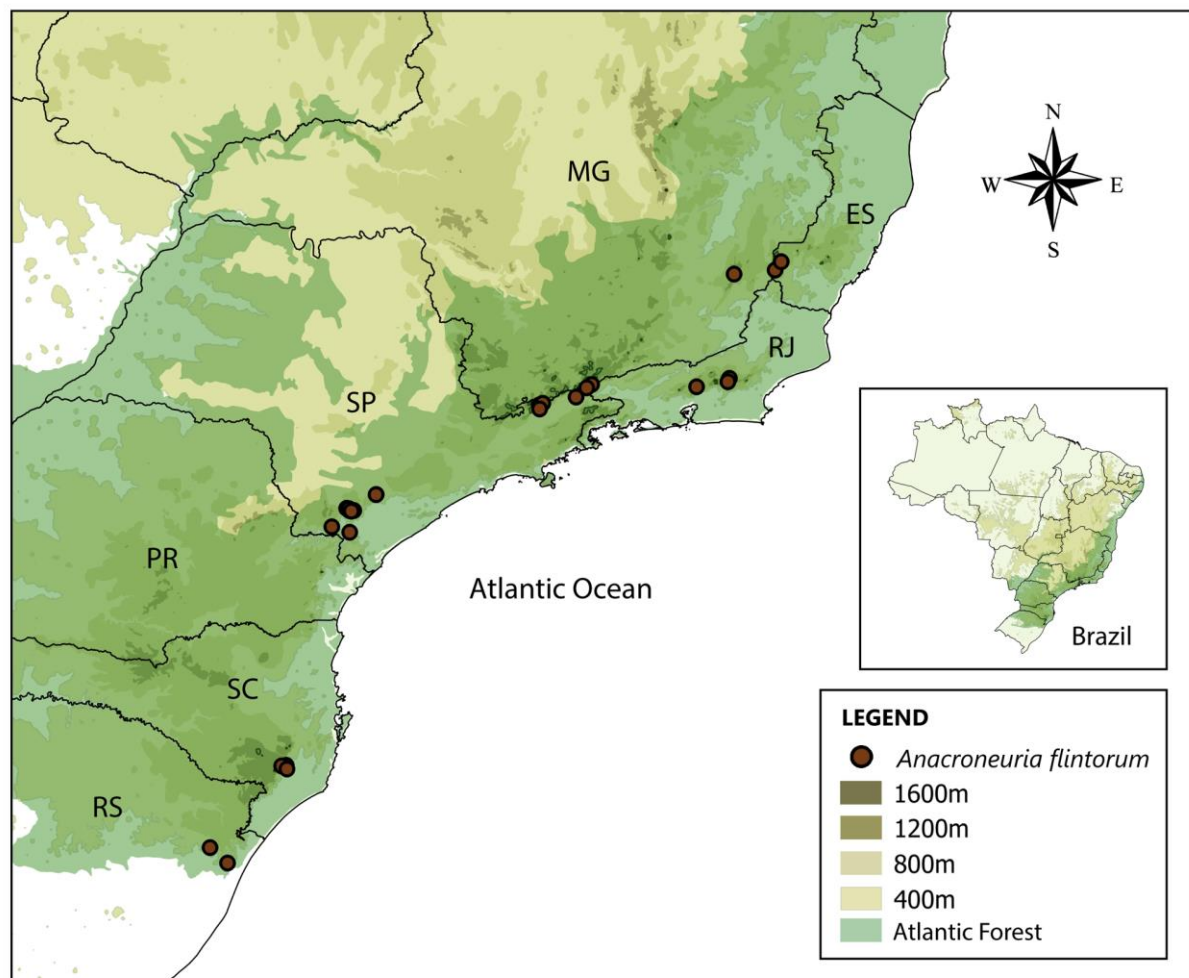


FIGURE 6. Records of *Anacroneuria flintorum* Froehlich 2002.

TABLE 1. GenBank codes of COI sequences of stonefly vouchers with respective identification and collecting locality included in the molecular association present in this work.

Species / Specimen life stage	Locality	Voucher code	COI GenBank codes
<i>Kempnyia petersorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Santa Marta, Base (ES)	PLE465	MG737314
<i>Anacroneuria debilis</i> (Pictet) f#	PARNA Caparaó, Santa Marta, Base (ES)	PLE480b	MG737303
<i>A. sp. 1</i> f#	PARNA Caparaó, Santa Marta, Base (ES)	PLE475a	MG737312
<i>A. sp. 2</i> f#	P.E. Intervalles, Roda D'água (SP)	PPI15	MG737318
<i>A. sp. 3</i> f#	PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base (ES)	PLE481b	MG737313
<i>A. flintorum</i> Froehlich m#	PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base (ES)	PLE482	MG737310
<i>A. flintorum</i> Froehlich nymph	PARNA Caparaó, Rio Santa Marta (ES)	PLE487a	MG737311
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Rio Santa Marta (ES)	PLE477b	MG737306
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base (ES)	PLE478b	MG737308
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base (ES)	PLE478a	MG737307
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base (ES)	PLE479a	MG737309
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Rio Santa Marta (ES)	PLE477a	MG737305
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base (ES)	PLE481a	MG737304
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	P.E. Intervalles, Roda D'água (SP)	PPI8	MG737315
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	P.E. Intervalles, Rio do Carmo (SP)	PPI14	MG737317
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	P.E. Intervalles, Córrego do Mirante (SP)	PPI9	MG737316
<i>A. flintorum</i> Froehlich m#	P.E. Intervalles, Rio do Carmo (SP)	LP06	MG737319
<i>A. flintorum</i> Froehlich nymph	P.E. Intervalles, Córrego do Mirante (SP)	LP12	MG737320

TABLE 2. Kimura-2-parameter (K2P) divergences between pair of COI sequences.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	PLE 465	PLE 480b	PLE 476b	PPI 15	PLE 481b	PPI8	PPI9	PPI 14	LP06
1	<i>Kempnyia petersorum</i> PLE465								
2	<i>Anacroneuria debilis</i> PLE480b	0.261							
3	<i>Anacroneuria</i> sp. 1 PLE475a	0.286	0.175						
4	<i>Anacroneuria</i> sp. 2 PPI15	0.252	0.164	0.173					
5	<i>Anacroneuria</i> sp. 3 PLE481b	0.270	0.168	0.168	0.141				
6	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI8	0.256	0.186	0.192	0.128	0.150			
7	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI9	0.267	0.184	0.196	0.125	0.151	0.009		
8	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI14	0.253	0.185	0.194	0.127	0.149	0.000	0.009	
9	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP06	0.261	0.186	0.200	0.127	0.150	0.007	0.005	0.007
10	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP12	0.264	0.188	0.201	0.128	0.150	0.009	0.007	0.009
11	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE481a	0.273	0.178	0.196	0.124	0.159	0.027	0.025	0.027
12	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477a	0.287	0.206	0.184	0.141	0.180	0.038	0.037	0.037
13	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477b	0.291	0.208	0.185	0.141	0.181	0.039	0.037	0.039
14	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478a	0.288	0.206	0.184	0.142	0.180	0.038	0.037	0.037
15	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478b	0.288	0.204	0.184	0.143	0.181	0.038	0.037	0.037
16	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE479a	0.288	0.206	0.184	0.142	0.180	0.038	0.037	0.038
17	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE482	0.287	0.204	0.184	0.144	0.181	0.038	0.037	0.038
18	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE487a	0.291	0.205	0.184	0.143	0.182	0.039	0.037	0.039

TABLE 2. Continued

	10	11	12	13	14	15	16	17
	LP12	PLE 481a	PLE 477a	PLE 477b	PLE 478a	PLE 478b	PLE 482	PLE 487a
1	<i>Kempnyia petersorum</i> PLE465							
2	<i>Anacroneuria debilis</i> PLE480b							
3	<i>Anacroneuria</i> sp. 1 PLE475a							
4	<i>Anacroneuria</i> sp. 2 PPI15							
5	<i>Anacroneuria</i> sp. 3 PLE481b							
6	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI8							
7	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI9							
8	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI14							
9	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP06							
10	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP12							
11	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE481a	0.025						
12	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477a	0.039	0.007					
13	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477b	0.039	0.007	0.000				
14	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478a	0.039	0.007	0.000	0.000			
15	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478b	0.038	0.007	0.000	0.000	0.000		
16	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE479a	0.039	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	
17	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE482	0.038	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE487a	0.039	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the review and helpful suggestions of Prof. Dr. Boris C. Kondratieff. LHA and MCG thank to FAPESP (Research Foundation of São Paulo State, number 2015/22008-9) and to CAPES (Council for Advanced Professional Training) for the respective fellowships. MCG, MCN and RCP thank to FAPES (State of Espírito Santo Research Foundation, number 61938408/2013) for the financial support. MCN thanks PNPd/ CAPES for fellowship and financial support. PCB thanks to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, number 305275/2014–3) for research fellowship and to FAPESP (number 12/21196– 8) for the financial support. The authors thank to Gustavo Alberto de Almeida, Lucas Bassi Costa and driver Luis Francisco Sanches de Oliveira for support during fieldwork in PECB, PEI and PETAR. The authors thank Claudio Gilberto Froehlich, Henrique Paprocki and Adriano Sanches Melo for collected specimens.

References

- Almeida, L.H. & Duarte T. (2017) A new species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the Ecological Station, Wenceslau Guimarães, State of Bahia, Brazil. *Zootaxa*, 4247 (4), 480–486.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4247.4.9>.
- Avelino-Capistrano, F., Barbosa, L.S. & Almeida, G.L. (2011a) The nymph of *Anacroneuria debilis* (Pictet, 1841) (Plecoptera: Perlidae). *Zootaxa*, 2882, 59–63.

- Avelino-Capistrano, F.S., Barbosa, L.S. & Almeida G.L. (2011b) Complementary descriptions of *Kempnyia gracilenta* (Enderlein 1909) and *Kempnyia reticulata* (Klapálek 1916) (Plecoptera: Perlidae). *Illiesia*, 7 (14), 142–147.
- Avelino-Capistrano, F., Nessimian, J.L., Santos-Mallet, J.R., & Maeda Takiya, D. (2014) DNA-based identification and descriptions of immatures of *Kempnyia* Klapálek (Insecta: Plecoptera) from Macaé River Basin, Rio de Janeiro State, Brazil. *Freshwater Science*, 33 (1), 325–337.
<http://dx.doi.org/10.1086/675226>
- Avelino-Capistrano, F., Barbosa, L.S. & Maeda Takiya, D. (2016) Description of a new *Kempnyia* Klapálek from Brazil (Plecoptera: Perlidae) with life stages associated using DNA barcodes. *Zootaxa*, 4079 (3), 372–380.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4079.3.5>
- Baldin, C., Bispo, P.C. & Novaes M.C. (2013) New species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Rio de Janeiro State, Brazil. *Zootaxa*, 3694 (4), 391–397.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3694.4.7>
- Bispo, P.C. & Froehlich, C.G. (2004) Perlidae (Plecoptera) from Intervalles State Park, São Paulo State, Southeastern Brazil, with descriptions of new species. *Aquatic Insects*, 26 (2), 97–113.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650420412331325837>
- Bispo, P.C. & Froehlich, C.G. (2008) Description of the larva and redescription of the adult of *Kempnyia neotropica* Jacobsen and Bianchi (Plecoptera: Perlidae) with biological notes. *Aquatic Insects*, 30, 61–67.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650420701829641>

- Bispo, P.C., Cardoso-Leite, R. & Lecci, L.S. (2013) Description of the larva of *Kempnyia colossica* (Navás) (Plecoptera: Perlidae) with biological notes. *Aquatic Insects*, 34 (3–4), 217–221.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650424.2013.800559>
- Burmeister, H. (1839) Handbuch der Entomologie, Plecoptera. 2 (2), 863–881. Theod. Chr. Friedr. Endlin, Berlin.
- Calor, A.R., & Mariano, R. (2012) UV Light Pan Traps for Collecting Aquatic Insects. *EntomoBrasilis*, 5 (2), 164–166.
<http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v5i2.187>
- Caterino, M. & Tishechkin A. K. (2006) DNA identification and morphological description of the first confirmed larvae of Hetaeriinae (Coleoptera: Histeridae). *Systematic Entomology*. *Systematic Entomology*, 31, 405–418.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.00338.x>
- De Ribeiro, V.R. & Froehlich C.G. (2007) Two new species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from southern Brazil. *Zootaxa* 1624, 53–57.
- DeWalt, R.E., Maehr, M.D., Neu-Becker, U. & Stueber, G. (2017) Plecoptera Species File. Version 5.0/ 5.0. Available from: <http://Plecoptera.SpeciesFile.org> (accessed 12 October 2017).
- Dorvillé, L.F.M., & Froehlich, C.G. (2001) Description of the nymph of *Kempnyia tijucana* Dorvillé & Froehlich (Plecoptera: Perlidae), with notes on its development and biology. In: E. Domínguez (ed). *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher. N. York. pp. 385–392.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1257-8_45

- Enderlein, G. (1909) Klassifikation der Plecopteren, sowie Diagnosen neuer Gattungen und Arten. *Zoologischer Anzeiger*, 34, 385–419.
- Fochetti, R., & Figueroa, J.M.T. (2008) Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595 (1), 365–377.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-9031-3>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for application of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Froehlich, C.G. (1984) Brazilian Plecoptera 2. Species of the serrana-group of *Kempnyia* (Plecoptera). *Aquatic insects*, 6 (3), 137–147.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650428409361176>
- Froehlich, C.G. (2002) *Anacroneuria* mainly from southern Brazil and northeastern Argentina (Plecoptera: Perlidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115, 75–107.
- Froehlich, C.G. (2010) *Anacroneuria* (Plecoptera, Perlidae) from the Mantiqueira Mountains, São Paulo State, Brazil. *Zootaxa*, 2365, 55–68.
- Gonçalves M.C., Novaes, M.C., & Salles, F.F. (2017) New species and records of Perlidae (Plecoptera) from Espírito Santo State, Brazil. *Zootaxa*, 4273 (1), 141–150.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4273.1.11>
- Hayashi M. & Sota T. (2010) Identification of elmids larvae (Coleoptera: Elmidae) from Sanin District of Honshu, Japan, based on mitochondrial DNA sequences. *Entomological Science*. 13, 417–424.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1479-8298.2010.00404.x>

- Jewett, S.G. (1960) Notes and descriptions concerning Brazilian Stoneflies. *Arquivos do Museu Nacional*, 50, 167–184.
- Klapálek, F. (1909) Vorläufige Bericht über exotische Plecopteren. *Wiener Entomologische Zeitung*, 28, 215–232.
- Klapálek, F. (1914) Analytická tabulka fam Perlidae a její dvou subfam., Perlinae a Acroneuriinae (Plecoptera). *Časopis České Společnosti Entomologické*, 11, 53–69.
- Klapálek, F. (1916) Subfamilia Acroneuriinae Klp. *Časopis České Společnosti Entomologické*, 13, 45–84.
- Latreille, P.A. (1802) *Perlaire; Perlariae*. In: *Histoire Naturelle, Générale et Particulière, des Crustacés et des Insectes*, 3, pp. 392–393.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.15764>
- Miller, K.B., Alarie, Y., Wolfe, G.W. & Whiting, M.F. (2005) Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Zootaxa*, 3361, 56–62.
- Mynott, J.H., Webb, J. M. & Suter, P. J. (2011) Adult and larval associations of the alpine stonefly genus *Riekoperla* McLellan (Plecoptera: Gripopterygidae) using mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics*, 25 (1), 11–21.
<http://dx.doi.org/10.1071/is10025>
- Novaes, M.C. & Bispo, P.C. (2014a) Plecoptera from Minas Gerais State, southeastern Brazil. *Zootaxa*, 3856 (3), 433–442.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3856.3.8>
- Novaes, M.C., Bispo, P.C. & Higuti, J. (2012) A description of the nymph of *Anacroneuria ofaye* Froehlich (Plecoptera: Perlidae) and a apparatus for rearing Neotropical stonefly species. *Zootaxa*, 3547, 71–77.

- Novaes M.C., Bispo P.C. & Gonçalves M.C. (2016) A new species of *Anacroneuria* Klapálek 1909 (Plecoptera: Perlidae) from Espírito Santo State, southeastern Brazil and comments on additional species. *Zootaxa*, 4208 (1), 094–098.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4208.1.7>
- Pictet, F.-J. (1841) *Histoire Naturelle Générale et Particulière des Insectes Névroptères. Famille des Perlides*. J. Kessmann, Genève.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.124172>
- Ribeiro, J.M.F. & Gorayeb I.S. (2014) Description of immatures and association with adults of three species of *Anacroneuria* Klapálek (Plecoptera: Perlidae) of the Brazilian Amazon. *Zootaxa*, 3881 (1), 017–032.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3881.1.2>
- Righi-Cavallaro, K.O. & Lecci, L.S. (2010) Three new species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Centre-West and Southeast Brazil. *Zootaxa*, 2683, 35–44.
- Righi-Cavallaro, K.O. & Froehlich, C.G. (2013) The Nymph of of *Anacroneuria payagua* Froehlich (Plecoptera: Perlidae) from Brazil. *Zootaxa*, 3635 (5), 579–582.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3635.5.7>
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
<http://dx.doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Strahler, A. N. (1957). Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions American Geophysical Union*, 38, 913-920.

<http://dx.doi.org/10.1029/TR038i006p00913>

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 (10), 2731–2739.

<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (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 (22), 4673–4680.

<http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Trivinho-Strixino S., Pepinelli M., Siqueira T. & Roque F.O. (2012) DNA barcoding of *Podonomus* (Chironomidae, Podonominae) enables stage association of a named species and reveals hidden diversity in Brazilian inselbergs. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 48, 411–423.

<http://dx.doi.org/10.1051/limn/2012032>

Vanzolini, P.E. & Papávero, N. (1967) *Manual de Coleta e Preparação de Animais Terrestres e de Água Doce*. Secretaria de Estado da Agricultura de São Paulo. São Paulo. 223pp.

Zhou, X., Kjer, K.M., & Morse, J.C. (2007) Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, 26 (4), 719–742.

<http://dx.doi.org/10.1899/06-089.1>

ARTIGO 2. Perlidae (Plecoptera) from Paranapiacaba mountains, State of São Paulo, Brazil: notes, new records, synonymy and life stages association using molecular tools.

LUCAS HENRIQUE DE ALMEIDA & PITÁGORAS DA CONCEIÇÃO BISPO

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, PPG em Biociências, Laboratório de Biologia Aquática (LABIA), Assis, São Paulo, Brazil. Corresponding author. E-mail: lucasalmeida768@yahoo.com.br.

Abstract

In this study, species of the family Perlidae (Plecoptera) from Paranapiacaba mountains were studied using integrative taxonomy. We registered fourteen species from three genera in the region. *Anacroneuria* is represented by nine species: *A. boraceiensis*, *A. flintorum*, *A. iporanga*, *A. itajaimirim*, *A. polita*, *A. subcostalis*, *A. tupi*, a new record of *A. debilis* and *A. fiorentini*. *Kempnyia* comprises four species: *K. auberti*, *K. colossica*, *K. flava* and *K. neotropica*. *Macrogynoplax* is represented by only one species: *M. veneranda*. Populations from other localities were included in the analysis and by using a DNA barcode (cytochrome c oxidase subunit I [COI]), *Kempnyia petersorum* was associated with *K. neotropica* suggesting their synonymy; the nymph of *Anacroneuria tupi* is described; and the knowledge about delimitation of species, populations and teneral pattern is discussed. A key for developed adults identification is included.

Keywords: Stoneflies – Paranapiacaba mountains – Atlantic forest – COI – Streams.

Introduction

In Brazil, Plecoptera comprise 170 species (Froehlich, 2011a, 2012; Avelino-Capistrano *et al.*, 2013), divided in two families, Gripopterygidae and Perlidae (Froehlich, 1981; Bispo & Lecci, 2011). Both families are composed of four genera in Brazil: Gripopterygidae, represented by *Gripopteryx* (Pictet 1841), *Paragripopteryx* Enderlein 1909, *Tupiperla* Froehlich 1969 and *Guaranyperla* Froehlich 2001; while Perlidae is represented by *Anacroneuria* Klapálek 1909, *Enderleina* Jewett 1960, *Kempnyia* Klapálek 1914 and *Macrogynoplax* Enderlein 1909. In the case of Perlidae, *Anacroneuria* is recorded from southern United States to northern Argentina (Stark, 2001; Stark *et al.*, 2009) and is the most diverse genus among the family, with more than 300 described species; *Enderleina* includes seven species and is distributed from Venezuela and North of Brazil (Hamada *et al.*, 2016); *Kempnyia* currently includes 36 species and is distributed from mountains of Central Brazil and Bahia State to Rio Grande do Sul State (Froehlich, 2010; Duarte *et al.*, 2014a); and *Macrogynoplax* currently includes 14 species and is distributed from northern South America (Suriname, Guyana, Venezuela, Peru) to Brazil (Ribeiro & Gorayeb, 2015).

In the Paranapiacaba mountains, the Plecoptera fauna is well known mainly due to studies of Bispo & Froehlich (2004) and Bispo & Lecci (2011). Three genera of Perlidae (*Anacroneuria* Klapálek 1909, eight species; *Kempnyia* Klapálek 1914, five species; and *Macrogynoplax* Enderlein 1909, one species) were cataloged from Intervalles State Park (Bispo & Froehlich, 2004). Despite the relevant knowledge about this fauna, it is mainly constrained to morphology of adult males. In fact, taxonomic descriptions of most Neotropical stoneflies are based only on adult males,

and few nymphs are associated with adults. The nymphs are important bioindicators because most Plecoptera live in well-oxygenated running waters, and this makes rearing and association in laboratory conditions difficult. In addition, some species may have only slight morphological variation and these variations are poorly known. One solution to this problem is the use of molecular tools (Avelino-Capistrano *et al.*, 2014) which have been used to associate immature and adult stages of insects (Mynott *et al.*, 2011), characterize species based on molecular markers (Hajibabaei *et al.*, 2011; Sweeney *et al.*, 2011), identify cryptic species problems (Tierno-de-Figueroa *et al.*, 2011), and address phylogenetic questions (Fochetti *et al.*, 2009, 2011; Boumans & Baumann, 2012; Weiss *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2013 and McCulloch *et al.*, 2015). Molecular tools have been used with success to associate life stages in Brazilian Plecoptera (Avelino-Capistrano *et al.*, 2014, 2016; Almeida *et al.*, 2018).

The objectives of the present study were to update the knowledge about Perlidae (Plecoptera) from the Paranapiacaba mountains, characterize species based on the COI gene, and make associations between adults and nymphs using molecular tools. Besides that, we will discuss the morphological and molecular variation between populations of the some species recorded in region, the species delimitation using COI, and the teneral pattern presented in Perlidae.

Material and methods

Study area. The Paranapiacaba mountains are located in the south of São Paulo State and comprise the Carlos Botelho State Park, Intervales State Park, Alto Ribeira Tourist State Park, Ecological Station of Xitué and Nascentes do Paranapanema

State Park. The area is considered the largest and one of the most important continuums of preserved Atlantic Forest in Brazil, with an area of 1150 km² and an altitudinal variation between 500 and 1000 meters (Figure 1). The region is very relevant to conservation because it contains the headwaters of two important hydrographic basins (Alto Paranapanema and Alto Ribeira basins).

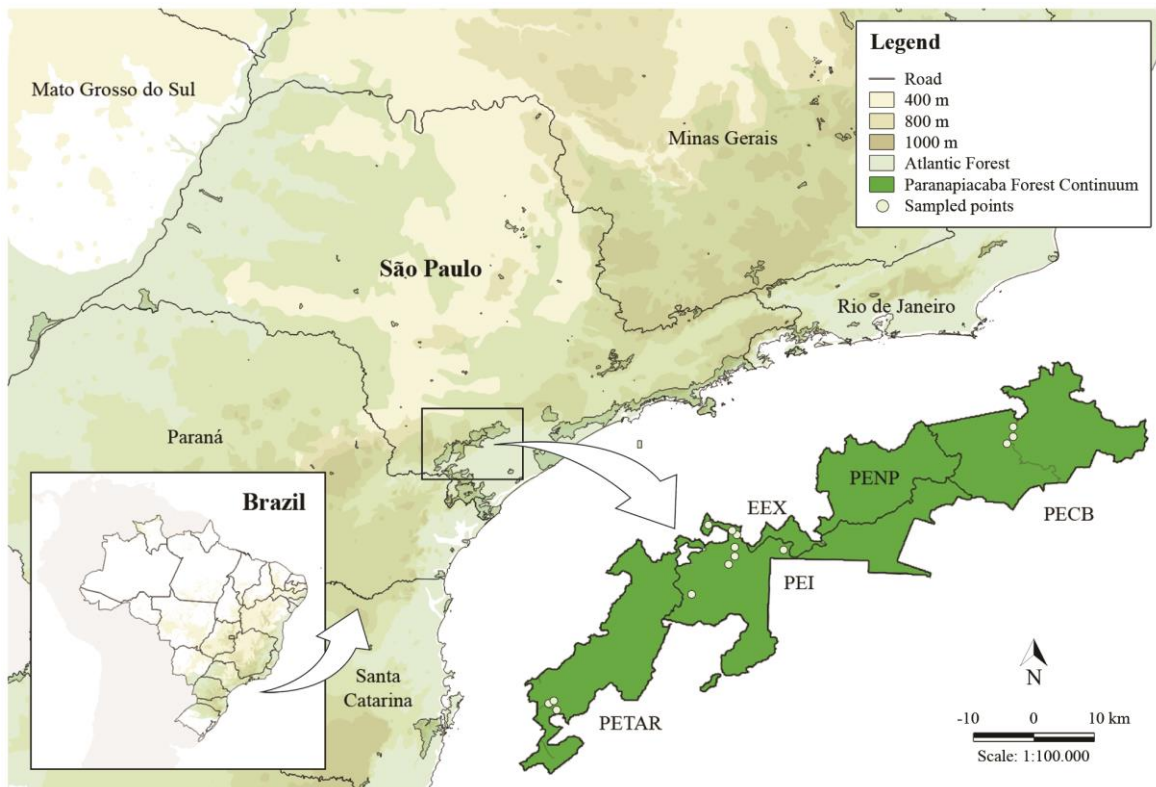


FIGURE 1. Map of Paranapiacaba mountains indicating the collection sites.

Sampling. The specimens were collected especially in the Carlos Botelho State Park (PECB), Intervalas State Park (PEI) and Alto Ribeira Tourist State Park (PETAR). Other localities were sampled according to the records of the species. The material was collected using a light trap (Vanzolini & Papávero, 1967; Calor & Mariano, 2012). Part of the collected material of the all life stages was preserved in 80% alcohol, and the material for molecular analysis was preserved in absolute

alcohol at -20°C. Illustrations were prepared in a camera lucida and vectored in Adobe Illustrator CS6® editor. The pictures were taken in a Leica M205A stereomicroscope. Most of the exemplars studied are deposited in Coleção do Laboratório de Biologia Aquática (CLBA), Unesp Assis. Other specimens, including holotypes, are deposited in the Museum of Zoology, University of São Paulo, São Paulo State, Brazil. We present the species in alphabetical order.

DNA sequences and analysis. We extracted DNA from the specimens using DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen). One leg was used, and each specimen received a code (LP, PPI, LM or LL + number) to identify the sequence. Utilizing the polymerase chain reaction (PCR), COI sequences were amplified using the primers LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') in combination with HCO-2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Purification and bidirectional sequencing of PCR products was conducted by Helixxa (Brazil). Using MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), the chromatograms were edited to obtain consensus sequences, which were aligned with Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). The sequence distances were calculated using Kimura-2 parameter (K2P). Sequences of specimens found on GenBank were added to the analyses. A tree was made using neighbor-joining (NJ) with 500 bootstrap replicates. All information from voucher specimens and specimens added from GenBank is presented in Table 2.

Abbreviations. Collectors: Lucas Henrique de Almeida (LHA), Pitágoras da Conceição Bispo (PCB), Claudio Gilberto Froehlich (CGF), Henrique Paprocki (HP), Adriano Sanches Melo (ASM), Frederico Falcão Salles Team (FFST), Lucas Silveira Lecci (LSL), Vera Lucia Crisci-Bispo (VLCB). Others: Brazil (BR), Entre Ríos Province, Argentina (ER), Misiones Province, Argentina (MIS), Department of Paraguay, Paraguay (PAR), State of Bahia (BA), State of Espírito Santo (ES), State

of Minas Gerais (MG), State of Paraná (PR), State of Rio de Janeiro (RJ), State of Rio Grande do Sul (RS), State of Rondônia (RO), State of Santa Catarina (SC), Museum of Zoology, University of São Paulo, State of São Paulo (MZSP), Ecological Station of Xitué (EEX), State Park of Paranapanema Water Springs (PENP), Atlantic Forest (AF), Amazon Forest (AMF), Cerrado (CE).

Results and discussion

Fourteen species in three genera of Perlidae were studied using morphological and molecular tools (Table 1). *Anacroneuria boraceiensis* Froehlich, *A. fiorentini* De Ribeiro & Froehlich, *A. iporanga* Bispo & Froehlich, and *Kempnyia auberti* Froehlich were not sampled for molecular analysis. We provide comments about the species, new records of *A. debilis* (Pictet) and *A. fiorentini* De Ribeiro & Froehlich, the description of *A. tupi* nymph, and an updated adult identification key. The synonymy of *K. petersorum* with *K. neotropica* suggests that *K. petersorum* is a teneral specimen, discussed in more detail later. Also, we discuss the delimitation of species and populations, using the COI divergences of the registered species and the published literature as a model.

TABLE 1. Known life stages and distribution of Perlidae species recorded in Paranapiacaba mountains.

Species	Adult description Authors, Data	Nymph description Authors, Data	Distribution
<i>Anacroneuria boraceiensis</i>	Froehlich, 2004	-	AF (MG, SP)
<i>Anacroneuria debilis</i> *	(Pictet, 1841)	Avelino-Capistrano <i>et al.</i> , 2011	AF (BA, ES, MIS, ER, PAR, PR, RS, SC, SP), AMF (RO)
<i>Anacroneuria fiorentini</i> *	De Ribeiro & Froehlich, 2007	-	AF (SC, SP, RS)
<i>Anacroneuria flintorum</i>	Froehlich, 2002	Almeida <i>et al.</i> , 2018	AF (ES, SC, SP, RJ, RS)
<i>Anacroneuria iporanga</i>	Bispo & Froehlich, 2004	-	AF (SP)
<i>Anacroneuria itajaimirim</i>	Bispo & Froehlich, 2004	-	AF (SP)
<i>Anacroneuria polita</i>	(Burmeister, 1839)	-	AF (MIS, PR, SC, SP, RJ)
<i>Anacroneuria subcostalis</i>	Klapálek, 1921	-	AF (ES, SP, RJ)
<i>Anacroneuria tupi</i>	Bispo & Froehlich, 2004	This paper	AF (SP)
<i>Kempnyia auberti</i>	Froehlich, 1996	-	AF (PR, SP)
<i>Kempnyia colossica</i>	(Navás, 1934)	Bispo <i>et al.</i> , 2013	AF (ES, PR, SC, SP, RJ)
<i>Kempnyia flava</i>	Klapálek, 1916	-	AF (ES, SP, RJ)
<i>Kempnyia neotropica</i>	(Jacobson & Bianchi, 1841)	Bispo & Froehlich, 2008	AF (ES, PR, SC, SP, RJ), CE (MG, GO)
<i>Macrogynoplax veneranda</i>	Froehlich, 1984b	Froehlich, 1984b	AF (SP)

*New record

Molecular analysis

COI divergences. The Neighbor-joining tree showed that the delimitation of the species based on COI is compatible with the traditional morphological delimitations in most cases. The grouping formed by *K. neotropica* and *K. petersorum* presented very low molecular divergences between them (Figure 1; Table 3). On the other hand, some species presented high intraspecific divergence (*A. debilis* and *K. colossica*) (Figure 1; Table 3). Considering the intraspecific divergence in

Anacroneuria: *A. flintorum* ranged from zero to 3.9% to specimens from São Paulo and Espírito Santo states, and are presented with more details in Almeida *et al.* (2018); *A. itajaimirim* ranged from zero to 1.3%; *A. tupi* from zero to 0.7%; *A. subcostalis* 0.5%, and *A. debilis* from zero to 2.2% to specimens from São Paulo State, and zero to 14.8% when including specimen from Espírito Santo and Rio de Janeiro states. For all *Anacroneuria* species studied, interspecific divergences ranged from 11.4%, between *A. itajaimirim* (LM26) and *A. polita* (LM12), to 22.2% between *A. debilis* (ENT156) and the nymph of *A. tupi* (LP10). Considering the intraspecific divergence in *Kempnyia*: *K. flava* showed no divergence; *K. neotropica* ranged from zero to 3.7%; *K. colossica* ranged from zero to 17% (including specimens from Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina and São Paulo states). Specimens from PR and SP are closer and the divergence ranges from 4.6% to 5.4%, while the SC specimens show a greater divergence compared to the rest of specimens (14.5% to 16.5%), and the specimens from RJ are even more divergent (15.6% to 17.0%). *Kempnyia guassu* is found among *K. colossica* with divergences ranging from 7.7% to 16.1%. For all *Kempnyia* species studied, interspecific divergences ranged from 15.9%, between *K. petersorum* (LM30) and *K. flava* (LM34, LM35) to 24.4%, between *K. petersorum* (PLE465) and *K. colossica* (ENT416). *Macrogynoplax veneranda* showed intraspecific divergences ranging from zero to 0.2%. The intraspecific divergences found in groups of *A. debilis* and *K. colossica* probably occurred as a function of different geographic locations. But, this high intraspecific divergence and the relationship between *K. guassu* and *K. colossica* suggests the need for further studies to clarify variations and improve species delimitation.

Nymphal association and synonymy. Adult specimens of five species (*Anacroneuria flintorum*, *A. debilis*, *A. tupi*, *Macrogynoplax veneranda*, and *Kempnyia neotropica*) were associated with their nymphs using molecular tools. These nymphs, except *A. tupi*, have already been described (Froehlich, 1984b; Bispo & Froehlich, 2008; Avelino-Capistrano *et al.*, 2011a; Almeida *et al.*, 2018). Thus, only *Anacroneuria tupi* is a new association and is described in this paper. *K. neotropica* and *K. petersorum* had COI sequence divergences ranging from zero to 1.4% for specimens from São Paulo State and when including specimens from Espírito Santo and Rio de Janeiro ranged from zero to 3.7%. The observed variation is much lower than that found by Avelino-Capistrano *et al.* (2014) to separate species. This result and observations of the color patterns of teneral specimens of dark species of Perlidae suggest that *K. petersorum* is a junior synonym of *K. neotropica*. For this reason, here we synonymize *K. petersorum*.

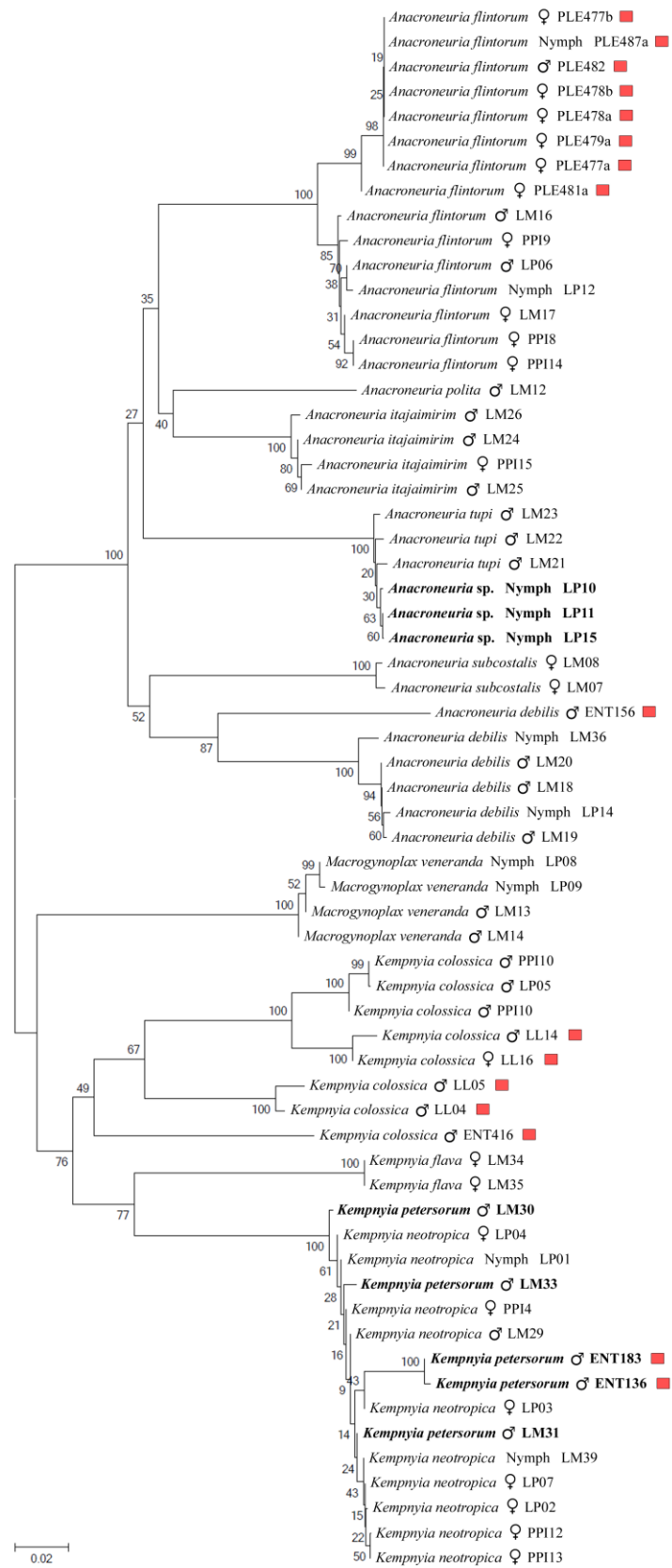


FIGURE 2. Neighbor-joining tree for cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences (413 bp) from Paranapiacaba specimens and related stoneflies from Espírito Santo, Paraná and Rio de Janeiro States, Brazil, modeled by Kimura-2-parameter (K2P). Marking in red: specimens from other localities.

Taxonomy

Genus *Anacroneuria*

Anacroneuria boraceiensis Froehlich, 2004 (Fig. 3A)

Anacroneuria boraceiensis Froehlich, 2004: 54; Bispo & Froehlich, 2004: 103; Novaes & Bispo, 2014c: 434.

Material examined. BR, SP: PEI, Rio Poços Altos, 08.xi.1992, 1 male; PEI, Ribeirão Poços Altos, 18.xi.1992, 1 male; PEI, Rio Poços Altos, 10.xi.1993, CGF & HP, 1 male and 1 female.

Morphometric data. Male (n=3), forewing length: 10.9–11.3 mm.

Remarks. *Anacroneuria boraceiensis* was described from the Biological Station of Boracéia. The penial armature of males is characteristic, as illustrated by Froehlich (2004). The morphology of penial armature of *A. boraceiensis* resembles that of *A. amargosa* Righi-Cavallaro & Froehlich (in Righi-Cavallaro *et al.*, 2013). However, *A. amargosa* is described for State of Bahia, and the two species differs by the size and color pattern.

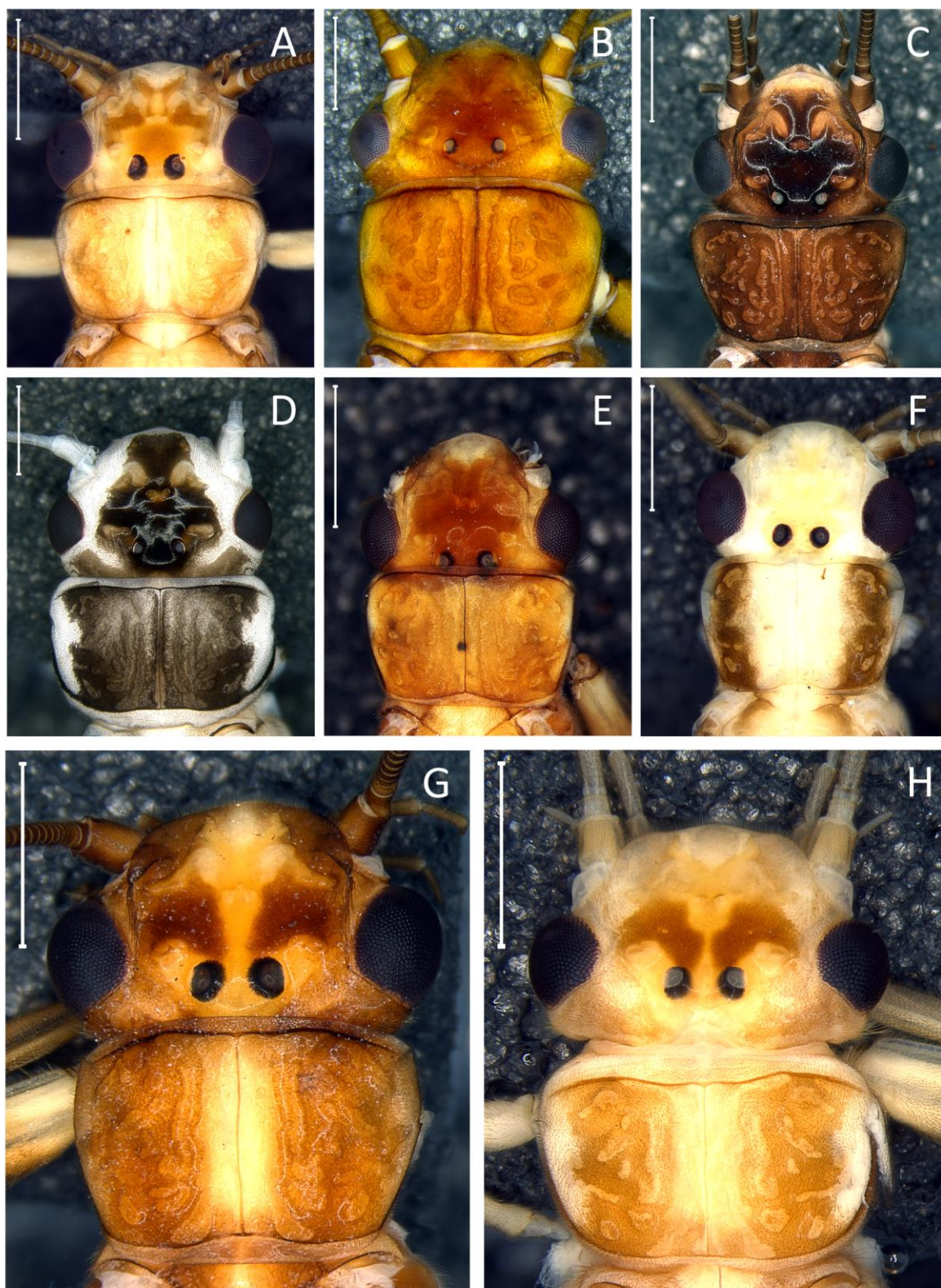


FIGURE 3. Head and pronotum of *Anacroneuria boraceiensis* adult male (A), *A. iporanga* adult male (B), *A. itajaimirim* adult male (C) and teneral female (D), *A. polita* adult male (E), *A. subcostalis* adult male (F), *A. tupi* adult male (G) and teneral male (H). Scale: 1 mm.

***Anacroneuria debilis* (Pictet, 1841)** (Fig. 4A-F)

Perla (*Perla*) *debilis* Pictet, 1841: 255; *Anacroneuria debilis* Zwick, 1972: 1155; Zwick, 1973: 486; Froehlich, 2002b: 76; Froehlich, 2010: 56; Avelino-Capistrano *et al.*, 2011a; Baldin *et al.*, 2013: 392; Bispo *et al.*, 2014; Novaes & Bispo, 2014a: 434; Novaes & Bispo, 2014b: 459; Duarte & Lecci, 2016: 293; Novaes *et al.*, 2016: 95; Almeida & Duarte, 2017: 481.

Material examined. BR, SP: PEI, Ribeirão Água Comprida, 27.x.1999, 1 male; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 28.x.1999, 7 males; PEI, Rio do Carmo, next to Córrego do Inferno, 29.ix.2002, light trap, 1 male; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 30.x.2002, 1 male; PEI, Ribeirão Lajeado, 14.xii.2014, 1 nymph; PEI, Córrego Lajeado, 10.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 4 males; PEI, Córrego Lajeado, 10.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 2 nymphs; PETAR Núcleo Ouro Grosso, Rio Betari, 12.ii.2017, light trap, LHA *et al.* col., 1 male; PETAR Núcleo Santana, Rio Roncador, 15.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male.

Morphometric data. Male (n=16), forewing length: 10–11.4 mm.

Remarks. The species is widely distributed from northeast Brazil to northeastern Paraguay and Argentina (Duarte & Lecci, 2016). This is the first record of this species for Paranapiacaba mountains. The specimens studied presented high similarity of size, pattern of spots and color with *A. flintorum* (Fig. 4A). The penial armature of the specimens studied agrees with the holotype illustration (Zwick, 1972) and the figures of Novaes & Bispo (2014a) (Fig. 4D-F). However, it is slightly different from the pattern demonstrated in Bispo *et al.* (2014) and the redescription of Baldin *et al.* (2013). The COI divergences found between specimens from SP and RJ is high

(12.9% to 14.9%). These differences suggest the need for further studies including molecular tools and a phylogeographic perspective to better understand the relationship of different morphotypes of the species. The teneral specimen present general color pale brownish, remnants of gills on thoracic segments, pronotum little developed and without lateral folds, and milky wings (Fig 4B). The nymphal stage is described by Avelino-Capistrano *et al.* (2011a).

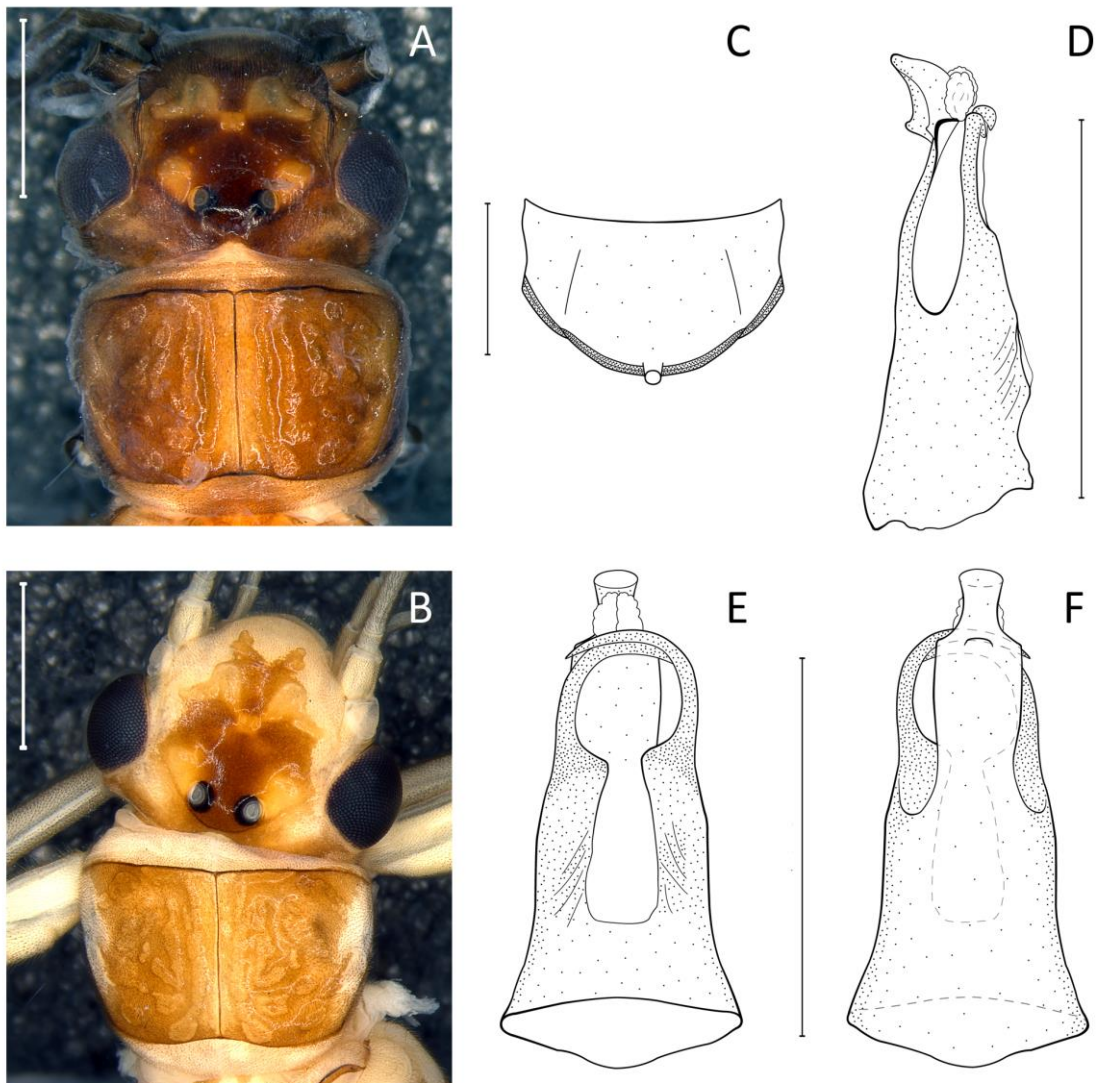


FIGURE 4. *Anacroneuria debilis*. Adult male, head and pronotum (A). Teneral male, head and pronotum (B). Tergum 9 with hammer (C). Penial armature in lateral view (D), ventral (E) and dorsal (F). Scale: 1 mm.

***Anacroneuria fiorentini* De Ribeiro & Froehlich, 2007** (Fig. 5A-E)

Anacroneuria fiorentini De Ribeiro & Froehlich, 2007: 53; Novaes & Bispo, 2014b: 278.

Material examined. BR, SP: PEI, Rio do Carmo (Base Alecrim), 11.viii.2010, light trap, LSL col., 1 male.

Morphometric data. Male (n=1), forewing length: 11.1 mm.

Remarks. Specimen collected in area of difficult access, location still poorly sampled in Paranapiacaba mountains. The specimens collected is teneral, for this reason, thus the color pattern presented here needs to be viewed with caution. The specimens present part of body pale, pronotum fold with development almost complete, remnants of gills on thoracic segments and milky wings (Fig. 5A). The specimen studied agrees with the described by De Ribeiro & Froehlich (2007) in pattern of color and spots in the head and present slight variation in penial armature. In lateral view the penial armature is similar, but in dorsal view present slight differences in the apex and hooks (Fig. 5C-E). The apex, in dorsal view, is similar when viewed with a slight inclination, having the same pattern as that presented by the holotype. The holotype is recorded for Caraá (RS), and the species is also found for Orleans (SC), and now for PEI (SP). The differences of this specimen in relation to *A. fiorentini* are not enough to consider it as belonging to another species.

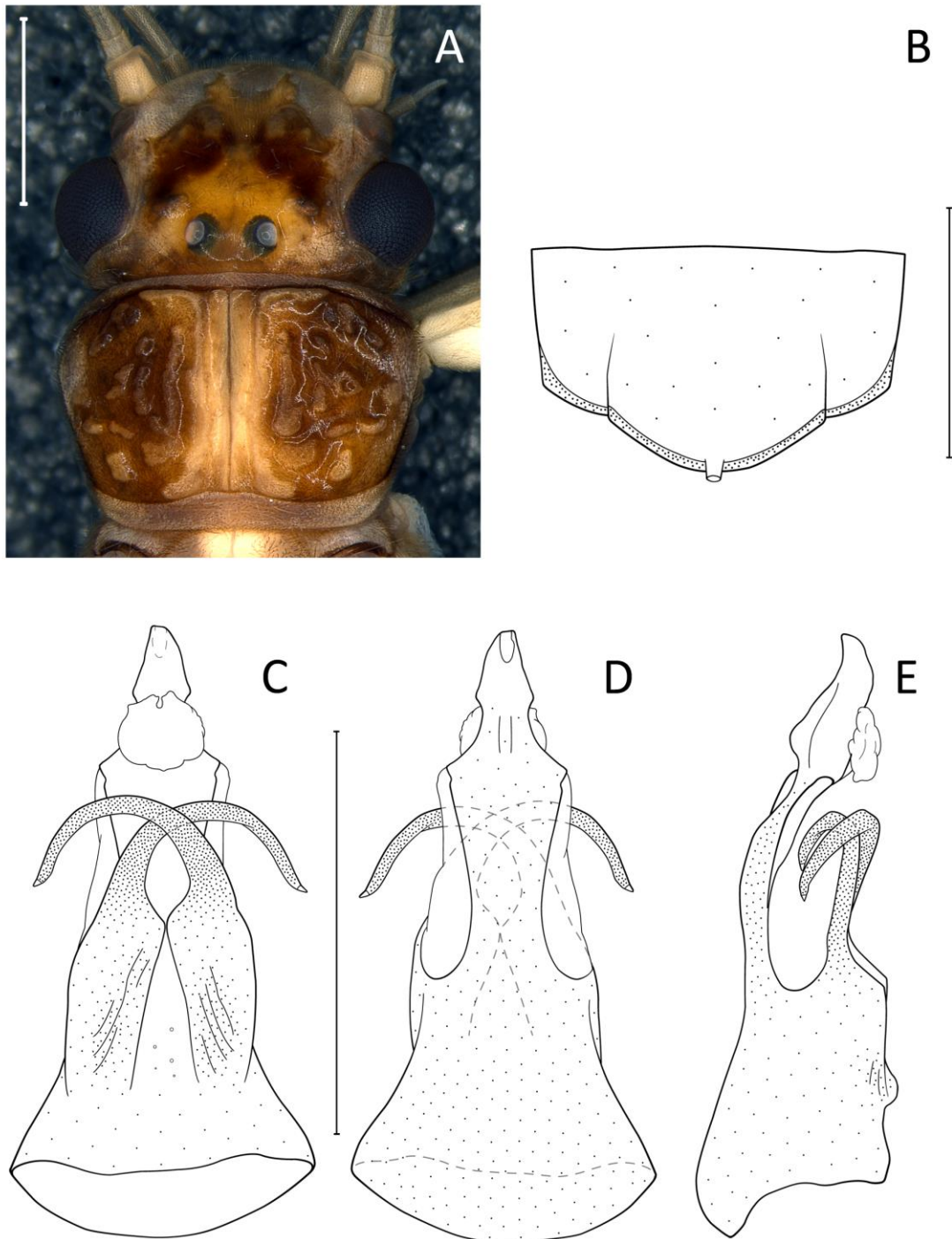


FIGURE 5. *Anacroneuria fiorentini*. Teneral male, head and pronotum (A). Tergum 9 with hammer (B). Penial armature in ventral view (C), dorsal (D) and lateral (E). Scale: 1 mm.

***Anacroneuria flintorum* Froehlich, 2002**

Anacroneuria flintorum Froehlich, 2002b: 93; Bispo & Froehlich, 2004: 99; De Ribeiro & Froehlich, 2007: 55; Froehlich, 2010: 56; Baldin *et al.*, 2013: 394; Gonçalves *et al.*, 2017: 146; Almeida *et al.*, 2017.

Material examined. BR, SP: Iporanga, Gruta da Tapagem, 15.xi.1991, 1 male; PEI, Rio do Carmo, 19.ii.1992, 1 male; PEI, Rio do Carmo, 16.ii.1993, 2 males, PEI; Rio Poços Altos, 10.xi.1993, CGF & HP col., 2 males; PETAR, Rio Betari, Bairro da Serra, 20.viii.1996, light trap, ASM col., 1 male; PEI, Córrego Lajeado, 24.ii.1999, 2 males; PEI; Córrego Lajeado, 17.ix.1999, 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 27.x.1999, 3 males; PEI, Rio do Carmo, 28.x.1999, 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 23.xi.1999, 7 males; PEI, Ribeirão Água Comprida, 06.i.2000, 8 males; PEI, Rio Poços Altos, 01.ii.2000, 2 males; PEI, Rio do Carmo, 25.iii.2000, 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 24°17'38"S, 48°25'04"W, 30.x.2002, ASM col., 1 male; PECB, Rio Taquaral, 09.ix.2006, 1 male; PEI, Córrego Roda D'Água, 13.xii.2014, light trap, PCB col., 1 female; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 14.xii.2014, light trap, PCB col., 1 male and 1 female; PEI, Córrego do Mirante, 15.xii.2014, light trap, PCB col., 1 female; PECB, Rio Taquaral, bridge, 05.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph; PECB, Ribeirão de Pedras, bridge, 06.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 08.ii.2017, light trap, LHA *et al.* col., 1 male; PEI, Ribeirão Bocaina, bridge, 24°16'13"S, 48°27'09"W, 12.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; PETAR Núcleo Santana, Riacho Furnas, 14.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 2 males; PETAR Núcleo Santana, Rio Roncador, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male. **BR,**

ES: Caparaó, Rio Santa Marta, 18.ii.2016, FFST col., 2 females and 1 nymph; Caparaó, Pedra Menina, Base, 15-16.ii.2016, FFST col., 1 male and 3 female.

Morphometric data. Male (n=41), forewing length: 10–11.5 mm.

Remarks. *Anacroneuria flintorum* was described by Froehlich (2002) and it is the species most easily found in region of Paranapiacaba mountains. The species is distributed along of Atlantic Forest (ES, MG, SC, SP, RJ and RS) (Almeida *et al.*, 2018). Bispo & Froehlich (2004) recorded *A. petersi* Froehlich for the region, however, after new studies we conclude that it was a teneral specimen of *A. flintorum*. Images of head and pronotum of all life stages of *A. flintorum* are presented by Almeida *et al.* (2018).

***Anacroneuria iporanga* Bispo & Froehlich, 2004** (Fig. 3B)

Anacroneuria iporanga Bispo & Froehlich, 2004: 103.

Material examined. **BR, SP:** Iporanga, PEI, Ribeirão Água Comprida, 24°17'36"S, 48°25'06"W, 23.ix.1999, PCB and VLCB col., 1 male (Holotype/MZSP); PEI, Córrego Bocaina, 28-30.xi.2000, 24°16'22,6"S, 48°25'21,8"W, PCB col., 1 male (Paratype/MZSP); PEI, Córrego Bocaina, 28.viii.2009, 24°16'22,6"S, 48°25'21,8"W, PCB col., 1 nymph.

Morphometric data. Male (n=2), forewing length: 16–17 mm.

Remarks. The species was described by Bispo & Froehlich (2004) from the PEI. The species is most easily found in Córrego Bocaina (PEI) and presented pattern of coloration (Fig 3B), hammer and penial armature very characteristic.

***Anacroneuria itajaimirim* Bispo & Froehlich, 2004** (Fig. 3C-D)

Anacroneuria itajaimirim Bispo & Froehlich, 2004: 105.

Material examined. BR, SP: PEI, Ribeirão Bocaina, 24°16'22,6"S, 48°25'21,8"W, 21.i.2011, 1 male; PEI, Córrego Roda D'Água, 16.ii.2013, 1 male; PEI, Córrego Roda D'Água, 24°16'17"S, 48°25'20"W, 07.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 09.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 2 males; PETAR Núcleo Ouro Grosso, Trilha das Figueiras, 13.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; PETAR Núcleo Santana, Riacho Furnas, 14.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 4 males.

Morphometric data. Male (n=11), forewing length: 10.8–11.5 mm.

Remarks. Bispo & Froehlich (2004) described the species from the PEI. The pattern of penial armature of species is very characteristic. This species is dark brownish (Fig. 3C) and ochraceous when preserved in alcohol. The species has been recorded just in Paranapiacaba mountains. The teneral specimens present general color pale brownish (Fig. 3D), remnants of gills on thoracic segments, pronotum little developed and without lateral folds, and milky wings.

***Anacroneuria polita* (Burmeister, 1839)** (Fig. 3E)

Perla polita Burmeister, 1839: 879; *Anacroneuria polita*, Zwick, 1972: 1163; Froehlich, 2002b: 85; Froehlich, 2004: 58; Bispo & Froehlich, 2004: 98; Novaes & Bispo, 2014a: 459; Novaes & Bispo, 2014c: 435.

Material examined. BR, SP: PEI, Saibadela, no data, ASM col., 1 male; PECB, Ribeirão de Pedras, bridge, 06.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; BR, PR: Morretes, Mata Atlântica Park Hotel, 12.i.2012, 5 males.

Morphometric data. Male (n=7), forewing length: 9–9.5 mm.

Remarks. *Anacroneuria polita* is a small and dark species (Fig. 3E), when in alcohol it loses part of its coloration. The penial armature of the studied specimens is represented by Bispo & Froehlich (2004) and shows differences in their apex and keel when compared to the illustrated by Zwick (1972) and Froehlich (2002b). These differences suggest the need for more studies to clarify the relationship between species morphotypes. The morphotypes are externally similar, including size and color pattern, but the penial armature presents some differences.

***Anacroneuria subcostalis* Klapálek, 1921 (Fig. 3F)**

Anacroneuria subcostalis Klapálek, 1921: 326; *Anacroneuria subcostalis*, Jewett, 1960: 174; Froehlich, 2002b: 86; Froehlich, 2004: 59; Bispo & Froehlich, 2004: 99; Baldin *et al.*, 2013: 392; Gonçalves *et al.*, 2017: 147.

Material examined. BR, SP. PEI, Ribeirão Água Comprida, 24°17'36"S, 48°25'06"W, 09.iii.2004, light trap, ASM col., 1 male and 1 female; PEI, Córrego Roda D'Água, 16.iii.2013, light trap, LSL col., 1 male and 4 females.

Morphometric data. Male (n=2), forewing length: 10.6–11 mm.

Remarks. *Anacroneuria subcostalis* is a species easily identified in the region for their pattern of coloration. It is a light species with dark bands on the sides of pronotum and on subcostal vein (Fig. 3F). The central region of head presents a

yellowish spot. This pattern is uncommon in species of southeast of Brazil, however, is common in species of the north and northeastern. The male of species is described by Froehlich (2004).

***Anacroneuria tupi* Bispo & Froehlich, 2004** (Fig. 3G-H and 6A-H)

Anacroneuria tupi Bispo & Froehlich, 2004: 105.

Material examined. BR, SP: PEI, Córrego Lajeado, 24.ix.1999, 1 male; PEI, Rio do Carmo, next to Córrego do Inferno, 29.ix.2002, light trap, 2 males; PECB, Rio Taquaral, 09.ix.2006, 3 males and 1 female, PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 14.xii.2014, 3 nymphs; PECB, Braço do Rio Taquaral, bridge, 05.ii.2017, light trap, LHA *et al.* col., 1 male; PECB, Braço do Rio Taquaral, bridge, 05.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 08.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 09.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 3 males.

Morphometric data. Male (n=11), forewing length: 10–11.2 mm. Nymph (n=3): head width 2.5-2.7 mm, head length 2.1 mm, pronotum width 2.6-2.8 mm, pronotum length 1.4-1.5 mm, cercal length 6.5 mm, total length 9.2-9.7 mm.

Description of nymph. General colour dark brown in dorsal view and light yellow in ventral view. Head dark brown with light yellow areas near post-frontal suture, occiput and in frontoclypeal region. Eyes and ocelli black with a thin clear layer over the last (Fig. 6A). Clypeus dark brown, labrum light yellow, maxillae light yellow, mandible brown with darker base and five pointed teeth, decreasing in size

from 1st to 5th, but teeth 3rd and 4th are the same size (Fig. 6A, E and D), Pronotum dark brown with thin median line and rugosities light yellow (Fig. 6A). Wing pad lighter with brown spot (Fig. 6B). Forefemur pale with a central line without setae and lateral surface covered by sparse bristles, anteriorly and posteriorly with higher density of thick bristles, and posteriorly with fringe of hairs. Tibia anteriorly with sparse thick bristles, and posteriorly with a row of thick bristles and a well-developed band of hairs (Fig. 6G). Abdomen dark brown following the pattern of body with a light spot in center of the 11th tergum (Fig. 6C). Cerci pale with thick bristles, segments differ in shape and size from base to apex (Fig. 6H). Thoracic gills: ASC1, AT2, AT3 and PT3.

Remarks. In adults, the pattern of spots is very characteristic, with two dark spots in the head between the M-line and the ocelli (Fig. 3G). These spots are conserved in the teneral specimens (Fig. 3H), which have remnants of gills and milky wings. The penial armature stands out for its apical portion quite distinct from the others, mainly in dorsal view. The nymph also has a characteristic pattern of spots on the head, being different from all the nymphs described so far for the genus.

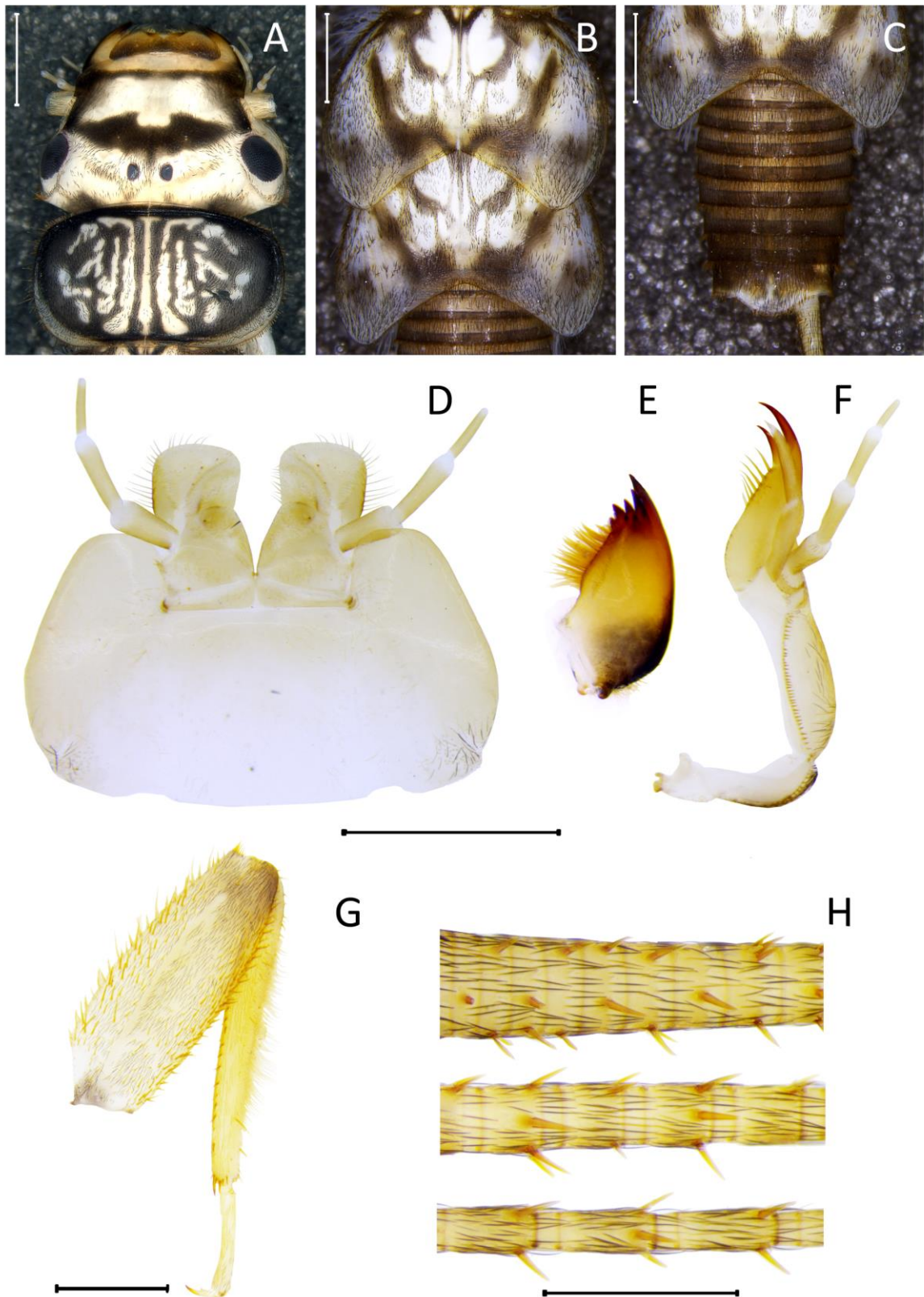


FIGURE 6. *Anacroneuria tupi*. Nymph. Head and pronotum (A), mesonotum and metanotum (B), abdomen (C), labium (D), right mandible (E), right maxilla (F), pronotum leg (G), cerci in proximal, medial and distal view (H). Scales: 1 mm for A-G and 0.5 mm for H.

Genus *Kempnyia*

Kempnyia auberti Froehlich, 1996

Kempnyia auberti Froehlich, 1996: 117.

Material examined. BR, SP: Iporanga, PEI, Rio Poços Altos, 10.xi.1993, CGF and ASM col., 1 male (Holotype).

Morphometric data. Male (n=1), forewing length: 22 mm.

Remarks. The species is very rare and is described by Froehlich (1996). The holotype is a large specimen, brown in general color with ochraceous areas. The penial armature is slight different from *K. neotropica*, with differences in the membranous areas, especially in lateral view. The hammer is different from *K. neotropica*. Froehlich (1996) already showed the similarity between species, separating them basically by the differences between the hammer, size and coloration. The differences suggest the need for further studies including molecular tools, to better understand the relationship of the species.

Kempnyia colossica (Navás, 1934) (Fig. 7A-B)

Laeissa colossica Navás, 1934: 22; *Laeissa colossica*, Jewett, 1959: 151; *Kempnyia colossica* Froehlich, 1988: 154; Bispo & Froehlich, 2004: 110; Stark *et al.*, 2009: 124; Froehlich, 2010: 180; Froehlich, 2011a: 03; Froehlich, 2011c: 21; Bispo *et al.*, 2013: 02; Novaes & Bispo, 2014a: 464; Avelino-Capistrano *et al.*, 2014: 330; Gonçalves *et al.*, 2017: 147.

Material examined. **BR, SP:** PEI, Rio do Carmo, 20.ii.2000, 1 male; PEI, Ribeirão Bocaina, 27.vii.2000, 1 nymph; PEI, Córrego Araçá, 24°19'35"S, 48°25'52"W, 28.x.2002, light trap, ASM col., 1 male and 1 female; PEI, Rio do Carmo, bridge, 14.xii.2014, PCB col., 3 males; PECB, Ribeirão de Pedras, bridge, 06.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 1 male; PECB, Ribeirão de Pedras, bridge, 06.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph. **BR, PR:** Morretes, Mata Atlântica Park Hotel, 12.i.2012, light trap, 3 males and 1 female. **BR, SC:** Grão Pará, PE Serra Furada, Rio CAPEA, 28°11'23"S, 49°23'32"W, 08.i-16.ii.2013, malaise, 2 males; Corupá, Cachoeira do Braço Esquerdo, 22.iv.2017, 26°21'59.8"S, 49°14'11.3"W, light pan trap, 1 male.

Morphometric data. Male (n=6), forewing length: 22.5–28 mm.

Remarks. This large size species is recorded in States of Espírito Santo, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina and São Paulo. The nymph (Fig. 7B) was described by Bispo *et al.* (2013). Froehlich (1988) registered slightly variation in color pattern and penial armature between specimens from the State of São Paulo and Santa Catarina. Avelino-Capistrano *et al.* (2014) using the specific molecular marker COI (cytochrome c oxidase subunit 1), observed considerable divergence (15.1%) between specimens from the States of São Paulo and Rio de Janeiro. Avelino-Capistrano *et al.* (2016) registered a small molecular divergence (8.3%) for the same marker between *K. colossica* and *K. guassu* Froehlich. Using the same marker, we found molecular high divergences between specimens from States of Paraná, Santa Catarina, São Paulo and Rio de Janeiro. The analysis suggests 3 groupings, one with specimens from PR and SP and the other two with specimens from SC and RJ. However, further studies about the species, including the relationship of the species with *K. guassu*, are needed.

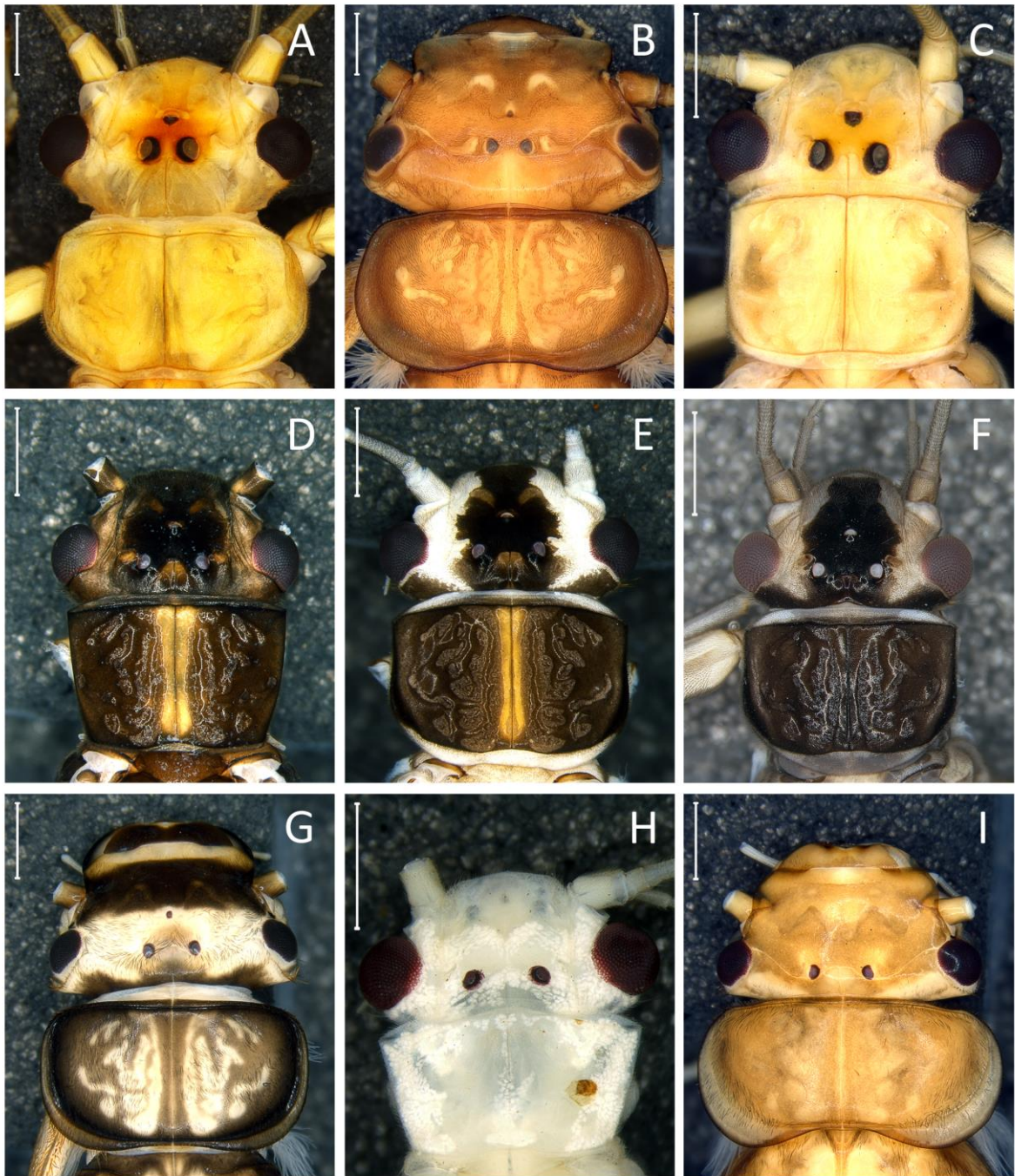


FIGURE 7. Head and pronotum of *Kempnyia colossica* adult male (A) and nymph (B), *K. flava* adult male (C), *K. neotropica* adult female (D), adult teneral (E and F) and nymph (G), *Macrogynoplax veneranda* adult male (H) and nymph (I). Scale: 1 mm.

***Kempnyia flava* Klapálek, 1916 (Fig. 7C)**

Kempnyia flava Klapálek, 1916: 51; Jewett, 1960: 177; Zwick, 1972: 1171; Froehlich, 1988: 153; Bispo & Froehlich, 2004: 109; Froehlich, 2010: 180; Froehlich, 2011c: 21; Gonçalves *et al.*, 2017: 147.

Material examined. BR, SP: PEI, Rio do Carmo, 28.x.1999, 1 male; PEI, Rio do Carmo, bridge, 24°18'15"S, 48°24'31"W, 20.ii.2000, 1 male; PECB, Rio Bonito, bridge, 06.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 2 female.

Morphometric data. Male (n=2), forewing length: 12.4–14 mm.

Remarks. Specie predominantly yellowish with characteristic penial armature (Froehlich, 1988). *Kempnyia flava* is recorded in the States of Espírito Santo, Rio de Janeiro and São Paulo.

***Kempnyia neotropica* (Jacobson & Bianchi, 1841) (Fig. 7D-G)**

Perla (*Perla*) *obscura* Pictet, 1841: 28; *Perla neotropica* Jacobson & Bianchi, 1905: 617; *Macrogynoplax aterrima* Klapálek, 1916: 73; *Kempnyia neotropica*, Zwick, 1972: 1168; Zwick, 1973: 276; Stark, 2001: 415; Bispo & Froehlich, 2004: 107; Bispo & Froehlich, 2008; Stark *et al.*, 2009: 124; Froehlich, 2010: 181; Froehlich, 2011b: 133; Froehlich, 2011c: 22; Novaes & Bispo, 2014a: 464; Novaes & Bispo, 2014b: 283; Novaes *et al.*, 2016: 98; Gonçalves *et al.*, 2017: 147.

Kempnyia petersorum, Froehlich, 1996: 119; Froehlich, 2011b: 134. New synonym.

Material examined. BR, SP: PEI, Rio do Carmo, 27.ii.1997, ASM col., 1 male; PEI, Ribeirão Água Comprida, 29.xi.2000, 1 male; PEI, Rio do Carmo, bridge, 14.xii.2014, PCB col., 7 female and 1 nymph; PECB, Ribeirão de Pedras, bridge, 06.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 2 males; PEI, Rio do Carmo, bridge, 08.ii.2017, D-net, LHA *et al.* col., 1 nymph; PEI, Rio do Carmo, bridge, 09.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 3 males.

Morphometric data. Male (n=7), forewing length: 12–14.5 mm.

Remarks. *K. neotropica* is a widely distributed species, being found from SC to GO, and is quite common in Paranapiacaba mountains (Fig. 7D). It is a species that has always generated discussions. Zwick (1972) showed that the penial variations of *K. neotropica*, among them that of *K. obscura* and *K. fusca* variations, were not sufficient to separate them into different species. In his study, Zwick considered that the names were unsustainable and that all variations were *K. neotropica*. Froehlich (1996) described *K. petersorum* (Fig. 7E) as a new species, evidencing its similarities of penial armature with *K. neotropica* and its main difference, the coloring pattern (Fig. 7D-E). Since then, several authors have evidenced the similarities between *K. petersorum* and *K. neotropica* (Bispo & Froehlich, 2004, Bispo & Froehlich, 2008, Avelino-Capistrano *et al.*, 2013 and Novaes & Bispo, 2014a). Avelino-Capistrano *et al.* (2014) evidences the presence of dark and light specimens of *K. petersorum* in the same locations in Rio Macaé Basin (RJ), describing also a nymph very similar to that of *K. neotropica* (Fig. 7F) described by Bispo & Froehlich (2008). Novaes & Bispo (2014b) evidence lighter specimens of *K. neotropica*. In our study, specimens of *K. petersorum* and *K. neotropica* were associated in molecular analysis with COI variation ranging from zero to 2.1% for specimens from SP. In this analysis, the specimens of *K. petersorum* from SP agrees morphologically with holotype, and *K.*

neotropica agrees with redescription (Zwick, 1972; Bispo & Froehlich, 2008). The COI divergences found between specimens from SP and RJ range from 1.5% to 4.2%. These slight variations suggest a synonymizing of *K. petersorum* with *K. neotropica*. The pattern of coloration of *K. petersorum* specimens is probably a teneral pattern. The nymph of *K. petersorum* described by Avelino-Capistrano *et al.* (2014) presented absence of anal gills, this may be due to the morphological variation.

Genus *Macrogynoplax*

***Macrogynoplax veneranda* Froehlich, 1984b** (Fig. 7H-I)

Macrogynoplax veneranda Froehlich, 1984b: 39; Bispo & Froehlich, 2004: 111.

Material examined. BR, SP: PEI, v.1992, CGF col., 1 female; PEI, Córrego Pedrinhas, 19.ii.2000, ASM col., 1 male; PEI, Córrego Roda D'Água, 11.iii.2013, light trap, LSL col, 3 female; PEI, Córrego Cacadinho, 14.iii.2013, light trap, LSL col, 1 female; PEI, Stream behind the research headquarters, 15.iii.2013, LSL col., 1 male; PEI, Córrego Roda D'Água, 14.xii.2014, D-net, PCB col., 1 nymph; PEI, Córrego do Mirante, 15.xii.2014, PCB col., 1 nymph; PEI, Córrego Roda D'Água, 24°16'17"S, 48°25'20"W 07.ii.2017, light pan trap, LHA *et al.* col., 4 males.

Morphometric data. Male (n=6), forewing length: 14.3–14.6 mm.

Remarks. Froehlich (1984b) described all life stages of this species (Fig. 7G-H). *Macrogynoplax veneranda* is the unique species of the genus recorded in

southeastern Brazil. In life is predominantly green, preserved in alcohol is yellowish at first time and white after a long time.

Delimitation of species using COI divergences

The molecular marker COI has been widely used to help identify and delimit species. Understanding the intraspecific divergence is a key step in this process. As regards the neotropical portion of the Perlidae family, high maximum intraspecific divergences were found, differing from the values initially proposed by Hebert *et al.* (2003a, 2003b). Avelino-Capistrano *et al.* (2014) found maximum intraspecific divergences of 15.1% in *Kempnyia colossica* (Navas), 11.2% in *K. gracilenta*, 7.7% in *K. jatim* and 9.6% in *K. obtusa* and *K. varipes*. High values may be related to geographic isolation between populations or indicate cryptic species, as raised by Mynott *et al.* (2011). On the other hand, Almeida *et al.* (2018) when studying isolated populations of *Anacroneuria flintorum* found maximum intraspecific divergence of 3.9%. In this way, variations can occur, and the percentages of divergence should be better studied.

We considered as a species, the groupings in which the specimens corroborated in morphological information and presented less divergence of the COI than the divergence between morphologically distinct specimens. Of the species sampled, only *Anacroneuria debilis*, *Kempnyia colossica* and *K. neotropical* had more than one sampled population. *A. debilis* is a species with a large number of small morphological variations, until now poorly understood. The intraspecific divergence of *A. debilis* between SP and RJ populations ranged from 12.9% to 14.9%, whereas between populations of *A. flintorum* from SP and ES the values are lower, with a

maximum divergence of only 3.9%. The morphological variation presented by *A. flintorum* is well documented by Almeida *et al.* (2018), and *A. debilis* can be considered as having more variation. When comparing the morphological and molecular information among the species, it is evident the need to understand more clearly the ideal percentage of the COI divergence for the separation of species within the genus. Concerning the genus *Kempnyia*, the grouping of *K. neotropical* presented maximum divergence of only 4.2%, including a population from RJ. On the other hand, *K. colossica* had four sampled populations and presented intraspecific divergence ranging from zero to 18.3%. The three grouping obtained, one of them with populations from SP and PR, another from SC and another from RJ, show us that the species needs to be better studied, including morphologically similar species, such as *K. guassu*. This necessity occurs because we do not really understand the limits, both molecular and morphological, between some populations or species.

Of course, the explanation that the high values of COI divergence among populations of the same species is a consequence of population isolation or that may indicate cryptic species is quite plausible. However, they should not be treated as definitive explanations, since isolated populations of other species presented much smaller values of COI divergence. This observation suggests that the explanations can be much more complex and that studies involving biogeography and others molecular markers should be performed.

**Key identification to male adults of Perlidae from the Paranapiacaba mountains
(modified from Bispo & Froehlich, 2004).**

- 1 Hammer small, projecting, conical, if short, then rounded. Postfrontal line an open V *Anacroneuria* 2
- Hammer otherwise. Postfrontal line W-shaped 8
- 2 Hammer short and rounded. General colour dark brown (fw 16–17mm)
. *Anacroneuria iporanga*
- Hammer conical 3
- 3 Ventral vesicles absent 4
- Ventral vesicles present 5
- 4 Penial armature distally tilted ventrally. General colour light brown to ochraceous (fw 10.9–11.3mm) *Anacroneuria boraceiense*
- 5 Hooks relatively far from ventral vesicles 6
- Hooks touching or very near ventral vesicles 7
- 6 Apical portion of penial armature elongate. General colour brown (fw 10–11.5mm) *Anacroneuria flintorum*
- Frons yellowish with a brown spot on each side extending from M-line to scars (fw ~11.1mm) *Anacroneuria fiorentini*
- 7 Penial armature with inclined apex in lateral view. Keel transverse in dorsal view. (fw 8.5–11mm) *Anacroneuria debilis*
- Penial armature subparallel in dorsal/ventral view, a little constricted at middle. General colour dark brown (fw 10.8–11.5mm) *Anacroneuria itajaimirim*
- General colour brown to dark brown (fw 9–9.5mm)
. *Anacroneuria polita*

- Forewings with a distal colorless window (fw 10.6–11mm)
 *Anacroneuria subcostalis*
- Frons with a pair of dark, curved spots between eyes/scars and M-line. Penial
 armature distally tilted dorsally (fw 10–11.2mm) *Anacroneuria tupi*
- 8 General colour greenish in life, pale yellowish in alcohol. Eyes with medial
 unpigmented area (fw 14.3–14.6mm) *Macrogynoplax veneranda*
- General colour variable. Eyes wholly pigmented *Kempnyia* 9
- 9 Penis with spiny pads on membrane 10
- Penial membrane lacking spiny pads 11
- 10 Male forewing longer than 17 mm. General colour ochraceous (fw ~22mm)
 *Kempnyia auberti*
- General colour dark (fw 12–15mm) *Kempnyia neotropica*
- 11 Male forewing longer than 22 mm. General colour light brown-ochraceous (fw
 22–28mm) *Kempnyia colossica*
- Male forewing shorter than 18 mm. General colour yellowish light
 brownochraceous (fw 12.4–14mm) *Kempnyia flava*

TABLE 2. Specimen vouchers with respective identification, collecting locality and GenBank accession codes of COI sequences.

Species / Specimen life stage	Voucher code	Locality	COI GenBank Accession
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PLE477a	BR, ES, PARNA Caparaó, Rio Santa Marta	MG737305
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PLE477b	BR, ES, PARNA Caparaó, Rio Santa Marta	MG737306
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PLE478a	BR, ES, PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base	MG737307
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PLE479a	BR, ES, PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base	MG737308
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PLE481a	BR, ES, PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base	MG737313
<i>A. flintorum</i> Froehlich m#	PLE482	BR, ES, PARNA Caparaó, Pedra Menina, Base	MG737310
<i>A. flintorum</i> Froehlich nymph	PLE487a	BR, ES, PARNA Caparaó, Rio Santa Marta	MG737311
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PPI8	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	MG737315
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PPI9	BR, SP, Iporanga, PEI, Córrego do Mirante	MG737316
<i>A. flintorum</i> Froehlich f#	PPI14	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	MG737317
<i>A. flintorum</i> Froehlich m#	LP06	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	MG737319
<i>A. flintorum</i> Froehlich nymph	LP12	BR, SP, Iporanga, PEI, Córrego do Mirante	MG737320
<i>A. flintorum</i> Froehlich m#	LM16	BR, SP, Apiaí, PETAR., Riacho Furnas	
<i>A. flintorum</i> Froehlich m#	LM17	BR, SP, Apiaí, PETAR, Rio Roncador	
<i>A. polita</i> (Burmeister) m#	LM12	BR, SP, São Miguel Arcanjo, PECB, Ribeirão de Pedras	
<i>A. itajaimirim</i> Bispo & Froehlich f#	PPI15	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	MG737318
<i>A. itajaimirim</i> Bispo & Froehlich m#	LM24	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	
<i>A. itajaimirim</i> Bispo & Froehlich m#	LM25	BR, SP, Apiaí, PETAR., Riacho Furnas	
<i>A. itajaimirim</i> Bispo & Froehlich m#	LM26	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>A. sp.</i> nymph	LP10	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>A. sp.</i> nymph	LP11	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>A. sp.</i> nymph	LP15	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>A. tupi</i> Bispo & Froehlich m#	LM21	BR, SP, São Miguel Arcanjo, PECB, Rio Taquaral	
<i>A. tupi</i> Bispo & Froehlich m#	LM22	BR, SP, São Miguel Arcanjo, PECB, Rio Taquaral	
<i>A. tupi</i> Bispo & Froehlich m#	LM22	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>A. subcostalis</i> Klapálek f#	LM07	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	
<i>A. subcostalis</i> Klapálek f#	LM08	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	
<i>A. debilis</i> Pictec m#	ENT156	BR, RJ, Macaé, Sana, Rio Sana (DZRJ#1634)	KT184662
<i>A. debilis</i> Pictec nymph	LP14	BR, SP, Iporanga, PEI, Ribeirão Lajeado	
<i>A. debilis</i> Pictec m#	LM18	BR, SP, Apiaí, PETAR, Rio Roncador	
<i>A. debilis</i> Pictec m#	LM19	BR, SP, Iporanga, PEI, Ribeirão Lajeado	

TABLE 2. Continued

Species / Specimen life stage	Voucher code	Locality	COI GenBank Accession
<i>A. debilis</i> Pictet m#	LM20	BR, SP, Apiaí, PETAR, Nécleo Ouro Grosso, Rio Betari	
<i>A. debilis</i> Pictet nymph	LM36	BR, SP, Iporanga, PEI, Ribeirão Lajeado	
<i>M. veneranda</i> Froehlich nymph	LP08	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	
<i>M. veneranda</i> Froehlich nymph	LP09	BR, SP, Iporanga, PEI, Córrego do Mirante	
<i>M. veneranda</i> Froehlich m#	LM13	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	
<i>M. veneranda</i> Froehlich m#	LM14	BR, SP, Iporanga, PEI, Roda D'agua	
<i>K. colossica</i> Navás m#	ENT416	BR, RJ, Macaé, Sana, Rio São Bento (DZRJ#1594)	KT184675
<i>K. colossica</i> Navás m#	PPI10	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. colossica</i> Navás m#	PPI11	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. colossica</i> Navás m#	LP05	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. colossica</i> Navás m#	LL04	BR, SC, Grão Pará	
<i>K. colossica</i> Navás m#	LL05	BR, SC, Grão Pará	
<i>K. colossica</i> Navás m#	LL14	BR, PR, Morretes, Mata Atlântica Park Hotel	
<i>K. colossica</i> Navás f#	LL16	BR, PR, Morretes, Mata Atlântica Park Hotel	
<i>K. flava</i> Klapálek f#	LM34	BR, SP, São Miguel Arcanjo, PECB, Rio Bonito	
<i>K. flava</i> Klapálek f#	LM35	BR, SP, São Miguel Arcanjo, PECB, Rio Bonito	
<i>K. petersorum</i> Froehlich m#	ENT136	BR, RJ, Macaé, Sana, Rio São Bento (DZRJ#1592)	KT184666
<i>K. petersorum</i> Froehlich m#	ENT183	BR, RJ, Macaé, Sana, Rio São Bento (DZRJ#2588)	KT184665
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	PPI4	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	PPI12	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	PPI13	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) nymph	LP01	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	LP02	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	LP03	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	LP04	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) f#	LP07	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) m#	LM29	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. petersorum</i> Froehlich m#	LM30	BR, SP, São Miguel Arcanjo, PECB, Ribeirão de Pedras	
<i>K. petersorum</i> Froehlich m#	LM31	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. petersorum</i> Froehlich m#	LM33	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) nymph	LM39	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	
<i>K. neotropica</i> (Jacobson & Bianchi) nymph	LM39	BR, SP, Iporanga, PEI, Rio do Carmo	

TABLE 3. Kimura-2-parameter (K2P) divergences between pair of COI sequences.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
	PLE 477a	PLE 477b	PLE 478a	PLE 478b	PLE 479a	PLE 481a	PLE 482	PLE 487a	PPI 8	PPI 9	PPI 14	LP 06	LP 12	LM 16	LM 17	LM 12	
1	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477a																
2	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477b	0,000															
3	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478a	0,000	0,000														
4	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478b	0,000	0,000	0,000													
5	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE479a	0,000	0,000	0,000	0,000												
6	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE481a	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007											
7	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE482	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007										
8	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE487a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000									
9	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI8	0,038	0,039	0,038	0,038	0,038	0,026	0,038	0,039								
10	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI9	0,036	0,037	0,036	0,036	0,036	0,025	0,036	0,036	0,009							
11	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI14	0,037	0,039	0,037	0,037	0,038	0,026	0,038	0,039	0,000	0,009						
12	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP06	0,035	0,036	0,035	0,035	0,035	0,023	0,035	0,036	0,007	0,005	0,007					
13	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP12	0,039	0,039	0,039	0,038	0,039	0,025	0,038	0,039	0,009	0,007	0,009	0,002				
14	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM16	0,032	0,034	0,032	0,032	0,033	0,024	0,033	0,034	0,007	0,005	0,007	0,003	0,005			
15	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM17	0,035	0,036	0,035	0,035	0,035	0,023	0,035	0,036	0,003	0,005	0,003	0,003	0,005	0,003		
16	<i>Anacroneuria polita</i> LM12	0,159	0,158	0,160	0,161	0,158	0,155	0,161	0,160	0,140	0,138	0,142	0,141	0,139	0,143	0,139	
17	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> PPI15	0,141	0,141	0,142	0,143	0,142	0,123	0,144	0,143	0,128	0,123	0,127	0,127	0,128	0,122	0,123	0,125
18	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> LM24	0,133	0,131	0,133	0,134	0,131	0,121	0,134	0,132	0,124	0,119	0,126	0,122	0,123	0,123	0,115	0,109
19	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> LM25	0,134	0,134	0,134	0,135	0,134	0,124	0,137	0,135	0,128	0,123	0,128	0,126	0,127	0,126	0,123	0,117
20	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> LM26	0,131	0,131	0,131	0,133	0,132	0,125	0,134	0,132	0,128	0,123	0,128	0,126	0,127	0,126	0,123	0,115
21	<i>Anacroneuria</i> sp. LP10	0,173	0,176	0,174	0,175	0,174	0,169	0,174	0,178	0,166	0,163	0,166	0,163	0,165	0,163	0,161	0,167
22	<i>Anacroneuria</i> sp. LP11	0,174	0,177	0,174	0,175	0,174	0,167	0,175	0,178	0,164	0,162	0,164	0,162	0,163	0,162	0,159	0,168
23	<i>Anacroneuria</i> sp. LP15	0,174	0,177	0,174	0,176	0,174	0,168	0,175	0,179	0,165	0,163	0,165	0,163	0,164	0,163	0,160	0,169
24	<i>Anacroneuria tupi</i> LM21	0,183	0,186	0,183	0,184	0,182	0,172	0,184	0,187	0,168	0,164	0,169	0,167	0,168	0,167	0,164	0,163
25	<i>Anacroneuria tupi</i> LM22	0,177	0,183	0,178	0,179	0,179	0,171	0,181	0,184	0,168	0,163	0,167	0,166	0,167	0,165	0,164	0,167
26	<i>Anacroneuria tupi</i> LM23	0,171	0,179	0,172	0,173	0,172	0,169	0,175	0,181	0,166	0,161	0,162	0,164	0,165	0,162	0,162	0,169
27	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM07	0,195	0,196	0,196	0,194	0,194	0,180	0,191	0,194	0,173	0,169	0,174	0,176	0,176	0,176	0,173	0,167
28	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM08	0,196	0,199	0,197	0,198	0,198	0,181	0,197	0,200	0,175	0,170	0,174	0,176	0,177	0,176	0,174	0,161
29	<i>Anacroneuria debilis</i> ENT156	0,203	0,206	0,203	0,203	0,202	0,206	0,204	0,206	0,201	0,198	0,198	0,196	0,204	0,191	0,195	0,199
30	<i>Anacroneuria debilis</i> LP14	0,192	0,194	0,192	0,190	0,192	0,175	0,190	0,192	0,180	0,172	0,180	0,173	0,173	0,178	0,175	0,195
31	<i>Anacroneuria debilis</i> LM18	0,190	0,194	0,190	0,188	0,189	0,169	0,189	0,191	0,175	0,168	0,174	0,170	0,172	0,166	0,169	0,185
32	<i>Anacroneuria debilis</i> LM19	0,193	0,197	0,193	0,191	0,192	0,176	0,192	0,195	0,177	0,171	0,177	0,172	0,174	0,169	0,169	0,185
33	<i>Anacroneuria debilis</i> LM20	0,190	0,194	0,190	0,188	0,189	0,169	0,189	0,191	0,175	0,168	0,174	0,170	0,172	0,166	0,167	0,183
34	<i>Anacroneuria debilis</i> LM36	0,193	0,197	0,193	0,191	0,193	0,176	0,192	0,195	0,178	0,170	0,177	0,170	0,172	0,175	0,172	0,175

TABLE 3. Continued.

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
	PPI	LM	LM	LM	LP	LP	LP	LM	LM	PPI	LM	LM	LM	LP	LM	PPI	
	15	24	25	26	10	11	15	21	22	23	07	25	26	10	18	19	
1	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477a																
2	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477b																
3	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478a																
4	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478b																
5	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE479a																
6	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE481a																
7	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE482																
8	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE487a																
9	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI8																
10	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI9																
11	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI14																
12	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP06																
13	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP12																
14	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM16																
15	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM17																
16	<i>Anacroneuria polita</i> LM12																
17	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> PPI15																
18	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> LM24	0,004															
19	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> LM25	0,004	0,000														
20	<i>Anacroneuria itajaimirim</i> LM26	0,011	0,005	0,005													
21	<i>Anacroneuria</i> sp. LP10	0,160	0,149	0,155	0,153												
22	<i>Anacroneuria</i> sp. LP11	0,163	0,152	0,158	0,156	0,002											
23	<i>Anacroneuria</i> sp. LP15	0,163	0,152	0,158	0,156	0,002	0,000										
24	<i>Anacroneuria tupi</i> LM21	0,155	0,151	0,152	0,150	0,007	0,005	0,005									
25	<i>Anacroneuria tupi</i> LM22	0,157	0,150	0,152	0,150	0,007	0,005	0,005	0,007								
26	<i>Anacroneuria tupi</i> LM23	0,157	0,153	0,152	0,150	0,005	0,004	0,004	0,008	0,005							
27	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM07	0,146	0,145	0,147	0,152	0,190	0,190	0,191	0,194	0,192	0,192						
28	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM08	0,147	0,143	0,145	0,152	0,180	0,180	0,181	0,185	0,183	0,183	0,006					
29	<i>Anacroneuria debilis</i> ENT156	0,166	0,167	0,161	0,164	0,225	0,222	0,223	0,210	0,209	0,213	0,179	0,182				
30	<i>Anacroneuria debilis</i> LP14	0,188	0,177	0,179	0,179	0,176	0,174	0,177	0,167	0,169	0,171	0,184	0,176	0,139			
31	<i>Anacroneuria debilis</i> LM18	0,179	0,170	0,174	0,174	0,174	0,172	0,176	0,164	0,163	0,170	0,185	0,179	0,129	0,002		
32	<i>Anacroneuria debilis</i> LM19	0,181	0,170	0,176	0,176	0,176	0,175	0,179	0,166	0,165	0,172	0,187	0,181	0,131	0,004	0,002	
33	<i>Anacroneuria debilis</i> LM20	0,179	0,168	0,174	0,174	0,174	0,172	0,176	0,164	0,163	0,170	0,185	0,179	0,129	0,002	0,000	0,002
34	<i>Anacroneuria debilis</i> LM36	0,183	0,170	0,174	0,172	0,157	0,155	0,158	0,146	0,148	0,152	0,189	0,180	0,149	0,015	0,016	0,018

TABLE 3. Continued.

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	LM	LM	LP	LP	LM	LM	ENT	PPI	PPI	LP	LL	LL	LL	LL	LM	LM
	20	36	08	09	13	14	416	10	11	05	04	05	13	16	34	35
1	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477a															
2	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477b															
3	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478a															
4	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478b															
5	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE479a															
6	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE481a															
7	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE482															
8	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE487a															
9	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI8															
10	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI9															
11	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI14															
12	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP06															
13	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP12															
14	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM16															
15	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM17															
16	<i>Anacroneuria polita</i> LM12															
17	<i>Anacroneuria itajimirim</i> PPI15															
18	<i>Anacroneuria itajimirim</i> LM24															
19	<i>Anacroneuria itajimirim</i> LM25															
20	<i>Anacroneuria itajimirim</i> LM26															
21	<i>Anacroneuria</i> sp. LP10															
22	<i>Anacroneuria</i> sp. LP11															
23	<i>Anacroneuria</i> sp. LP15															
24	<i>Anacroneuria tupi</i> LM21															
25	<i>Anacroneuria tupi</i> LM22															
26	<i>Anacroneuria tupi</i> LM23															
27	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM07															
28	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM08															
29	<i>Anacroneuria debilis</i> ENT156															
30	<i>Anacroneuria debilis</i> LP14															
31	<i>Anacroneuria debilis</i> LM18															
32	<i>Anacroneuria debilis</i> LM19															
33	<i>Anacroneuria debilis</i> LM20															
34	<i>Anacroneuria debilis</i> LM36															
		0,016														

TABLE 3. Continued.

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
	ENT	ENT	PPI	PPI	PPI	LP	LP	LP	LP	LP	LM	LM	LM	LM	LM
	183	136	4	12	13	01	02	03	04	07	29	30	31	33	39
1	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477a														
2	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE477b														
3	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478a														
4	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE478b														
5	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE479a														
6	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE481a														
7	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE482														
8	<i>Anacroneuria flintorum</i> PLE487a														
9	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI8														
10	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI9														
11	<i>Anacroneuria flintorum</i> PPI14														
12	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP06														
13	<i>Anacroneuria flintorum</i> LP12														
14	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM16														
15	<i>Anacroneuria flintorum</i> LM17														
16	<i>Anacroneuria polita</i> LM12														
17	<i>Anacroneuria itajimirim</i> PPI15														
18	<i>Anacroneuria itajimirim</i> LM24														
19	<i>Anacroneuria itajimirim</i> LM25														
20	<i>Anacroneuria itajimirim</i> LM26														
21	<i>Anacroneuria</i> sp. LP10														
22	<i>Anacroneuria</i> sp. LP11														
23	<i>Anacroneuria</i> sp. LP15														
24	<i>Anacroneuria tupi</i> LM21														
25	<i>Anacroneuria tupi</i> LM22														
26	<i>Anacroneuria tupi</i> LM23														
27	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM07														
28	<i>Anacroneuria subcostalis</i> LM08														
29	<i>Anacroneuria debilis</i> ENT156														
30	<i>Anacroneuria debilis</i> LP14														
31	<i>Anacroneuria debilis</i> LM18														
32	<i>Anacroneuria debilis</i> LM19														
33	<i>Anacroneuria debilis</i> LM20														
34	<i>Anacroneuria debilis</i> LM36														

TABLE 3. Continued.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
		PLE	PLE	PLE	PLE	PLE	PLE	PLE	PLE	PPI	PPI	PPI	LP	LP	LM	LM	LM
		477a	477b	478a	478b	479a	481a	482	487a	8	9	14	06	12	16	17	12
35	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LP08	0,233	0,233	0,233	0,234	0,233	0,240	0,237	0,234	0,240	0,236	0,239	0,243	0,245	0,243	0,238	0,241
36	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LP09	0,236	0,237	0,237	0,237	0,237	0,241	0,240	0,238	0,242	0,238	0,240	0,245	0,248	0,244	0,240	0,245
37	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LM13	0,230	0,230	0,230	0,231	0,230	0,228	0,231	0,231	0,226	0,224	0,227	0,232	0,234	0,232	0,226	0,222
38	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LM14	0,229	0,231	0,230	0,230	0,230	0,231	0,233	0,232	0,228	0,227	0,228	0,234	0,237	0,234	0,228	0,224
39	<i>Kempnyia colossica</i> ENT416	0,242	0,244	0,242	0,242	0,241	0,244	0,244	0,244	0,234	0,232	0,230	0,230	0,230	0,224	0,222	0,210
40	<i>Kempnyia colossica</i> PPI10	0,291	0,294	0,292	0,293	0,292	0,275	0,292	0,294	0,253	0,253	0,255	0,259	0,262	0,255	0,255	0,228
41	<i>Kempnyia colossica</i> PPI11	0,269	0,271	0,269	0,270	0,269	0,259	0,269	0,271	0,238	0,238	0,238	0,242	0,245	0,238	0,238	0,216
42	<i>Kempnyia colossica</i> LP05	0,294	0,297	0,295	0,295	0,295	0,276	0,294	0,298	0,252	0,251	0,252	0,257	0,261	0,252	0,252	0,229
43	<i>Kempnyia colossica</i> LL04	0,244	0,247	0,244	0,242	0,243	0,232	0,242	0,244	0,223	0,225	0,221	0,221	0,226	0,219	0,216	0,226
44	<i>Kempnyia colossica</i> LL05	0,250	0,254	0,251	0,248	0,250	0,237	0,249	0,251	0,228	0,229	0,226	0,236	0,231	0,233	0,218	0,231
45	<i>Kempnyia colossica</i> LL13	0,283	0,287	0,284	0,284	0,284	0,268	0,284	0,287	0,259	0,257	0,258	0,261	0,265	0,263	0,258	0,234
46	<i>Kempnyia colossica</i> LL16	0,267	0,274	0,268	0,269	0,270	0,256	0,272	0,275	0,248	0,247	0,244	0,250	0,256	0,248	0,243	0,223
47	<i>Kempnyia flava</i> LM34	0,278	0,283	0,279	0,276	0,278	0,263	0,280	0,280	0,251	0,255	0,247	0,252	0,256	0,253	0,248	0,267
48	<i>Kempnyia flava</i> LM35	0,279	0,284	0,280	0,277	0,279	0,265	0,282	0,281	0,253	0,257	0,248	0,252	0,257	0,252	0,241	0,260
49	<i>Kempnyia petersorum</i> ENT183	0,299	0,299	0,299	0,299	0,298	0,299	0,298	0,299	0,276	0,286	0,278	0,283	0,284	0,284	0,281	0,281
50	<i>Kempnyia petersorum</i> ENT136	0,302	0,302	0,302	0,302	0,301	0,302	0,301	0,302	0,279	0,289	0,281	0,285	0,287	0,287	0,284	0,284
51	<i>Kempnyia neotropica</i> PPI4	0,284	0,286	0,285	0,285	0,285	0,259	0,284	0,287	0,236	0,246	0,236	0,243	0,246	0,246	0,241	0,237
52	<i>Kempnyia neotropica</i> PPI12	0,300	0,303	0,301	0,301	0,301	0,271	0,300	0,303	0,250	0,260	0,248	0,256	0,258	0,258	0,253	0,246
53	<i>Kempnyia neotropica</i> PPI13	0,298	0,301	0,299	0,299	0,299	0,267	0,298	0,301	0,243	0,254	0,244	0,250	0,253	0,254	0,248	0,249
54	<i>Kempnyia neotropica</i> LP01	0,282	0,285	0,283	0,283	0,283	0,256	0,282	0,285	0,232	0,243	0,233	0,237	0,240	0,243	0,237	0,233
55	<i>Kempnyia neotropica</i> LP02	0,291	0,294	0,292	0,292	0,292	0,269	0,291	0,294	0,247	0,258	0,248	0,253	0,255	0,258	0,253	0,242
56	<i>Kempnyia neotropica</i> LP03	0,280	0,282	0,281	0,281	0,281	0,256	0,281	0,283	0,234	0,245	0,235	0,239	0,242	0,245	0,239	0,235
57	<i>Kempnyia neotropica</i> LP04	0,283	0,286	0,284	0,284	0,284	0,252	0,284	0,286	0,229	0,239	0,229	0,236	0,238	0,239	0,234	0,232
58	<i>Kempnyia neotropica</i> LP07	0,294	0,296	0,294	0,295	0,294	0,269	0,294	0,296	0,248	0,258	0,248	0,253	0,256	0,258	0,253	0,243
59	<i>Kempnyia neotropica</i> LM29	0,289	0,292	0,290	0,290	0,290	0,255	0,290	0,292	0,237	0,247	0,236	0,245	0,247	0,241	0,241	0,238
60	<i>Kempnyia petersorum</i> LM30	0,258	0,263	0,259	0,259	0,258	0,241	0,257	0,263	0,223	0,235	0,223	0,238	0,234	0,239	0,235	0,239
61	<i>Kempnyia petersorum</i> LM31	0,289	0,291	0,289	0,290	0,289	0,258	0,289	0,291	0,237	0,247	0,235	0,244	0,247	0,241	0,240	0,243
62	<i>Kempnyia petersorum</i> LM33	0,288	0,290	0,289	0,289	0,289	0,251	0,289	0,291	0,232	0,243	0,231	0,240	0,243	0,237	0,236	0,239
63	<i>Kempnyia neotropica</i> LM39	0,293	0,296	0,294	0,294	0,294	0,258	0,294	0,296	0,245	0,253	0,244	0,251	0,253	0,250	0,247	0,248

TABLE 3. Continued.

		17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
		PPI	LM	LM	LM	LP	LP	LP	LM	LM	PPI	LM	LM	LM	LP	LM	PPI
		15	24	25	26	10	11	15	21	22	23	07	25	26	10	18	19
35	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LP08	0,243	0,228	0,226	0,232	0,274	0,268	0,272	0,269	0,269	0,269	0,245	0,240	0,277	0,265	0,268	0,271
36	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LP09	0,245	0,230	0,229	0,234	0,277	0,271	0,275	0,272	0,272	0,272	0,242	0,237	0,280	0,268	0,269	0,272
37	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LM13	0,227	0,218	0,217	0,222	0,256	0,254	0,259	0,254	0,250	0,253	0,243	0,230	0,271	0,254	0,255	0,258
38	<i>Macrogynoplax veneranda</i> LM14	0,228	0,218	0,217	0,222	0,263	0,261	0,263	0,261	0,258	0,260	0,240	0,227	0,267	0,249	0,251	0,254
39	<i>Kempnyia colossica</i> ENT416	0,236	0,218	0,224	0,217	0,251	0,252	0,253	0,257	0,243	0,247	0,282	0,285	0,267	0,282	0,278	0,278
40	<i>Kempnyia colossica</i> PPI10	0,250	0,241	0,246	0,251	0,268	0,264	0,267	0,257	0,271	0,268	0,251	0,240	0,258	0,235	0,240	0,240
41	<i>Kempnyia colossica</i> PPI11	0,236	0,226	0,230	0,236	0,253	0,249	0,251	0,242	0,256	0,253	0,240	0,232	0,238	0,220	0,227	0,227
42	<i>Kempnyia colossica</i> LP05	0,255	0,249	0,253	0,258	0,268	0,266	0,269	0,259	0,270	0,268	0,255	0,244	0,261	0,237	0,240	0,240
43	<i>Kempnyia colossica</i> LL04	0,220	0,214	0,214	0,214	0,239	0,235	0,238	0,234	0,241	0,236	0,251	0,246	0,253	0,193	0,191	0,191
44	<i>Kempnyia colossica</i> LL05	0,227	0,220	0,219	0,219	0,249	0,243	0,245	0,246	0,254	0,249	0,257	0,254	0,267	0,205	0,202	0,201
45	<i>Kempnyia colossica</i> LL13	0,269	0,257	0,261	0,264	0,263	0,259	0,262	0,259	0,264	0,262	0,267	0,255	0,283	0,245	0,251	0,251
46	<i>Kempnyia colossica</i> LL16	0,255	0,245	0,250	0,253	0,254	0,250	0,253	0,247	0,253	0,250	0,257	0,247	0,267	0,236	0,237	0,237
47	<i>Kempnyia flava</i> LM34	0,251	0,247	0,245	0,248	0,260	0,261	0,261	0,253	0,256	0,259	0,250	0,260	0,257	0,236	0,232	0,234
48	<i>Kempnyia flava</i> LM35	0,253	0,240	0,244	0,247	0,261	0,260	0,260	0,252	0,257	0,260	0,249	0,259	0,258	0,235	0,225	0,227
49	<i>Kempnyia petersorum</i> ENT183	0,277	0,266	0,263	0,267	0,266	0,266	0,267	0,258	0,250	0,260	0,298	0,298	0,294	0,268	0,264	0,267
50	<i>Kempnyia petersorum</i> ENT136	0,279	0,268	0,266	0,270	0,269	0,269	0,270	0,260	0,253	0,263	0,294	0,294	0,297	0,271	0,267	0,270
51	<i>Kempnyia neotropica</i> PPI4	0,229	0,222	0,218	0,223	0,234	0,234	0,234	0,230	0,231	0,234	0,251	0,254	0,280	0,226	0,222	0,224
52	<i>Kempnyia neotropica</i> PPI12	0,241	0,235	0,231	0,236	0,246	0,247	0,247	0,243	0,244	0,246	0,262	0,264	0,288	0,234	0,228	0,231
53	<i>Kempnyia neotropica</i> PPI13	0,241	0,234	0,230	0,235	0,243	0,244	0,244	0,240	0,241	0,243	0,262	0,264	0,294	0,238	0,234	0,236
54	<i>Kempnyia neotropica</i> LP01	0,231	0,221	0,217	0,222	0,238	0,239	0,239	0,232	0,235	0,238	0,248	0,251	0,278	0,225	0,223	0,225
55	<i>Kempnyia neotropica</i> LP02	0,243	0,239	0,235	0,240	0,248	0,249	0,249	0,245	0,245	0,248	0,270	0,266	0,291	0,232	0,232	0,235
56	<i>Kempnyia neotropica</i> LP03	0,229	0,228	0,224	0,229	0,240	0,241	0,241	0,237	0,237	0,240	0,258	0,256	0,287	0,229	0,229	0,232
57	<i>Kempnyia neotropica</i> LP04	0,227	0,219	0,215	0,221	0,237	0,237	0,238	0,231	0,234	0,237	0,247	0,249	0,279	0,224	0,219	0,222
58	<i>Kempnyia neotropica</i> LP07	0,241	0,232	0,228	0,233	0,239	0,239	0,239	0,235	0,236	0,239	0,263	0,265	0,294	0,239	0,236	0,238
59	<i>Kempnyia neotropica</i> LM29	0,230	0,226	0,222	0,227	0,238	0,238	0,238	0,232	0,235	0,238	0,254	0,256	0,281	0,228	0,215	0,221
60	<i>Kempnyia petersorum</i> LM30	0,232	0,229	0,223	0,226	0,248	0,249	0,250	0,248	0,247	0,252	0,262	0,265	0,302	0,223	0,219	0,219
61	<i>Kempnyia petersorum</i> LM31	0,233	0,228	0,224	0,230	0,238	0,238	0,238	0,234	0,235	0,238	0,259	0,261	0,288	0,232	0,220	0,224
62	<i>Kempnyia petersorum</i> LM33	0,241	0,237	0,233	0,239	0,246	0,247	0,247	0,243	0,244	0,246	0,260	0,263	0,299	0,238	0,225	0,229
63	<i>Kempnyia neotropica</i> LM39	0,235	0,232	0,228	0,233	0,244	0,244	0,245	0,240	0,241	0,244	0,259	0,262	0,292	0,236	0,228	0,230

TABLE 3. Continued.

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	LM	LM	LP	LP	LM	LM	ENT	PPI	PPI	LP	LL	LL	LL	LL	LM	LM
	20	36	08	09	13	14	416	10	11	05	04	05	13	16	34	35
35 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LP08	0,268	0,269														
36 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LP09	0,269	0,272	0,002													
37 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LM13	0,255	0,254	0,000	0,002												
38 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LM14	0,251	0,251	0,000	0,002	0,000											
39 <i>Kempnyia colossica</i> ENT416	0,278	0,284	0,218	0,214	0,207	0,210										
40 <i>Kempnyia colossica</i> PPI10	0,240	0,232	0,220	0,224	0,207	0,205	0,170									
41 <i>Kempnyia colossica</i> PPI11	0,227	0,221	0,206	0,210	0,192	0,192	0,151	0,000								
42 <i>Kempnyia colossica</i> LP05	0,240	0,234	0,225	0,228	0,212	0,208	0,171	0,000	0,000							
43 <i>Kempnyia colossica</i> LL04	0,191	0,194	0,206	0,208	0,195	0,195	0,165	0,137	0,118	0,136						
44 <i>Kempnyia colossica</i> LL05	0,201	0,206	0,207	0,208	0,193	0,193	0,183	0,148	0,129	0,147	0,014					
45 <i>Kempnyia colossica</i> LL13	0,251	0,242	0,204	0,207	0,196	0,191	0,166	0,055	0,046	0,055	0,136	0,145				
46 <i>Kempnyia colossica</i> LL16	0,237	0,232	0,200	0,201	0,190	0,186	0,155	0,049	0,038	0,049	0,125	0,133	0,007			
47 <i>Kempnyia flava</i> LM34	0,232	0,238	0,229	0,227	0,221	0,218	0,190	0,178	0,168	0,185	0,182	0,191	0,176	0,168		
48 <i>Kempnyia flava</i> LM35	0,225	0,237	0,227	0,226	0,220	0,217	0,191	0,182	0,171	0,187	0,178	0,181	0,180	0,168	0,000	
49 <i>Kempnyia petersorum</i> ENT183	0,264	0,266	0,256	0,260	0,246	0,239	0,238	0,239	0,225	0,239	0,209	0,217	0,231	0,220	0,197	0,198
50 <i>Kempnyia petersorum</i> ENT136	0,267	0,269	0,259	0,255	0,249	0,242	0,234	0,242	0,228	0,241	0,212	0,219	0,234	0,223	0,193	0,195
51 <i>Kempnyia neotropica</i> PPI4	0,222	0,220	0,212	0,213	0,200	0,201	0,214	0,200	0,194	0,200	0,169	0,174	0,210	0,199	0,156	0,161
52 <i>Kempnyia neotropica</i> PPI12	0,228	0,231	0,222	0,223	0,211	0,212	0,234	0,216	0,205	0,213	0,180	0,184	0,221	0,210	0,169	0,172
53 <i>Kempnyia neotropica</i> PPI13	0,234	0,235	0,219	0,220	0,208	0,209	0,229	0,211	0,201	0,210	0,179	0,184	0,220	0,209	0,171	0,175
54 <i>Kempnyia neotropica</i> LP01	0,223	0,222	0,211	0,214	0,201	0,200	0,219	0,191	0,184	0,191	0,167	0,172	0,203	0,195	0,155	0,159
55 <i>Kempnyia neotropica</i> LP02	0,232	0,229	0,223	0,226	0,215	0,215	0,232	0,214	0,201	0,215	0,176	0,178	0,215	0,206	0,173	0,174
56 <i>Kempnyia neotropica</i> LP03	0,229	0,223	0,210	0,212	0,204	0,201	0,219	0,198	0,188	0,199	0,163	0,166	0,202	0,193	0,160	0,162
57 <i>Kempnyia neotropica</i> LP04	0,219	0,221	0,207	0,209	0,200	0,196	0,220	0,190	0,184	0,190	0,164	0,169	0,202	0,192	0,151	0,156
58 <i>Kempnyia neotropica</i> LP07	0,236	0,233	0,219	0,222	0,208	0,209	0,225	0,208	0,196	0,208	0,173	0,178	0,214	0,206	0,164	0,167
59 <i>Kempnyia neotropica</i> LM29	0,215	0,224	0,216	0,217	0,206	0,205	0,222	0,203	0,193	0,201	0,167	0,172	0,211	0,199	0,157	0,158
60 <i>Kempnyia petersorum</i> LM30	0,219	0,218	0,215	0,216	0,199	0,199	0,226	0,193	0,183	0,190	0,184	0,190	0,204	0,191	0,163	0,168
61 <i>Kempnyia petersorum</i> LM31	0,220	0,229	0,220	0,222	0,209	0,210	0,230	0,211	0,199	0,209	0,168	0,173	0,216	0,204	0,167	0,167
62 <i>Kempnyia petersorum</i> LM33	0,225	0,235	0,221	0,222	0,212	0,210	0,234	0,208	0,198	0,206	0,176	0,180	0,211	0,201	0,159	0,159
63 <i>Kempnyia neotropica</i> LM39	0,228	0,233	0,219	0,220	0,208	0,209	0,230	0,214	0,202	0,212	0,172	0,177	0,219	0,207	0,168	0,170

TABLE 3. Continued.

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
	ENT	ENT	PPI	PPI	PPI	LP	LP	LP	LP	LP	LM	LM	LM	LM	LM
	183	136	4	12	13	01	02	03	04	07	29	30	31	33	39
35 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LP08															
36 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LP09															
37 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LM13															
38 <i>Macrogynoplax veneranda</i> LM14															
39 <i>Kempnyia colossica</i> ENT416															
40 <i>Kempnyia colossica</i> PPI10															
41 <i>Kempnyia colossica</i> PPI11															
42 <i>Kempnyia colossica</i> LP05															
43 <i>Kempnyia colossica</i> LL04															
44 <i>Kempnyia colossica</i> LL05															
45 <i>Kempnyia colossica</i> LL13															
46 <i>Kempnyia colossica</i> LL16															
47 <i>Kempnyia flava</i> LM34															
48 <i>Kempnyia flava</i> LM35															
49 <i>Kempnyia petersorum</i> ENT183															
50 <i>Kempnyia petersorum</i> ENT136	0,002														
51 <i>Kempnyia neotropica</i> PPI4	0,018	0,020													
52 <i>Kempnyia neotropica</i> PPI12	0,030	0,033	0,000												
53 <i>Kempnyia neotropica</i> PPI13	0,030	0,033	0,000	0,000											
54 <i>Kempnyia neotropica</i> LP01	0,015	0,018	0,000	0,002	0,004										
55 <i>Kempnyia neotropica</i> LP02	0,025	0,028	0,000	0,004	0,000	0,000									
56 <i>Kempnyia neotropica</i> LP03	0,015	0,017	0,000	0,004	0,007	0,000	0,002								
57 <i>Kempnyia neotropica</i> LP04	0,015	0,018	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000							
58 <i>Kempnyia neotropica</i> LP07	0,023	0,025	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000						
59 <i>Kempnyia neotropica</i> LM29	0,020	0,023	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
60 <i>Kempnyia petersorum</i> LM30	0,040	0,042	0,008	0,021	0,020	0,004	0,014	0,006	0,004	0,014	0,008				
61 <i>Kempnyia petersorum</i> LM31	0,020	0,023	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,010			
62 <i>Kempnyia petersorum</i> LM33	0,026	0,028	0,006	0,007	0,011	0,006	0,008	0,006	0,006	0,007	0,005	0,008	0,005		
63 <i>Kempnyia neotropica</i> LM39	0,025	0,028	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,007	

Acknowledgments

Lucas Henrique de Almeida thanks to Research Foundation of São Paulo State (FAPESP) grant (process 2015/22008-9). PCB thanks to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, number 305275/2014–3) for research fellowship. The authors thank to FAPESP (number 12/21196–8) for the financial support; and to Gustavo Alberto de Almeida, Lucas Bassi Costa and driver Luis Francisco Sanches de Oliveira for support during fieldwork in PECB, PEI and PETAR. The authors also thank Claudio Gilberto Froehlich, Henrique Paprocki, Adriano Sanches Melo and Lucas Silveira Lecci for collected specimens.

References

- Almeida, L.H. & Duarte T. (2017) A new species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the Ecological Station, Wenceslau Guimarães, State of Bahia, Brazil. *Zootaxa*, 4247 (4), 480–486.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4247.4.9>
- Almeida, L.H., Gonçalves, M.C., Novaes, M.C., Paresqui, R.C. & Bispo, P.C. (2018) *Anacroneuria flintorum* Froehlich 2002: notes, distribution, and life stages association using molecular tools. *Zootaxa*, 4370 (4): 409–420.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4370.4.6>
- Avelino-Capistrano, F., Barbosa, L.S. & Almeida, G.L. (2011a) The nymph of *Anacroneuria debilis* (Pictet, 1841) (Plecoptera: Perlidae). *Zootaxa*, 2882, 59–63.

- Avelino-Capistrano, F., De-Souza, M.R. & Nessimian, J.L. (2013) *Kempnyia puri*, a new species of Perlidae (Plecoptera) from Rio de Janeiro, Brazil. *Zootaxa*, 3619 (5), 554–556.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3619.5.4>
- Avelino-Capistrano, F., Nessimian, J.L., Santos-Mallet, J.R., & Maeda Takiya, D. (2014) DNA-based identification and descriptions of immatures of *Kempnyia* Klapálek (Insecta: Plecoptera) from Macaé River Basin, Rio de Janeiro State, Brazil. *Freshwater Science*, 33 (1), 325–337.
<http://dx.doi.org/10.1086/675226>
- Avelino-Capistrano, F., Barbosa, L.S. & Maeda Takiya, D. (2016) Description of a new *Kempnyia* Klapálek from Brazil (Plecoptera: Perlidae) with life stages associated using DNA barcodes. *Zootaxa*, 4079 (3), 372–380.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4079.3.5>
- Baldin, C., Bispo, P.C. & Novaes M.C. (2013) New species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Rio de Janeiro State, Brazil. *Zootaxa*, 3694 (4), 391–397.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3694.4.7>
- Bispo, P.C. & Froehlich, C.G. (2004) Perlidae (Plecoptera) from Intervales State Park, São Paulo State, Southeastern Brazil, with descriptions of new species. *Aquatic Insects*, 26 (2), 97–113.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650420412331325837>
- Bispo, P.C. & Froehlich, C.G. (2008) Description of the larva and redescription of the adult of *Kempnyia neotropica* Jacobsen and Bianchi (Plecoptera: Perlidae) with biological notes. *Aquatic Insects*, 30, 61–67.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650420701829641>

- Bispo, P.C. & Lecci, L.S. (2011) Gripopterygidae (Plecoptera) from Paranapiacaba mountains, southeastern Brazil. *Annals of Limnology*, 47, 373–385.
- Bispo, P.C., Cardoso-Leite, R. & Lecci, L.S. (2013) Description of the larva of *Kempnyia colossica* (Navás) (Plecoptera: Perlidae) with biological notes. *Aquatic Insects*, 34 (3–4), 217–221.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650424.2013.800559>
- Bispo, P.C., Costa, L.S.M. & Novaes, M.C. (2014) Two new species and a new record of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Central Brazil. *Zootaxa*, 3779 (5), 591–596.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3779.5.9>
- Boumans, L. & R. W. Baumann (2012) *Amphinemura palmeni* is a valid Holarctic stonefly species (Plecoptera: Nemouridae). *Zootaxa*, 3537, 59–75.
- Burmeister, H. (1839) Handbuch der Entomologie, Plecoptera. 2 (2), 863–881. Theod. Chr. Friedr. Endlin, Berlin.
- Calor, A.R. & Mariano, R. (2012) UV Light Pan Traps for Collecting Aquatic Insects. *EntomoBrasilis*, 5 (2), 164–166.
<http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v5i2.187>
- De Ribeiro, V.R. & Froehlich C.G. (2007) Two new species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from southern Brazil. *Zootaxa* 1624, 53–57.
- Duarte, T. & Lecci, L.S. (2016) New species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the northeastern semi-arid region of Brazil. *Zootaxa*, 4079 (2), 291–300.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4079.2.10>

- Duarte, T., Lecci, L.S. & Calor, A.R. (2014a) Stoneflies (Insecta: Plecoptera) from Serra Bonita, Bahia, Brazil: New species and updated records. *Zootaxa*, 3779 (1), 081–092.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3779.1.9>
- Enderlein, G. (1909) Klassifikation der Plecopteren, sowie Diagnosen neuer Gattungen und Arten. *Zoologischer Anzeiger*, 34, 385–419.
- Fochetti, R., Sezzi, E., Tierno de Figueroa, J.M., Modica, M.V. & Oliverio, M. (2009) Molecular systematics and biogeography of the western Mediterranean stonefly genus *Tyrrhenoleuctra* (Insecta, Plecoptera). *Zool. Syst. Evol. Res.*, 47 (4), 328–336.
- Fochetti, R., Gaetani, B., Fenoglio, S., Bo, T., López-Rodríguez, M. J. & Tierno-de-Figueroa J. M. (2011) Systematics and biogeography of the genus *Besdolus* Ricker, 1952 (Plecoptera, Perlodidae): molecules do not match morphology. *Zootaxa*, 3067, 49–58.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for application of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Froehlich, C.G. (1969) Studies on Brazilian Plecoptera 1. Some Gripopterygidae from the Biological Station at Paranapiacaba, State of São Paulo. *Beiträge zur Neotropischen Fauna*, 6, 17–39.
- Froehlich, C. G. (1981). Plecoptera, p. 86-87. In: S. H. Hubert; G. Rodriguez & N. D. Santos (Edit.). *Aquatic Biota of Tropical South America*. Part. 1. Arthropoda.
- Froehlich. C.G. (1984b) Brazilian Plecoptera 3. *Macrogynoplax veneranda* sp. n. (Perlidae: Acroneuriinae). *Annls. Limnol.*, 20 (1-2), 39–42.

- Froehlich, C.G. (1988) Brazilian Plecoptera 5. Old and new species of *Kempnyia* (Perlidae). *Aquatic insects*, 10 (3), 153–170.
<http://dx.doi.org/10.1080/01650428809361324>
- Froehlich, C. G. (1996) Two new species of *Kempnyia* from southern Brazil (Plecoptera: Perlidae). *Mitteilungen Schweizerische Entomologische Gesellschaft*, 69, 117–120.
- Froehlich, C.G. (2001) *Guaranyperla*, a new genus in the Gripopterygidae (Plecoptera). pp. 377–383. In: DOMINGUEZ, E. (Ed.). *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera*. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Froehlich, C.G. (2002b) *Anacroneuria* mainly from southern Brazil and northeastern Argentina (Plecoptera: Perlidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115, 75–107.
- Froehlich, C.G. (2004) *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the Boracéia Biological Station, São Paulo State, Brazil. *Aquatic Insects*, 26 (1), 53–63.
- Froehlich, C.G. (2010) *Anacroneuria* (Plecoptera, Perlidae) from the Mantiqueira Mountains, São Paulo State, Brazil. *Zootaxa*, 2365, 55–68.
- Froehlich, C.G. (2011a) Checklist dos Plecoptera (Insecta) do Estado de São Paulo. *Biota Neotropica*, 11 (1a), 1–6.
- Froehlich, C.G. (2011b) Notes on *Kempnyia*, with the description of three new species (Plecoptera: Perlidae). *Illiesia*, 7 (13), 133–141.
- Froehlich, C.G. (2011c) *Kempnyia* (Plecoptera) from the Mantiqueira Mountains of Brazil. *Zootaxa*, 2999, 20–32.
- Froehlich, C.G. (2012). Plecoptera. In: Rafael, J.A., Melo, G.A.R., Carvalho, C.J.B., Cesari, S.A. & R. Constantino. (Eds.) *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Editora Holos, 810pp.

- Gonçalves M.C., Novaes, M.C., & Salles, F.F. (2017) New species and records of Perlidae (Plecoptera) from Espírito Santo State, Brazil. *Zootaxa*, 4273 (1), 141–150.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4273.1.11>
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G.A.C. & Baird, D.J. (2011) Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLoS ONE*, 6 (4), e17497.
- Hamada, N., Silva, J.O. & Pedroza, M.K. (2016) A new species of *Enderleina* Jewett (Plecoptera, Perlidae) from Amazonas State, Brazil. *Zootaxa*, 4098 (2), 392–400.
<http://doi.org/10.11646/zootaxa.4098.2.11>
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & Dewaard J.R. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v 270, p 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & Dewaard J.R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, (Suppl.).
- Jacobson, G.G. & Bianchi, V.L. (1905) Orthoptera and Pseudoneuroptera from the Russian Empire and Neighboring Lands [in Russian] 952 pp.
- Jewett, S. (1959) Some stoneflies from Santa Catarina, Brazil (Plecoptera). *The American Midland Naturalist*, 61 (1), 148–161.
- Jewett, S.G. (1960) Notes and descriptions concerning Brazilian Stoneflies. *Arquivos do Museu Nacional*, 50, 167–184.

- Kato, Y., Morii, Y. & Tojo, K. (2013) Molecular phylogeographic analysis of East Asian cryptoperlan stoneflies (Insecta: Plecoptera, Peltoperlidae). *Limnology*, 14 (2), 179–194.
- Klapálek, F. (1909) Vorläufige Bericht über exotische Plecopteren. *Wiener Entomologische Zeitung*, 28, 215–232.
- Klapálek, F. (1914) Analytická tabulka fam Perlidae a její dvou subfam., Perlinae a Acroneuriinae (Plecoptera). *Časopis České Společnosti Entomologické*, 11, 53–69.
- Klapálek, F. (1916) Subfamilia Acroneuriinae Klp. *Časopis České Společnosti Entomologické*, 13, 45–84.
- Klapálek, F. (1921) Plécoptères nouveaux. Troisième partie. *Annales de la Société Entomologique de Belgique*, 61, 320–327.
- McCulloch, G.A., Wallis, G.P., Waters, J.M. (2015) A time-calibrated phylogeny of southern hemisphere stoneflies: Testing for Gondwanan origins, *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Mynott, J.H., Webb, J. M. & Suter, P. J. (2011) Adult and larval associations of the alpine stonefly genus *Riekoperla* McLellan (Plecoptera: Gripopterygidae) using mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics*, 25 (1), 11–21.
<http://dx.doi.org/10.1071/is10025>
- Navás, L. (1934) Familia Pérlidos. Pags. 22–23; 160–163. *In: Insectos suramericanos. Revista de la Real Academia de Ciencias de Madrid*, 31.
- Novaes, M.C. & Bispo, P.C. (2014a) Plecoptera from Minas Gerais State, southeastern Brazil. *Zootaxa*, 3856 (3), 433–442.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3856.3.8>

- Novaes, M.C. & Bispo, P.C. (2014b) A new species and notes on Perlidae (Plecoptera) from Paraná and Santa Catarina States, southern Brazil. *Zootaxa*, 3765 (5), 458–468.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3765.5.4>
- Novaes, M.C. & Bispo, P.C. (2014c) Plecoptera from Minas Gerais State, southeastern Brazil. *Zootaxa*, 3856 (3), 433–442.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3856.3.8>
- Novaes M.C., Bispo P.C. & Gonçalves M.C. (2016) A new species of *Anacroneuria* Klapálek 1909 (Plecoptera: Perlidae) from Espírito Santo State, southeastern Brazil and comments on additional species. *Zootaxa*, 4208 (1), 094–098.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4208.1.7>
- Pictet, F.-J. (1841) *Histoire Naturelle Générale et Particulière des Insectes Névroptères. Famille des Perlides*. J. Kessmann, Genève.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.124172>
- Ribeiro, J.M.F. & I.S. Gorayeb (2015) Description of immatures associated with adults of two species of *Macrogynoplax* Enderlein and one species of *Enderleina* Jewett (Plecoptera: Perlidae) of the Brazilian Amazon. *Zootaxa*, 3957 (1), 069–076.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3948.1.7>
- Righi-Cavallaro, K.O. & Froehlich, C.G. (2013) The Nymph of of *Anacroneuria payagua* Froehlich (Plecoptera: Perlidae) from Brazil. *Zootaxa*, 3635 (5), 579–582.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3635.5.7>

- Stark, B.P. (2001) *A synopsis of Neotropical Perlidae (Plecoptera)*. In: E. Dominguez (Edit.). *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera*. Kluwer Academic Plenum Publisher. N. York. p. 405–422.
- Stark, B.P., Froehlich, C. & Zúñiga, M.C. (2009) *South American Stoneflies (Plecoptera)*. *Aquatic Biodiversity in Latin America*. Pensoft, Sofia & Moscow, v.5., 154p.
- Sweeney, B.W., Battle, J.M. & Jackson, J.K. (2011) Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society*, 30, 195–216.
- 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 (10), 2731–2739.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (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 (22), 4673–4680.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tierno-de-Figueroa, J.M., Gaetani, B., Luzón-Ortega, J. M., López-Rodrigues, M.J. & R. Fochetti (2011) On the identity of *Isoperla curtata* (Plecoptera: Perlodidae): behavioural and molecular approaches show the existence of two separate species. *Zootaxa*, 3000, 49–58.

- Vanzolini, P.E. & Papávero, N. (1967) *Manual de Coleta e Preparação de Animais Terrestres e de Água Doce*. Secretaria de Estado da Agricultura de São Paulo. São Paulo. 223pp.
- Weiss, S., Stradner, D. & Graf, W. (2012) Molecular systematics, evolution and zoogeography of the stonefly genus *Siphonoperla* (Insecta: Plecoptera, Chloroperlidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 50 (1), 19–29.
- Zwick, P. (1972) Die Plecopteren Pictets und Burmeisters, mit Angaben über weitere Arten (Insecta). *Revue Suisse de Zoologie*, 78, 1123–1194.
- Zwick, P. (1973) Die Plecopteren-Arten Enderleins (Insecta): Revision der Typen. *Annales Zoologici Warszawa*, 30, 471–507.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho registrou quatorze espécies de Perlidae para a Serra de Paranapiacaba (PEI, PECB, PETAR), sendo que *Anacroneuria*, *Kempnyia* e *Macrogynoplax* foram representados por nove, quatro e uma espécies respectivamente.

A análise molecular possibilitou que fossem realizadas duas descrições de imaturos (*Anacroneuria flintorum* e *A. tupi*) e uma sinonimização (*Kempnyia petersorum*), além disso duas espécies ainda não conhecidas para a região foram registradas (*Anacroneuria debilis* e *A. fiorentini*). A abordagem integrativa possibilitou também resultados mais refinados para grande parte das espécies estudadas, evidenciando a necessidade de estudos mais robustos para espécies como *Anacroneuria debilis*, *A. polita*, *Kempnyia auberti* e *K. colossica*. Seguindo esta necessidade, é desejável que mais estudos e discussões sobre a separação de espécies e populações sejam realizadas para os Plecopteras, afim de melhorar a compreensão sobre os limites e os caracteres utilizados para definir as espécies. Adicionalmente, foi possível corrigir a ocorrência de *Anacroneuria petersi*, e por consequência traçar o perfil e padrão de teneralidade para muitas das espécies.

Mesmo tratando-se de uma região muito bem estudada (Bispo & Froehlich, 2004), os resultados obtidos demonstraram que a muito a se fazer em relação aos imaturos e que a região pode apresentar novos registros e possivelmente novas espécies, porém, é necessário que os locais de difícil acesso sejam amostrados.

REFERÊNCIAS

AUBERT, J. Plécoptères décrits par le R.P.L. NAVÁS, S.J. 4. **Liste des types actuellement connus**. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, v 29, p 437–445, 1956.

AVELINO-CAPISTRANO, F. **Plecoptera (Insecta) da Estação Biológica de Santa Lúcia, Espírito Santo, Brasil: distribuição espacial, sazonal e preferência por substratos**. 2010. 76p. Dissertação de Mestrado, PPG - Biologia Animal – UFRRJ. 2010.

AVELINO-CAPISTRANO, F.S., BARBOSA, L.S. & ALMEIDA, G.L. **The nymph of *Anacroneuria debilis* (Pictet, 1841) (Plecoptera: Perlidae)**. Zootaxa, v 2882, p 59–63, 2011a.

AVELINO-CAPISTRANO, F.S., BARBOSA, L.S. & ALMEIDA, G.L. **Complementary descriptions of *Kempnyia gracilentata* (Enderlein 1909) and *Kempnyia reticulata* (Klapálek 1916) (Plecoptera: Perlidae)**. Illiesia, v 7, n 14, p 142–147, 2011b.

AVELINO-CAPISTRANO, F., NESSIMIAN, J.L., SANTOS-MALLET, J.R., & MAEDA TAKIYA, D. **DNA-based identification and descriptions of immatures of *Kempnyia* Klapálek (Insecta: Plecoptera) from Macaé River Basin, Rio de Janeiro State, Brazil**. Freshwater Science, v 33, n 1, p 325–337, 2014.

AVELINO-CAPISTRANO, F., BARBOSA, L.S. & MAEDA TAKIYA, D. **Description of a new *Kempnyia* Klapálek from Brazil (Plecoptera: Perlidae) with life stages associated using DNA barcodes**. Zootaxa, v 4079 n 3, p 372–380, 2016.

AVISE, J. C. **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, M.A., 2000.

BALDIN, C., BISPO, P.C. & NOVAES, M.C. **New species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Rio de Janeiro State, Brazil**. Zootaxa, v 3694, n 4, p 391–397, 2013.

BERGSTEN, J., BILTON, D.T., FUJISAWA, T., ELLIOTT, M., MONAGHAN, M.T., BALKE, M., HENDRICH, L., GEIJER, J., HERRMANN, J., FOSTER, G.N., RIBERA, I., NILSSON, A.N., BARRACLOUGH, T.G. & VOGLER A.P. **The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding**. Systematic Biology, v 61, p 851–869, 2012.

BÉTHOUX, O. **Wing venation pattern of Plecoptera (Insecta: Neoptera)**. Illiesia, v 1 n 9, p 52-81, 2005.

BÉTHOUX, O., GU, J.J. & REN, D. **A new Upper Carboniferous stem-orthopteran (Insecta) from Ningxia (China)**. Insect Science, v 19, n 2, p 153–158, 2012.

BISPO, P.C. & FROEHLICH, C.G. **Perlidae (Plecoptera) from Intervales State Park, São Paulo State, Southeastern Brazil, with descriptions of new species**. Aquatic Insects, v 26, n 2, p 97–113, 2004.

BISPO, P.C. & FROEHLICH, C.G. **Stoneflies (Plecoptera) from northern Goiás State, central Brazil: new record of *Kempnyia oliveirai* (Perlidae) and a new species of *Tupiperla* (Gripopterygidae)**. Aquatic Insects, v 29, p 213–217, 2007.

BISPO, P.C. & FROEHLICH, C.G. **Description of the larvae and redescription of the adult of *Kempnyia neotropica* Jacobsen & Bianchi (Plecoptera: Perlidae) with biological notes.** Aquatic Insects, v 30, p 61–67, 2008.

BISPO, P.C. & L.S. LECCI, L.S. ***Gripopterygidae* (Plecoptera) from Paranapiacaba mountains, southeastern Brazil.** Annals of Limnology, v 47, p 373–385, 2011.

BISPO, P.C., NEVES, C.O. & FROEHLICH, C.G. **Two new species of Perlidae (Plecoptera) from Mato Grosso State, western Brazil.** Zootaxa, v 795, p 1–6, 2005.

BISPO, P.C., LEITE, R. & LECCI, L.S. **Description of the larva of *Kempnyia colossica* (Navás) (Plecoptera: Perlidae) with biological notes.** Aquatic Insects, v 35, p 1–5, 2013.

BISPO, P.C., COSTA, L.S.M. & NOVAES, M.C. **Two new species and a new record of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Central Brazil.** Zootaxa, v 3779 n 5, p 591–596, 2014.

BOUMANS, L. & BAUMANN, R.W. ***Amphinemura palmeni* is a valid Holarctic stonefly species (Plecoptera: Nemouridae).** Zootaxa, v 3537, p 59–75, 2012.

BURMEISTER, H. **Handbuch der Entomologie, Plecoptera.** Theod. Chr. Friedr. Endlin, Berlin, v 2, n 2, p 863–881, 1839.

CARVALHO, M.R., BOCKMANN, F.A., AMORIM, D.S., BRANDÃO, C.R.F., DE VIVO, M., FIGUEIREDO, J.L. & NELSON, G.J. **Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the**

cybertaxonomic-automation paradigm. *Evolutionary Biology*, v 34, n 3, p 140–143, 2007.

CBD Guide to the Global Taxonomy Initiative. CBD (Convention on Biological Diversity) Technical Series 30: pp vii + 195. 2008.

CLAASSEN, P. W. **Plecoptera nymphs of America (North Mexico).** *Memoirs of the Cornell University Agricultural Experiment Station* 232. Thomas Say Foundation, Volumes III, VI. 1931.

DE RIBEIRO, V.R. & FROEHLICH C.G. **Two new species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from southern Brazil.** *Zootaxa*, v 1624, p 53–57, 2007.

DORVILLÉ, L.F.M., & FROEHLICH, C.G. ***Kempnyia tijucana* sp. n. from southeastern Brazil (Plecoptera, Perlidae).** *Aquatic Insects*, v 19, n 3, p 177–181, 1997.

DORVILLÉ, L.F.M. & FROEHLICH C.G. **Description of the nymph of *Kempnyia tijucana* Dorvillé & Froehlich (Plecoptera, Perlidae) with notes on its development and biology.** p. 385–392. *In: XIII International Symposium on Ephemeroptera and Plecoptera, 1998, Tafi Del Valle. Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera.* New York: Kluwer Academics/ Plenum Press, 1998.

DORVILLÉ, L.F.M., & FROEHLICH, C.G. **Description of the nymph of *Kempnyia tijucana* Dorvillé & Froehlich (Plecoptera: Perlidae), with notes on its development and biology.** *In: E. Domínguez (ed). Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera.* Kluwer Academic/ Plenum Publisher. N. York. p 385-392, 2001.

DUARTE, T. & LECCI, L.S. **New species and records of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the northeastern semi-arid region of Brazil.** Zootaxa, v 4079, n 2, p 291–300, 2016.

DUARTE, T., LECCI, L.S. & CALOR A.R. **Stoneflies (Insecta: Plecoptera) from Serra Bonita, Bahia, Brazil: New species and updated records.** Zootaxa, v 3779, n 1, p 081–092, 2014a.

DUARTE, T., BISPO, P.C. & CALOR A.R. **A new species of *Tupiperla* Froehlich, 1969 (Plecoptera: Gripopterygidae) from Serra da Jibóia, Bahia, Brazil.** Zootaxa, v 3835, n 1, p 140–144, 2014b.

ENDERLEIN, G. **Klassifikation der Plecopteropteren, sowie Diagnosen neuer Gattungen und Arten.** Zoologischer Anzeiger, v 34, p 385–419, 1909.

FOCHETTI, R. & TIerno-DE-FIGUEROA J.M. **Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta) in freshwater.** Hydrobiologia, v 595, p 365–377, 2008.

FOCHETTI, R., GAETANI, B., FENOGLIO, S., Bo, T., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M. J. & TIerno-DE-FIGUEROA J.M. **Systematics and biogeography of the genus *Besdolus* Ricker, 1952 (Plecoptera, Perlodidae): molecules do not match morphology.** Zootaxa, v 3067, p 49–58, 2011.

FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. **DNA primers for application of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** Molecular Marine Biology and Biotechnology, v 3, p 294–299, 1994.

FRISON, T.H. **The stoneflies, or Plecoptera of Illinois.** Nature History Survey Bulletin, v 20, n4, p 281–471, 1935.

FROEHLICH, C.G. **Studies on Brazilian Plecoptera 1. Some Gripopterygidae from the Biological Station at Paranapiacaba, State of São Paulo.** Beiträge zur Neotropischen Fauna, v 6, p 17–39, 1969.

FROEHLICH, C. G. Plecoptera, p. 86-87. *In*: S. H. Hubert; G. Rodriguez & N. D. Santos (Edit.). **Aquatic Biota of Tropical South America.** Part. 1. Arthropoda. 1981.

FROEHLICH. C.G. **Brazilian Plecoptera 4. Nymphs of Perlidae genera from south-eastern Brazil.** Annls. Limnol., v 20, n 1-2, p 43–48, 1984b.

FROEHLICH, C.G. **Brazilian Plecoptera 5. Old and new species of "*Kempnyia*" (Perlidae).** Aquatic Insects, v 10, n 3, p 153–170, 1988.

FROEHLICH, C.G. **Brazilian Plecoptera 6. *Gripopteryx* from Campos do Jordão, State of São Paulo (Gripopterygidae).** Studies on Neotropical Fauna and Environment, v 25, n 4, p 235–247, 1990.

FROEHLICH, C.G. **Brazilian Plecoptera 7. Old and new species of *Gripopteryx* (Gripopterygidae).** Aquatic Insects, v 15, n 1, p 21–38, 1993.

FROEHLICH, C.G. **Brazilian Plecoptera 8. On *Paragripopteryx* (Gripopterygidae).** Aquatic Insects, v 16, n 4, p 227–239, 1994.

FROEHLICH, C.G. **Two new species of *Kempnyia* from southern Brazil (Plecoptera: Perlidae).** Bulletin de la Société Entomologique Suisse, v 69, p 117–120, 1996.

FROEHLICH, C.G. **Seven new species of *Tupiperla* (Plecoptera: Gripopterygidae) from Brazil, with a revision of the genus.** Studies on Neotropical Fauna and Environment, v 33, p 19–36, 1998.

FROEHLICH, C.G. ***Guaranyperla*, a new genus in the Gripopterygidae (Plecoptera).** p. 377–383. In: DOMINGUEZ, E. (Ed.). Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera. Kluwer Academic/Plenum, New York. 2001.

FROEHLICH, C.G. ***Anacroneuria* mainly from southern Brazil and northeastern Argentina (Plecoptera: Perlidae).** Proceedings of the Biological Society of Washington, v 115, p 75–107, 2002.

FROEHLICH, C.G. **Stoneflies (Plecoptera: Perlidae) from the Brazilian Amazonia with the description of three new species and a key to *Macrogynoplax*.** Studies on Neotropical Fauna and Environment, v 38, p 129–134, 2003.

FROEHLICH, C.G. ***Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the Boracéia Biological Station, São Paulo State, Brazil.** Aquatic Insects, v 26, n 1, p 53–63, 2004.

FROEHLICH, C.G. **Three new species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from the State of Mato Grosso do Sul, Brazil.** Zootaxa, v 1461, p 15–24, 2007.

FROEHLICH, C.G. ***Anacroneuria* (Plecoptera, Perlidae) from the Mantiqueira Mountains, São Paulo State, Brazil.** Zootaxa, v 2365, p 55–68, 2010.

FROEHLICH, C.G. ***Kempnyia* (Plecoptera) from the Mantiqueira Mountains of Brazil.** Zootaxa, v 2999, p 20–32, 2011a.

FROEHLICH, C.G. ***Kempnyia* (Plecoptera) from the Mantiqueira Mountains of Brazil**. Zootaxa, v 2999, p 20–32, 2011c.

FROEHLICH, C.G. Plecoptera. *In*: Rafael, J.A., Melo, G.A.R., Carvalho, C.J.B., Cesari, S.A. & R. Constantino. (Eds.) **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Editora Holos, 810pp. 2012.

GODFRAY, H.C.J. **Challenges for taxonomy**. Nature, v 417, n 6884, p 17–19, 2002.

GOLDSTEIN P.Z. & DESALLE R. **Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description**. BioEssays, v 33, p 135–147, 2010.

GRAF, W., STRANDNER, D. & WEISS S. **A new *Siphonoperla* species from the Eastern Alps (Plecoptera: Chloroperlidae), with comments on the genus**. Zootaxa, v 1891, p 31–38, 2008.

HAJIBABAEI, M., SHOKRALLA, S., ZHOU, X., SINGER, G.A.C. & BAIRD D.J. **Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos**. PLoS ONE, v 6 n 4, p e1749, 2011.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proc. R. Soc. Lond. B., v 270, p 313–321, 2003a.

HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & DEWAARD J.R. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.**

Proc. R. Soc. Lond. *B.*, (Suppl.). 2003b.

HEBERT, P.D.N., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D.H. & HALLWACHS W. **Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*.**

Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, v 101, n 41, p 14812–14817, 2004a.

HILLIS, D.M., MORITZ, C. & MABLE B.K. ***Molecular Systematics***. 2^a Edition.

Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 1996.

HYNES, H. B. N. **The nymph of *Anacroneuria aroucana* Kimmins (Plecoptera, Perlidae).** Proc. R. em. Soc. Lond, v 23, p 105–110, 1948.

HYNES, H.B.N. **Biology of Plecoptera.** Annual Review of Entomology, v 21, p 135–153, 1976.

ILLIES, J. **Abranchioperlidae, eine neue Plecopterenfamilie.** Investigaciones Zoológicas Chilenas, v 4, p 223–230, 1958.

ILLIES, J. **Revision der südamerikanischen Gripopterygidae (Plecoptera).** Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, v 36, p 145–248, 1963.

ILLIES, J. **Die Plecopteren-Unterfamilie Andiperlinae. (Auflösung einer unnatürlichen Negativgruppe nach Remane).** Zoologischer Anzeiger, v 172, n 1, p 37–48, 1964a.

ILLIES, J. **Südamerikanische Perlidae (Plecoptera), besonders aus Chile und Argentinien.** Beiträge zur Neotropischen Fauna, v 3, n 3, p 207–233, 1964b.

ILLIES, J. **Neue Plecopteren aus Südamerika.** *Gewässer und Abwässer*, v 36, p 49–57, 1964c.

ILLIES, J. **Neue Plecopteren aus Chile und Argentinien.** Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, v 37, n 3, p 151–156, 1965.

ILLIES, J. **Katalog der rezenten Plecoptera.** Das Tierreich 82: XXX+632 pp. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1966.

JACOBSON, G.G. & BIANCHI, V.L. **Orthoptera and Pseudoneuroptera from the Russian Empire and Neighboring Lands** [in Russian] 952 pp. 1905.

JEWETT, S. **Some stoneflies from Santa Catarina, Brazil (Plecoptera).** The American Midland Naturalist, p 61, n 1, p 148–161, 1959.

JEWETT, S.G.J. **Notes and descriptions concerning Brazilian stoneflies.** Arquivos do Museu Nacional, v 1, p 167–183, 1960.

KAPOOR, N.N. **Rearing and maintenance of Plecoptera nymphs.** Hydrobiologia, v 40, n 1, p 51–53, 1972.

KLAPÁLEK, F. **Vorläufige Bericht über exotische Plecopteren.** Wiener Entomologische Zeitung, v 28, p 215–232, 1909.

KLAPÁLEK, F. **Analytická tabulka fam Perlidae a její dvou subfam., Perlinae a Acroneuriinae (Plecoptera).** Časopis České Společnosti Entomologické, v 11, p 53–69, 1914.

KLAPÁLEK, F. **Subfamilia Acroneuriinae Klp.** Časopis České Společnosti Entomologické, v 13, p 45–84, 1916.

KLAPÁLEK, F. **Plécoptères nouveaux. Troisième partie.** Annales de la Société Entomologique de Belgique, v 61, p 320–327, 1921.

KLAPÁLEK, F. **Plécoptères nouveaux. Quatrième partie.** Annales de la Société Entomologique de Belgique, v 62, p 89–95, 1922.

LECCI, L.S. & FROEHLICH, C.G. **Plecoptera.** <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/plecoptera/plecindex.htm>. In: Levantamento e biologia de Insecta e Oligochaeta aquáticos de sistemas lóticos do Estado de São Paulo. <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce> (última atualização: junho 2008). 2006.

LECCI, L.S. & FROEHLICH, C.G. **Taxonomic revision of *Gripopteryx* (Pictet, 1841) (Plecoptera: Gripopterygidae).** Zootaxa, v 2792, p 1–21, 2011.

LINNAEUS, C. **Systema Naturae.** Systema Naturae per Regna Tria Naturae... Tomus I. Editio Decima, reformata. Holmiae, Laurentii Salvii, 824 p. 1758.

MAGNACCA, K.N. & BROWN, M.J.F. **Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprotopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae).** BMC Evolutionary Biology, v 10, p 174, 2010.

MALDONADO, V., B.P. STARK & C. CRESSA **Descriptions and records of *Anacroneuria* from Venezuela (Plecoptera: Perlidae).** Aquatic Insects, v 24, p 219–236, 2002.

MCLELLAN, I.D. ***Falklandoperla kelper* new genus and species of Gripopterygidae (Plecoptera) from Falkland Islands.** Aquatic Insects, p 23, n 2, p 153–160, 2001.

MCLELLAN, I.D., MERCADO, M. & S. ELLIOTT **A new species of *Notoperla* (Plecoptera: Gripopterygidae) from Chile.** Illiesia, v 1, p 33–39, 2005.

MCLELLAN, I.D. & P. ZWICK **New species of and keys to South American Gripopterygidae (Plecoptera).** Illiesia, p 3, n 4, p 20–42, 2007.

MYNOTT, J., WEBB, J. & P. SUTER **Adult and larval associations of the alpine stonefly genus *Riekoperla* McLellan (Plecoptera: Gripopterygidae) using mitochondrial DNA.** Invertebrate Systematics, v 25, p 11–21, 2011.

NAVÁS, L. **Plecópteros.** Pp. 14-15. In: Algunos insectos del Brasil (3a. serie). *Brotéria* - Série Zoológica, v 23, p 5-15, 1926.

NAVÁS, L. **Família Pérlidos.** Pags. 22–23; 160–163. *In:* Insectos suramericanos. Revista de la Real Academia de Ciencias de Madrid, 31. 1934.

NEEDHAM, J.G. **Directions for collecting and rearing dragon flies, stone flies and may flies.** Bulletin of the United States National Museum, v 39, n 1–9, 1899.

NEEDHAM, J.G. & BROUGHTON E. **Central American stoneflies, with descriptions of new species.** Journal of the New York Entomological Society, v 35, p 109–121, 1927.

NOVAES, M.C. & BISPO, P.C. **Plecoptera from Minas Gerais State, southeastern Brazil.** Zootaxa, v 3856, n 3, p 433–442, 2014a.

NOVAES, M.C. & BISPO, P.C. **A new species and notes on Perlidae (Plecoptera) from Paraná and Santa Catarina States, southern Brazil.** Zootaxa, v 3765, n 5, p 458–468, 2014b.

NOVAES, M.C. & BISPO, P.C. **Plecoptera from Minas Gerais State, southeastern Brazil.** Zootaxa, v 3856, n 3, p 433–442, 2014c.

NOVAES, M.C., BISPO, P.C. & Higuti J. **A description of the nymph of *Anacroneuria ofaye* Froehlich (Plecoptera: Perlidae) and a apparatus for rearing Neotropical stonefly species.** Zootaxa, v 3547, p 71–77, 2012.

NOVAES M.C., BISPO P.C. & GONÇALVES M.C. **A new species of *Anacroneuria Klapálek 1909* (Plecoptera: Perlidae) from Espírito Santo State, southeastern Brazil and comments on additional species.** Zootaxa, v 4208, n 1, p 094–098, 2016.

PADUAN, K.D.S. & RIBOLLA, P.E.M. **Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil.** J Med Entomol, v 45, p 59–67, 2008.

PENNAK, R.W. **Freshwater Invertebrates of the United States (2nd edition).** John Wiley & Sons, N.Y. 803 pp. 1978.

PESSACQ, P. **Descripción del último estadio larval de *Neofulla biloba* (Plecoptera: Notonemouridae).** Rev. Soc. Entomol. Argent., v 67, n 3-4, p 59–62, 2008.

PESSACQ, P. **A new Gripopterygidae (Plecoptera) species from southern Patagonia.** Zootaxa, v 2264, p 51–57, 2009.

PESSACQ P. & DE PAUL MARCELA, A. **Description of the last instar larva of *Anacroneuria tucuman* Stark (Plecoptera: Perlidae) from northern Argentina.** Zootaxa, v 4033, n 2, p 270–274, 2015.

PICTET, F.J. **Histoire Naturelle Générale et Particulière des Insectes Névroptères. Famille des Perlides.** J. Kessmann, Genève. 1841.

PIRES, A.C. & MARINONI, L. **DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies.** Biota Neotropica, v 10, n 2, p 339–346, 2010.

RIBEIRO, J.M.F. **Plecoptera (Insecta) adultos da Reserva Ducke. Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Pesquisas da Amazônia, INPA/UFAM, 81 pp. 2004.

RIBEIRO, J.M.F. & GORAYEB I.S. **Description of immatures and association with adults of three species of *Anacroneuria* Klapálek (Plecoptera: Perlidae) of the Brazilian Amazon.** Zootaxa, v 3881, n 1, p 017–032, 2014.

RIBEIRO, J.M.F. & GORAYEB I.S. **Description of immatures associated with adults of two species of *Macrogynoplax* Enderlein and one species of *Enderleina* Jewett (Plecoptera: Perlidae) of the Brazilian Amazon.** Zootaxa, v 3957, n 1, p 069–076, 2015.

RIBEIRO, J.M.F. & RAFAEL J.A. **A key to adult Amazonian stonefly genera with new geographical records of *Enderleina* Jewett for Brazil and first description of the *E. froehlichii* Ribeiro-Ferreira female (Insecta: Plecoptera).** Zootaxa, v 1096, p 61–67, 2005.

RIBEIRO, J.M.F. & RAFAEL J.A. **Description of one new species and a key to adults of *Macrogynoplax* Enderlein (Plecoptera, Perlidae) from Reserva Florestal Adolpho Ducke, Amazonas, Brazil.** Zootaxa, v 1511, p 17–28, 2007.

RIBEIRO, J.M.F., GORAYEB, I.S. & BISPO, P.C. **Description of the nymph of *Anacroneuria singularis* Righi-Cavallaro & Lecci (Plecoptera: Perlidae) and a new locality record for northern Brazil.** Zootaxa, v 4057, n 2, p 295–300, 2015.

RIBEIRO-FERREIRA, A.C. **Nova espécie de *Enderleina* Jewett do Norte do Brasil (Plecoptera: Perlidae).** Acta Amazonica, v 25, p 145–147, 1996.

RIBEIRO-FERREIRA, A.C. & FROEHLICH, C.G. **New Species of *Macrogynoplax* Enderlein 1909 from North Brazil (Plecoptera: Perlidae: Acroneuriinae).** Aquatic Insects, v 21, n 2, p 133–140, 1999.

RIBEIRO-FERREIRA, A.C. & FROEHLICH, C.G. ***Anacroneuria* Klapálek 1909 from Amazonas State, North Brazil (Plecoptera, Perlidae, Acroneuriinae).** Aquatic Insects, v 23, n 3, p 187–192, 2001.

RIGHI-CAVALLARO, K.O. & LECCI, L.S. **Three new species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from Centre-West and Southeast Brazil.** Zootaxa, v 2683, p 35–44, 2010.

RIGHI-CAVALLARO, K.O., FROEHLICH, C.G. & LECCI, L.S. **New species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) from northeast Brazil.** Studies on Neotropical Fauna and Environment, v 48, p 125–134, 2013.

ROMERO, V. F. **Plecoptera.** In: Fernández, H.R. & Domínguez, E. Guía para la determinación de los artrópodos bentónicos sudamericanos. Argentina: Secretaría

de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán, Editorial Universitaria de Tucumán. Cap. 3. 2001.

ROSENBERG, H.C. & RESH, V.H. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. Chapman & Hall, IX + 488 p. 1993.

ŠAMAL, J. **Larva chilské pošvatky *Diamphipnoa virescentipennis* Blanch. – The description of the larva of the Chilean stone-fly *Diamphipnoa virescentipennis* Blanch. (Plecoptera)**. Časopis Československé Společnosti Entomologické, v 29, p 59–62, 1932.

SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. **Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers**. Annals of the Entomological Society of America, v 87, p 651–701, 1994.

SMITH, M.A., WOODLEY, N.E., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W. & HEBERT P.D.N. **DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae)**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v 103, p 3657–3662, 2006.

SOLIGNAC, M., MONNEROT, M. & MOUNOLOU, J.C. **Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana***. Proc Nat Acad Sci USA, v 80, p 6942–6946, 1983.

STARK, B.P. & B.C. KONDRATIEFF ***Anacroneuria* from Mexico and upper Mesoamerica (Plecoptera: Perlidae)**. Monographs of the Western North American Naturalist, v 2, p 1–64, 2004.

STARK, B.P., FROEHLICH, C.G. & ZÚÑIGA M.C. **South American Stoneflies (Plecoptera)**. Volume 5. Aquatic Biodiversity in Latin America. Pensoft, Sofia-Moscow. p 154. 2009.

STEWART, K.W. & P.P. HARPER Plecoptera. Pags. 217–266. *In*: Merritt, R.W. & K.W. Cummins (Eds.). **An introduction to the aquatic insects of North America**. Kendall/Hunt Publishing Co., Dubuque, IA. p 862. 1996.

STRAHLER, A.N. **Quantitative analysis of watershed geomorphology**. *Trans. Am. Geophys. Union* 38, 913-920. 1957.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A. & KUMAR S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. *Molecular biology and evolution*, v 30, p 2725–2729, 2013.

TAVARES, E.S., BAKER, A.J., PEREIRA, S.L. & MIYAKI C.Y. **Phylogenetic Relationships and Historical Biogeography of Neotropical Parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) 185 Inferred from Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences**. *Syst. Biol.*, v 55, n 3, p 454–470, 2006.

TIERNO-DE-FIGUEROA, J.M., GAETANI, B., LUZÓN-ORTEGA, J. M., LÓPEZ-RODRIGUES, M.J. & FOCHETTI R. **On the identity of *Isoperla curtata* (Plecoptera: Perlodidae): behavioural and molecular approaches show the existence of two separate species**. *Zootaxa*, v 3000, p 49–58, 2011.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., & GIBSON, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic acids research*, v 22, n 22, p 4673–4680, 1994.

VANZOLINI, P.E. & PAPÁVERO, N. **Manual de Coleta e Preparação de Animais Terrestres e de Água Doce**. Secretaria de Estado da Agricultura de São Paulo. São Paulo. 223p. 1967.

VERA, A. **La ninfa de *Nigroperla costalis* Illies 1964 (Plecoptera: Perlidae: Acroneuriinae) y clave para ninfas de los géneros de Perlidae presentes en Chile**. Acta Entomológica Chilena, v 29, n 2, p 7–13, 2005a.

VERA, A. **Los estados ninfales de *Limnoperla* Illies 1963 y *Rhithroperla* Illies 1963 (Plecoptera: Gripopterygidae, Gripopteryginae)**. Revista Chilena de Entomología, v 31, p 5–12, 2005b.

VERA, A. **Una nueva especie de *Teutoperla* Illies, 1963 para Chile: *Teutoperla maulina* n. sp. (Plecoptera:, Gripopterygidae), con comentarios sobre su biología**. Acta Entomológica Chilena, v 30, n 1, p 29–38, 2006a.

VERA, A. **Una nueva especie de Gripopterygidae de Chile, *Potamoperla testacea* n.sp. (Insecta: Plecoptera)**. Gayana, v 70, n 2, p 168–175, 2006a.

VERA, A. **Redescubrimiento de *Neopentura semifusca* Illies 1965 (Plecoptera: Gripopterygidae), descripción del imago macho, redescipción de la hembra y la ninfa**. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, v 65, n 3–4, p 69–77, 2006c.

VERA, A. **Descripción de la ninfa de *Araucanioperla bullocki* (Navás, 1933) (Plecoptera: Gripopterygidae)**. Acta Entomológica Chilena, v 31, n 1, p 15–22, 2007.

WRIGHT, T.F., SCHIRTZINGER, E.E., MATSUMOTO, T., EBERHARD, J.R., GRAVES, G., SANCHEZ, J.J., CAPELLI, S., MÜLLER, H., SCHARPEGGE, J., CHAMBERS, G.K. & FLEISCHER R.C. **A multi-locus molecular phylogeny of parrots (Psittaciformes): support for Gondwanan origin during the Cretaceous.** *Mol. Biol. Evol.*, v 25, p 2141–2156, 2008.

ZHOU, X., ADAMOWICZ, S.J., JACOBUS, L.M., DEWALT, R.E. & HEBERT P.D.N. **Towards a comprehensive barcode library for arctic life - Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada.** *Frontiers in Zoology*, v 6, n 30, p 1–9, 2009.

ZHOU, X., JACOBUS, L.M., DEWALT, R.E., ADAMOWICZ, S.J. & HEBERT, P.D.N. **The Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): insights into biodiversity patterns from DNA barcoding.** *Journal of the North American Benthological Society*, v 29, n 3, p 814–837, 2010.

ZWICK, P. **Die Plecopteren Pictets und Burmeisters, mit Angaben über weitere Arten (Insecta).** *Revue Suisse de Zoologie*, v 78, n 4, p 1123–1194, 1972.

ZWICK, P. **Die Plecopteren-Arten Enderleins (Insecta); Revision der Typen.** *Annales Zoologici*, v 30, n16, p 471–507, 1973a.

ZWICK, P. **Das phylogenetische System der Plecoptera.** *Entomologica Germanica*. v 1, p 50–57, 1974.

ZWICK, P. **Plecoptera (Steinfliegen).** *Handb. Zool. Berlin*, v 4, n 2, p 2–7. Walter de Gruyter, Berlin, 1980.

ZWICK, P. **Phylogenetic System and Zoogeography of the Plecoptera.**

Annu.Rev. Entomol., v 45, p 709–746, 2000.

ZWICK, P. **The Plecoptera who are they? The problematic placement of stoneflies in the phylogenetic system of insects.** Aquatic Insec., v 31, p 181–194,

2009.

ANEXO I

Preparing final files for publication in Zootaxa

Please consult the **Information for Authors**: www.mapress.com/zootaxa/author.html. If possible, use the common font **Times New Roman** for the main text and use as little formatting as possible (use only **bold** and *italics* where necessary; and indent the paragraphs from the second of each section). Special symbols (e.g. male or female sign) should be avoided because they are likely to be altered when files are converted. You are recommended to code males as m# and females as #. We can replace them easily. Please provide the following information when submitting the final files to enable us to typeset and index your paper: a) name of corresponding author and email; b) family names of authors and preferred short running title (<60 alphabets); c) number of plates and cited references; and d) high taxon (as in Zootaxa sections) and number of new taxa described in the paper.

Specific points to note:

- 1) Text of the manuscript.** Please save the file containing the text and tables as a ms word or RTF file. Do not double space or use footer/header. Captions of plates/figures should be inserted where you want your figures to be inserted, or listed at the end of the manuscript. Vector diagrams/charts generated in programs such as excel can be embedded in the text file as well.
- 2) Tables.** Please use the table function in your word processor to build tables so that the cells can be easily re-sized to fit the page by the typesetters. Never use the Tab key to type tables, nor use space bar to adjust space. If you did that, please correct them.
- 3) Figures.** Please note that the journal has a matter size of 25 cm x 17 cm (printable area of the main text and plates) and is printed on A4 paper. If the final size of your plates is greater than this, please crop extra white areas around plates or reduce it to this size; this will reduce file size. Plates containing only black&white lines/dots are line art works and must be scanned as such (i.e. 1 bit, monochrome line art) at 600 dpi (maximum 1200 dpi). They should be saved in tiff file and LZW compression is recommended to be used to reduce file size for easy sub-mission by e-mail. Plates containing greyscale drawings and photographs should be scanned at 300 dpi and saved in TIFF (use LZW compression) or jpeg at the highest quality. **Please do not modify photographs in the jpeg files; the print quality would be severely altered if you did that. You can modify files in the TIFF file and when completed, convert to high quality jpeg for submission.** If you have colour figures, it is best to group them together in plates, which will save cost.
- 4) Reference list.** This must be formatted using Zootaxa style (see below for examples of main types of papers): 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 a “n dash”, not a 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.
- 5) Submission of files.** Please send final files by e-mail (or ftp) to your subject editor who will then forward files of accepted versions to Zootaxa office. Plates (if many) may be sent directly to Zootaxa office if the subject editor agrees.

Journal paper

Gusarov, V.I. (2002) A revision of Nearctic species of the genus *Geostiba* Thomson, 1858 (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae). *Zootaxa*, 81, 1–88.

Book chapter

Newton, A.F., Thayer, M.K., Ashe, J.S. & Chandler, D.S. (2000) Staphylinidae Latreille, 1802. In: Arnett, R.H. & Thomas, M.C. (Eds.), *American Beetles. Vol.1. Archostemata, Myxophaga, Adephaga, Polyphaga: Staphyliniformia*. CRC Press, Boca Raton, pp. 272–418.

Book

Baker, E.W. & Tuttle, D.M. (1994) *A Guide to Spider Mites (Tetranychidae) of the United States*. Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan, 347 pp.

Internet resources

O'Connor, R.J., Dunn, E., Johnson, D.H., Jones, S.L., Petit, D., Pollock, K., Smith, C.R., Trapp, J.L. & Welling, E. (2000) A programmatic review of the North American Breeding Bird Survey: report of a peer review panel. U.S. Geological Survey Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, Maryland. Available from <http://www.mp2-pwrc.usgs.gov/bbs/bbsreview/> (accessed 3 April 2003)

include the last date when you see that site, as it can be moved or deleted from that address in the future