

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
Faculdade de Ciências e Letras- Campus de Assis

Vanessa Perondini Passadori

***Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae): nova espécie, imaturos e validade da forma da asa na discriminação entre espécies**

Assis

2025

Vanessa Perondini Passadori

***Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae): nova espécie, imaturos e validade da forma da asa na discriminação entre espécies**

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

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

Coorientador: Dr. Albane Vilarino

Bolsista: Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior – Brasil (CAPES) – Código
de Financiamento 001

Assis

2025

P285p	Passadori, Vanessa Perondini Phylloicus (Trichoptera: Calamoceratidae): nova espécie, imaturos e validade da forma da asa na discriminação entre espécies / Vanessa Perondini Passadori. -- Assis, 2025 74 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis Orientador: Pitágoras da Conceição Bispo Coorientador: Albane Vilarino 1. Taxonomia (zoologia). 2. Insetos Aquáticos. 3. Morfometria Geométrica. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VANESSA PERONDINI PASSADORI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CÂMPUS DE ASSIS.

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 8h30min, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VANESSA PERONDINI PASSADORI, intitulada **Phylloicus (Trichoptera: Calamoceratidae): nova espécie, imaturos e validade da forma da asa na discriminação entre espécies**.

A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. PITÁGORAS DA CONCEIÇÃO BISPO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) UNESP/FCL - Assis, Prof. Dr. RAFAEL PEREIRA DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Prof. Dr. GLEISON ROBSON DESIDERIO GOMES (Participação Virtual) do(a) UNESP/FCL - Assis. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. PITÁGORAS DA CONCEIÇÃO BISPO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pitágoras C. Bispo pela amizade, por sempre me acalmar e por ter me orientado mesmo eu gostando de Trichoptera. Exemplo de profissional e pessoa, confiança e ensinamentos.

Aos meus pais, Josué Antonio Valdir Passadori e Solange Fabri Perondini Passadori e a minha avó, Irma Fabri Perondini, por me inspirarem e sempre me apoiarem por mais louca que era minha ideia, sem ao menos questionar, apenas sorrindo.

À minha irmã, Vivian Perondini Passadori, por sempre estar comigo, mesmo a 500 km de distância, me mantendo na linha e apoiando a cada respiração que eu dava, só você sabe o quanto me ajudou em tudo (e claro por me dar o amor da minha vida, o Fredão).

Ao meu companheiro de vida e melhor amigo Pato (ou Alexandre Junior), por me apresentar o amor, carinho, incentivo, paciência e todo resto que aqui se encaixa, sendo fundamental nessa etapa.

A minha parceira de vida, de religião e trabalho, Marina Miguel, por todo ensinamento, companheirismo e tantas outras coisas que não há nem como descrever.

A minha grande amiga, Luana Monteiro de Miranda, com quem dividi anos da minha vida, sendo sempre um exemplo e inspiração de pessoa.

Aos amigos de trabalho Maíra (minha eterna pupila), Gustavo, Luís e Carol, com quem aprendi que amizade em local de trabalho pode ser muito divertida e vantajosa (muitos eventos rs).

Ao Dr Albane Vilarino, por todos os ensinamentos e confiança. Espero usar tudo que aprendi com muita sabedoria e fazendo jus ao profissional que você é e me ensina a ser.

Aos servidores técnicos de laboratório, Moisés e Caetano, por sempre me auxiliarem em tudo que precisei. Aos funcionários e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da UNESP de Assis e de Bauru pelo apoio, suporte e confiança.

Ao Prof. Dr Adolfo Ricardo Calor e a toda equipe do LEAq-UFBA por me acolher e ceder material para complementar meus estudos sobre morfometria de *Phylloicus*. No LEAq também fiz grandes amigos e tenho muitas boas lembranças.

Ao Dr. Gleison Desidério que tem me auxiliado muito nesta etapa da minha vida profissional e com quem espero aprender muito ainda.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

E à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, proc. 23/03818-6) pelo suporte ao laboratório de biologia aquática.

Peço desculpas caso tenha esquecido de mencionar alguém, mas agradeço profundamente a todos que contribuíram de alguma forma e que mereçam meu reconhecimento.

RESUMO

A fauna de insetos representa cerca de 70% dos animais conhecidos no planeta, e aproximadamente 100 mil espécies possuem pelo menos uma fase da vida associada a ecossistemas aquáticos. Entre elas, a ordem Trichoptera se destaca, com cerca de 17.300 espécies válidas, cujos imaturos vivem em ambientes dulcícolas enquanto os adultos são terrestres e geralmente encontrados próximos a corpos d'água. As larvas apresentam diferentes estratégias ecológicas, sendo muitas construtoras de abrigos portáteis ou retiros fixos utilizando seda. Além de seu papel fundamental no processamento da matéria orgânica, os tricópteros são amplamente utilizados como bioindicadores ambientais devido à sua sensibilidade a variações ecológicas. Apesar de sua relevância ecológica e taxonômica, a ordem ainda enfrenta lacunas significativas no conhecimento, incluindo déficits Linneano (relacionado à identificação e descrição de espécies), Wallaceano (deficiência em dados de distribuição) e Haeckeliano (falta de informações sobre os diferentes estágios de vida). Dentro da subordem Integripalpia, o gênero *Phylloicus* (Calamoceratidae) se destaca como um dos principais fragmentadores em riachos neotropicais, com larvas que constroem abrigos a partir de folhas. No entanto, a associação entre imaturos e adultos ainda é escassa para muitas espécies, dificultando análises ecológicas e taxonômicas mais robustas. Neste contexto, o presente estudo tem dois objetivos principais: (i) realizar um estudo taxonômico das espécies de *Phylloicus* da Estação Ecológica de Assis, no estado de São Paulo, associando imaturos e adultos por meio de uma abordagem integrativa; e (ii) avaliar o potencial da morfometria geométrica da asa anterior na delimitação das espécies do gênero. Como principais resultados, descrevemos uma nova espécie, associamos e descrevemos os estágios imaturos de *Phylloicus angustior* Ulmer e demonstramos que a variação na forma da asa anterior pode ser utilizada como ferramenta complementar na identificação e diferenciação das espécies de *Phylloicus*.

Palavras-chaves: Taxonomia, déficits, insetos aquáticos

ABSTRACT

The insect fauna represents approximately 70% of all known animal species on the planet, with around 100,000 species having at least one life stage associated with aquatic ecosystems. Among them, the order Trichoptera stands out, comprising about 17,300 valid species, with aquatic mature stages and terrestrial adults that are typically found near water bodies. Larvae exhibit different ecological strategies, with many species constructing portable cases or fixed retreats using silk. In addition to their fundamental role in organic matter processing, caddisflies are widely used as environmental bioindicators due to their sensitivity to ecological variations. Despite their ecological and taxonomic significance, the order still faces substantial knowledge gaps, including the Linnean deficit (related to species identification and description), the Wallacean deficit (lack of distributional data), and the Haeckelian deficit (scarcity of information on different life stages). Within the suborder Integripalpia, the genus *Phylloicus* (Calamoceratidae) stands out as one of the main leaf-shredding organisms in Neotropical streams, with larvae that construct cases using leaves. However, the association between immature and adult stages remains poorly documented for many species, limiting more comprehensive ecological and taxonomic analyses. In this context, the present study has two main objectives: (i) to conduct a taxonomic study of *Phylloicus* species from the Estação Ecológica de Assis, in the state of São Paulo, associating immatures and adults through an integrative approach; and (ii) to evaluate the potential of geometric morphometrics of the forewing in species delimitation within the genus. As key findings, we describe a new species, associate and describe the immature stages of *Phylloicus angustior* Ulmer, and demonstrate that variations in forewing shape can serve as a complementary tool for species identification and differentiation within *Phylloicus*.

Keywords: Taxonomy, deficits, aquatic insects

Sumário

Introdução Geral.....	10
Capítulo 1- Reducing the Haeckelian, Linnaean, and Wallacean shortfalls: description of the immature stages, new records and a new species of <i>Phylloicus</i> Müller, 1880	16
(Trichoptera: Calamoceratidae).....	16
Abstract.....	16
Materials and methods	20
Results	22
Taxonomy	22
<i>Phylloicus angustior</i> Ulmer, 1905.....	22
<i>Phylloicus camargoi</i> Quinteiro & Calor, 2011	30
<i>Phylloicus camboim</i> Passadori & Vilarino sp. nov	34
Discussion.....	42
Acknowledgement	43
References.....	44
Capítulo 2- Geometric morphometrics as a tool for species discrimination in <i>Phylloicus</i>	47
(Trichoptera: Calamoceratidae).....	47
Abstract.....	48
Introduction.....	49
Materials and methods	51
Results	55
Discussion.....	61
Acknowledgement	63
References.....	64
Conclusões gerais.....	67
Referências gerais	68

Introdução Geral

Os insetos desempenham um papel crucial na biodiversidade global, representando uma das frações mais significativas e diversas da vida na Terra. (Constantino, 2024) Atualmente, aproximadamente um milhão de espécies de insetos já foram descritas, mas estimativas apontam para a existência de mais de 20 milhões de espécies, incluindo aquelas classificadas como crípticas, ou seja, espécies morfologicamente semelhantes, mas geneticamente distintas (Li & Wiens, 2023). Dentre os insetos, cerca de 100 mil espécies estão associadas a habitats de água doce (Rafael et al., 2024). Essa riqueza é particularmente expressiva nas regiões tropicais, que, embora abrigando uma diversidade biológica incomparável, enfrentam desafios consideráveis relacionados à documentação e compreensão dessa riqueza (Rafael et al., 2024). Esses desafios decorrem de um conhecimento fragmentado e de lacunas significativas em várias áreas de estudo (Hortal et al., 2015).

Neste contexto, uma parcela substancial das espécies de insetos tropicais ainda não foi formalmente descrita, uma lacuna taxonômica amplamente reconhecida como déficit Linneano (Hortal et al., 2015). Esse déficit prejudica não apenas a identificação formal das espécies, mas também o entendimento de aspectos fundamentais da biodiversidade, como relações filogenéticas, funções ecológicas e dinâmicas populacionais (Hortal et al., 2015). Paralelamente, a distribuição geográfica real da maioria dessas espécies permanece amplamente desconhecida, resultando no déficit Wallaceano (Hortal et al., 2015). Esse déficit compromete a capacidade de identificar áreas prioritárias para a conservação, além de dificultar a avaliação precisa do status de ameaça das espécies (Hortal et al., 2015).

Quando se trata de insetos aquáticos, um outro desafio que emerge é o fato da maioria das descrições taxonômicas ser baseada exclusivamente em adultos machos, negligenciando estágios imaturos e, em muitos casos, fêmeas (Paprocki et al 2024). Essa lacuna no conhecimento sobre os diferentes estágios de vida é conhecida como déficit Haeckeliano (Faria et al., 2021). Para avançar no conhecimento sobre a biodiversidade tropical e superar esses déficits fundamentais, é essencial desenvolver abordagens integrativas e multidimensionais que abordem não apenas a diversidade morfológica, mas também aspectos moleculares, ecológicos e comportamentais (Padial et al., 2010).

Em grupos extremamente diversos, como os insetos que habitam os trópicos, a delimitação de espécies dentro de gêneros altamente diversificados e com grande similaridade

morfológica apresenta desafios substanciais (Silva, 2015). Nesse contexto, a taxonomia integrativa tem se mostrado uma abordagem promissora (Mesquita, 2023). Esse método combina múltiplas fontes de informação como características morfológicas, dados moleculares, padrões ecológicos e comportamentais para delimitar e caracterizar espécies com maior precisão (Padial et al. 2010).

Neste contexto, estudos recentes indicam que a integração de dados morfológicos e moleculares, em particular, tem sido altamente eficaz na identificação de novas espécies (Mesquita, 2023). Contudo, a aplicação de métodos moleculares pode ser restrita em certas realidades de pesquisa uma vez que os custos envolvidos são altos e requer o uso de equipamentos e reagentes específicos. Assim, torna-se crucial explorar alternativas que ampliem as possibilidades de estudo, incorporando novas fontes de variação que permita análises taxonômicas mais acessíveis.

A crescente degradação dos ambientes tropicais e os riscos elevados de extinção que muitas espécies enfrentam ressaltam a urgência de métodos taxonômicos eficientes e confiáveis (Sawyer et al. 2018). Nesse cenário, a morfometria geométrica tem ganhado destaque como uma ferramenta valiosa para diferenciar espécies, subespécies e ecótipos, além de fornecer insights sobre as variações morfológicas associadas ao ambiente (Schlick-Steiner et al., 2010). Ao permitir uma análise quantitativa detalhada e independente do tamanho, a morfometria geométrica complementa as abordagens tradicionais de análise morfológica qualitativa (Fornel, 2012). Assim, essa abordagem permite ampliar significativamente o alcance das inferências morfológicas (Thimótheo, 2022).

Entre as principais vantagens da morfometria geométrica destacam-se: (1) a redução da subjetividade inerente às análises visuais tradicionais, garantindo maior rigor e consistência na avaliação das características morfológicas (Mutanen & Pretorius, 2007); (2) a simplicidade de sua execução, exigindo apenas equipamentos básicos, como câmeras digitais e softwares especializados; (3) o baixo custo, o que a torna acessível para a maioria dos laboratórios; e (4) a facilidade na identificação de marcos homólogos, especialmente em estruturas como as nervuras das asas de insetos adultos.

A definição das espécies de Trichoptera é baseada principalmente na análise qualitativa da morfologia da genitália dos adultos machos (Holzenthal et al., 2007). Neste contexto, os estudos taxonômicos sobre a ordem poderiam incluir as abordagens da morfometria geométrica,

buscando considerar também a análise quantitativa de estruturas morfológicas não articuladas (Carvalho, 2020). Em insetos adultos, a asa é uma estrutura amplamente usada em análises morfométricas, uma vez que é fácil de ser fotografada e as nervuras facilitam a seleção de marcos anatômicos (Tatsuta et al. 2018). Ao separar forma e tamanho de estruturas morfológicas selecionadas, a morfometria geométrica gera novas variáveis que podem ser integradas com a tradicional análise da genitália masculina, as quais podem ser utilizadas, junto com outras variáveis, para delimitar e identificar as espécies (Mutanen & Pretorius, 2007).

Por outro lado, apesar de suas inúmeras vantagens e do fato de ser uma ferramenta consolidada em diversas áreas da biologia (Tatsuta et al. 2018, Mutanen & Pretorius, 2007), a morfometria geométrica ainda é subutilizada no estudo de insetos aquáticos, incluindo Trichoptera. Embora existam estudos pioneiros que utilizam essa abordagem para analisar a forma corporal de larvas de insetos aquáticos em diferentes habitats (Orlofske et al., 2014); ou para diferenciar espécies de Trichoptera com base em variações morfológicas da asa (Sganga et al. 2022; Vilarino et al., 2024) e de estruturas da genitália masculina (Vilarino & Calor, 2024).

Trichoptera Kirby, 1813

Trichoptera é a mais diversa ordem de insetos primariamente aquáticos, tanto do ponto de vista taxonômico quanto funcional (Morse et al. 2019). Com mais de 17,300 espécies descritas, Trichoptera é a sétima ordem mais rica de insetos (Morse 2019). Os insetos dessa ordem apresentam um ciclo de vida holometábolo (ovo, larva, pupa e adultos) e apresentam uma diversidade notável em termos de sua riqueza, diversidade funcional e diversidade de nichos que habitam. (Morse et al., 2019).

As larvas de Trichoptera, as quais possuem antenas com um único segmento e um par de falsas pernas no último segmento abdominal com garras apicais, habitam diversos tipos de ecossistemas aquáticos (primariamente dulcícolas), incluindo riachos, rios, lagoas e pântanos, além de ambientes temporários como riachos intermitentes (Frandsen et al., 2024). Os imaturos produzem seda, a qual é utilizada na construção de abrigos fixos, redes de captura e abrigos móveis tubulares, sendo estas construídos apenas com a seda ou combinando também materiais como areia, detritos orgânicos e fragmentos vegetais (Morse et al., 2019). A ordem apresenta uma ampla diversidade de estratégias alimentares, que variam de detritívoras a predadoras, permitindo que ocupem uma variedade de nichos ecológicos (Frandsen et al., 2024). Elas também desempenham importantes serviços ecológicos, sendo importante elementos no

processamento da matéria orgânica e nas teias alimentares de comunidades aquáticas (Karaouzas et al., 2024).

As larvas ao se alimentarem de matéria orgânica, como folhas em decomposição, contribuem para a fragmentação e decomposição da matéria orgânica, facilitando a ciclagem de nutrientes (Biasi, 2013). Além disso, conectam os recursos da base da teia alimentar (detritos orgânicos e algas) com os níveis tróficos mais elevados, servindo de presa para organismos vertebrados aquáticos (Morse et al. 2019). Finalmente, as larvas possuem uma ampla gama de sensibilidade aos poluentes e às mudanças no habitat, sendo frequentemente utilizadas como bioindicadores de qualidade ambiental (Morse et al. 2019).

Os adultos, após emergirem, geralmente permanecem próximos a corpos d'água onde vivem os imaturos, com seu ciclo de vida holometábolo, após a copula, as fêmeas geralmente depositam seus ovos diretamente na água (Morse, 2021). Os adultos apresentam asas cobertas com cerdas, o que dá nome ao grupo (latim: *trichos* = pelo e *ptera*= asas). Eles podem apresentar coloração parda ou escura, mas alguns grupos podem apresentar padrões de coloração conspícuos (Holzenthall et al. 2015). A cabeça possui verrugas cobertas por cerdas (Wiggins, 2004). Os adultos também apresentam um haustelo, aparelho bucal característico de Trichoptera, que é formado pela junção do pré-lábio com a hipofaringe; mandíbulas e maxilas são reduzidas (Holzenthall et al., 2007).

A classificação de Trichoptera tem mudado ao longo das décadas, inicialmente, a ordem foi dividida em duas subordens: Annulipalpia Martynov, 1924 e Integripalpia Martynov, 1924 (Ge et al., 2024). Posteriormente, Ross (1967) revisou essa classificação com base na anatomia bucal, comportamento, estágios larvais e preferências de habitat. Como resultado, ela considerou que Annulipalpia incluiria espécies que constroem abrigos fixos em rochas, galhos e folhas, enquanto Integripalpia incluiria aquelas que constroem abrigos móveis feitos de sedimento e fragmentos vegetais, o que lhes permitiria maior mobilidade na água (Frandsen et al., 2024). No entanto, nem todas as famílias constroem esses abrigos, como Glossosomatidae, Hydrobiosidae, Hydroptilidae, Rhyacophilidae e Ptilocolepidae. Neste contexto, Weaver (1984) sugeriu que estas famílias formariam o grupo Spicipalpia, considerada uma subfamília por Wiggins & Wichard (1989). Já as famílias que antes pertenciam a 'Spicipalpia' estão agrupadas dentro de Integripalpia (Ross, 1967; Wiggins, 2004; Holzenthall, et al. 2007b, 2011; Thomas et al., 2020). Depois de toda a discussão a respeito da ordem, a proposta filogenética mais aceita indica que de fato a ordem é formada pelas duas linhas evolutivas, Annulipalpia e Integripalpia,

as quais surgiram como clados distintos durante o período Permiano há cerca de 290 milhões de anos (Ge et al., 2024; Frandsen et al., 2024).

Dentro de Integripalpia, Phryganides inclui grupos que constroem abrigos portáteis tubulares, os quais tem registros fósseis datados do Jurássico Médio (Calor, 2009). Esses grupos representam a linhagem da ordem que produziam casas em formato tubular na Pangeia, antes da separação dos continentes (Frandsen et al., 2024) Phryganides está dividida em duas infraordens: Plenitentoria e Brevitentoria. A infraordem Brevitentoria inclui as superfamílias Sericostomatoidea e Leptoceroidea (Thomas et al., 2020), cuja divergência provavelmente ocorreu durante o final do Mesozoico, quando diferentes grupos começaram a ocupar nichos especializados em diversos tipos de habitats aquáticos (Thomas et al., 2020) A superfamília Leptoceroidea é composta por seis famílias: Atriplectididae, Calamoceratidae, Leptoceridae, Molannidae, Odontoceridae e Philorheithridae (Santos et al., 2020). No Brasil, apenas quatro dessas famílias são registradas: Atriplectididae representada por *Neotriplectides desiderata* Dumas & Nessimian, 2008; Calamoceratidae representada por com 29 espécies brasileiras de *Phylloicus* Müller, 1880 e uma de *Banyallarga* Navás, 1916; Leptoceridae representada por 105 espécies brasileiras; e Odontoceridae representada por 30 espécies (Carvalho et al., 2023).

A família Calamoceratidae conta com aproximadamente 200 espécies viventes distribuídas em nove gêneros [*Anisocentropus* McLachlan, 1863, *Ascalaphomerus* Walker, 1852, *Banyallarga*, *Calamoceras* Brauer, 1865, *Ganonema* McLachlan, 1866, *Georgium* Fischer, 1964, *Heteroplectron* McLachlan, 1871, *Phylloicus*, e *Silvatares* Navás, 1931 (CTFB, 2025)]. A maior parte de sua diversidade ocorre nas Regiões Neotropical e Oriental (Morse et al. 2019). Na região Neotropical, a família é representada por cerca de 80 espécies, pertencentes a dois gêneros: *Banyallarga* e *Phylloicus* (Holzenthall & Calor, 2017).

O gênero *Phylloicus* habita a região Neotropical, possui 59 espécies descritas, 29 delas do Brasil (Morse, 2023). O Brasil, em particular, é um dos países com a maior diversidade registrada de espécies do gênero, onde várias novas espécies ainda estão sendo descritas (Calor & Santos, 2023). Os adultos apresentam hábitos diurnos, diferente de outras famílias de Trichoptera (Paprocki & Silva, 2024). Eles possuem asas coloridas com padrões formados por cerdas brancas, laranjas e douradas ou por uma membrana clara, às vezes iridescente (Prather, 2003). Após a cópula, as fêmeas depositam seus ovos nos ambientes aquáticos em acúmulos de folhas, de onde eclodem as larvas da próxima geração. As larvas são fragmentadoras e ocorrem principalmente em remansos com acúmulos de folhas, onde as usam para a construção de

abrigos portáteis, abrigos com detritos foliares em um formato exclusivo retangular (Holzenthal & Calor, 2017).

O oeste do estado de São Paulo é uma das regiões que possui menor esforço amostral para a fauna de insetos aquáticos (da Rosa Pires et al 2015) Nesse contexto, amostramos *Phylloicus* na Estação Ecológica de Assis, buscando identificar e descrever espécies novas (reduzindo o déficit Linneano), documentar a novas ocorrências geográficas (reduzindo o déficit Wallaceano) e associar e descrever os estágios imaturos (reduzindo o déficit Haeckliano). Adicionalmente, estudamos espécimes de diferentes espécies de *Phylloicus* depositados em coleções científicas com o objetivo de avaliar a validade da forma da asa na separação das espécies do gênero. Diante do exposto, o presente projeto tem os seguintes objetivos:

Objetivo 1- Analisar os espécimes de *Phylloicus* da região oeste do estado de São Paulo, descrevendo uma espécie nova e associando adultos e imaturos.

Objetivo 2- Avaliar o potencial da morfometria geométrica da asa anterior para delimitação de espécies de *Phylloicus*.

Os resultados do presente estudo são apresentados na forma de dois capítulos intitulados:

Capítulo 1: Reducing the Haeckelian, Linnaean, and Wallacean shortfalls: description of the immature stages, new records and a new species of *Phylloicus* Müller, 1880 (Trichoptera: Calamoceratidae)

Capítulo 2: Geometric morphometrics as a tool for species discrimination in *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae)

Capítulo 1- Reducing the Haeckelian, Linnaean, and Wallacean shortfalls: description of the immature stages, new records and a new species of *Phylloicus* Müller, 1880

(Trichoptera: Calamoceratidae)

DISCLAIMER:

In accordance with the criteria of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN – chapter 3, articles 8 and 9), the new species names proposed here are not valid and should not be cited.

Vanessa P. Passadori^{1,2}, Albane Vilarino³, Gleison Robson Desidério², Máira Encenha de Souza² & Pitágoras C. Bispo²

¹Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), FCL, Assis, SP, Brasil. E-mail: vanessa.perondini@unesp.br

²Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Ciências Biológicas, FCL, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, SP, Brasil.

³Laboratório de Sistemática e Biogeografia de Insetos, Departamento de Zoologia, IB, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

ORCID IDs

Vanessa P. Passadori <https://orcid.org/0009-0006-7632-5962>

Albane

Vilarino [https://orcid.org/0000-0003-3912-](https://orcid.org/0000-0003-3912-8928)

8928 Gleison R. Desiderio

<https://orcid.org/0000-0002-5048-9786> **Maira**

E. de Souza <https://orcid.org/0009-00069503-5004>

Pitágoras C. Bispo [https://orcid.org/0000-0002-](https://orcid.org/0000-0002-7356-8882)
7356-8882

Abstract

The family Calamoceratidae, with nine genera and near 200 species, includes the genus *Phylloicus* Müller, 1880, which is widely distributed in Brazil. Here, we studied specimens of

this genera collected in west region of São Paulo state, Brazil. As result, we described the larvae of *P. angustior*, provided detailed microphotographs of the larvae and adult male of *P. camargoi* and described a new species. The new species is similar to *P. quadridigitatus* and *P. mirabilis* by both having subtriangular preanal appendage and hindleg with two spurs. However, the new species is distinguished by the overall shape of segment X, by the harpago apex not enlarged, the sternum IX narrow, and the corematic structures present only on segment V. This study reduces the Linnaean, Wallacean and Haeckelian shortfalls for Brazilian *Phylloicus*.

KEYWORDS

immature development, larval morphology, integrative taxonomy

Introduction

The family Calamoceratidae Ulmer, 1905 is widely distributed, comprising nine genera and about 200 species (Holzenthal & Calor, 2017). In the Neotropical region, two genera are recorded: *Banyallarga* Navás, 1916 with 19 species (Carvalho, 2023) and *Phylloicus* Müller, 1880 with 63 species (Holzenthal & Calor 2017). Adults *Phylloicus* typically fly mainly during diurnal period near the aquatic environments where their immature stages develop (Santos et al., 2021). The diurnal habits of the adults of *Phylloicus* differ from most other groups of Trichoptera, which fly mainly at night (Prather, 2003; Rueda-Martín, 2013). The adults have colorful wings with patterns formed by white, orange, and golden setae, or by translucent membranes, sometimes iridescent (Rueda-Martín, 2013). All known larvae of *Phylloicus* larvae build characteristic flattened cases using several leaf pieces, mainly inhabit still backwater pools of low-order streams (Prather, 2003).

The genus has 29 species recorded in Brazil (Calor et al., 2025). The Brazilian species with immature stages described include: *P. abdominalis* Ulmer, 1905, *P. amazonas* Prather, 2003, *P. bromeliarum* Müller, 1880, *P. camargoi* Quinteiro & Calor, 2011, *Phylloicus elektoros* Prather, 2003, *P. fenestratus* Flint, 1974, *P. lituratus* Banks, 1920, *P. obliquus* Navás, 1931, and *P. passulatus* Prather, 2003 (Ulmer, 1955; Botosaneanu & Flint, 1982; Cavalcante et al., 2020; Huamantínco et al., 2005; Quinteiro et al., 2011; Rueda-Martín, 2013; SouzaHolanda et al., 2020; Campos et al. 2021). The pupa and larva of *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 previously described by Botosaneanu & Flint (1982) belongs to *Phylloicus hansonii* Denning, 1993 (Prather, 2003).

The larvae of *Phylloicus* are traditionally classified as leaf shredders, since they use leaves not only for feeding but also as material for constructing their cases (Wantzen & Wagner, 2006). On the other hand, there is evidence that the larvae consume mainly fine particulate organic matter (FPOM), rather than coarse particulate organic matter (CPOM), contrary to what would be expected for a shredder (Pimentel et al., 2020). There is also evidence of plasticity, since small feeding variations have been observed in terms of instar and season (Ferreira et al., 2015; Pimentel et al., 2020; Tamaris-Turizo et al., 2020). Despite this debate, *Phylloicus* is a conspicuous detritivore in Neotropical streams and probably plays a relevant role in the processing of organic matter in these environments (Morse 2019).

In the present study, we studied specimens of *Phylloicus* collected in streams of the

Estação Ecológica de Assis with the aim of understanding the diversity of the genus in that conservation unit. Here, we described the immature stages of *P. angustior*, provided detailed microphotographs of the larvae of *P. camargoi*, and described a new species.

Materials and methods

This study was based in specimens sampled from 2019 to 2024 in streams of the Estação Ecológica de Assis, located in São Paulo state, Brazil. This protected area lies in transitional vegetation region between savanna and semi-deciduous seasonal forest (Instituto Florestal do Estado de São Paulo, 2015). The Estação Ecológica de Assis is a protected area located within the Unidade de Gestão de Recursos Hídricos do médio Rio Paranapanema (UGRHI-17). The sampling was conducted in two third-order streams (Campestre and Xaxim streams), which are characterized by sandy substrates and clear waters.

The adults were collected using Malaise traps. Immature specimens were collected in leaf litter and transported alive to the Laboratório de Biologia Aquática da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), campus Assis, São Paulo state, Brazil. In the laboratory, specimens were placed in plastic containers with 500 m filled with water, including leaf litter, from the stream, for acclimatization. During rearing, the containers water level was adjusted according to the developmental stage of the immatures: pupae with approximately 0.5 cm of water height and larvae with 1.5 cm. The water was changed every two or three days, using clean water without chemical additives, collected from a well or from the collection streams, to prevent the proliferation of fungi (Campos et al., 2023).

The development of the immatures was monitored and recorded. When the adults emerged, they were dry-fixed, preserving the color pattern, an important aspect for species identification. The material from the shelters and exuviae was carefully collected, as these elements are crucial for associating life stages. The larval sclerites present in the silk sac in the posterior section of shelters were collected and stored in Eppendorf, allowing comparison with the morphotypes of the larvae present in the collected streams.

For adult identification, the male genitalia were cleared with 10% KOH at room temperature for two days, stopping the reaction with acetic acid for 5 minutes. After that, the male genitalia were cleaned with 70% alcohol for 30 minutes, followed by 100% alcohol for an additional 30 minutes, then again with 70% alcohol for 30 minutes, and finally fixed in glycerin. The genitalia were dissected with emphasis on the structures of abdominal segment X. This protocol was adapted from Blahnik and Holzenthal (2004).

Images of the specimens were obtained using a Leica M205A stereo microscope equipped with a DFC295 camera. Photographs were taken with different focal distances of the

same structure and later combined in Helicon Focus® software to create a single highdefinition image. Some of these images served as the basis for vectorization in Adobe Illustrator®. The specimens were deposited in the Coleção de Insetos Aquáticos “Prof. Dr. Cláudio Gilberto Froehlich” of the Laboratório de Biologia Aquática (UNESP, Assis). The types will be deposited at the Museu de Zoologia (MZSP) of the Universidade de São Paulo and at Coleção Entomológica “Prof. José Alfredo Pinheiro Dutra” (DZRJ) of the Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Results

Taxonomy

Phylloicus angustior Ulmer, 1905

(Figs. 1–5)

Phylloicus angustior Ulmer, 1905; [Type locality: Brazil, Rio Grande do Sul; NMW; ♂]. — Flint, 1966a:11 [lectotype; ♂]. — Flint, 1981a:36 [♂; distribution]. — Botosaneanu & Flint, 1982:24 [larva, pupa]. — Flint, 1991:98 [♂; distribution]. — Botosaneanu & Alkins-Koo, 1993:38 [♂; distribution]. — Flint, 1996a:102 [distribution; likely *hansonii*]. — Flint, 1996b:424 [distribution]. — Muñoz-Quesada, 2000:274 [checklist]. — Botosaneanu, 2002:96 [checklist]. — Prather, 2003:27 [♂; ♀; distribution; described larva and pupa as *P. hansonii*]. — Cohen, 2004:77 [distribution]. — Paprocki et al., 2004:5 [checklist]. — Angrisano & Sganga, 2007:41 [♂; ♀; distribution]. — Calor, 2011:319 [checklist]. — Dumas & Nessimian, 2012:8 [checklist]. — Manzo et al., 2014:167 [distribution]. — Paprocki & França, 2014:4 [checklist]. — Isa Miranda & Rueda Martín, 2014:199 [distribution].

Adult male, female. See Prather, 2003 (Fig 1)

Diagnosis of Larva:(fig 3) differs from other species by having uniform brown head, with color of dorsal and lateral muscle scars yellowish and light. Larvae of *P. abdominalis*, *P. amazonas*, *P. obliquus*, *P. cressae* (Huamantínco et al. 2005, Cavalcante et al. 2020, Barrios et al. 2020), and *P. passulatus* have clear and very evident muscle scars. Trochanters have strong and prominent spines on ventral margin. Anterolateral processes of pronotum have wide base and pre-apical region with flattened lobe (fig 5A), differentiating from those of *P. amazonas*, which are without curvature and taper gradually to pointed apices. Color of legs is uniformly yellowish and light, while in *P. amazonas*, legs are light yellow with brown band in middle region of each femur, tibia, and tarsus; in *P. passulatus*, legs are uniformly light brown (fig 5B,5C,5D).

Description of immatures

Larva

Head: Frontal view: labrum (fig 3F) anterior margin straight, with two groups of 10 to 11 long dorsal setae. Anteromesal region bare; basolateral lobes with long setae. Frontal (fig 2D) projecting anteriorly, with pair of long mesal setae and 2 long setae lateroventrally. Mandibles

turned down (fig 2G) broad at base, curving toward mesal side, tapering toward apex; each mandible with two long setae at base; inner margin smooth, without teeth.

Thorax: Dorsal view, thorax light yellow (fig 3A). Pronotum narrow, with light-yellow anterior margin, sparse short dorsal setae. Mesonotum long and broader than pronotum; metanotum shorter than mesonotum. Midlegs with rows of setae shorter than tarsal setae (fig 5).

Abdomen: Posterodorsal region of segments I–VII with rows of long, thin setae, lateral fringe present. Abdominal terga with anterior hook plates on segments III–VIII, hooks directed posteriorly; segment IX with hooks facing backward. Segments I and V with posterior hook plates directed posterad (fig 4A). Segment I with globular hook plates slightly pronounced posterolaterally, numerous small protuberances. Hook plates IIIa and IVa with 2 pointed, robust hooks. Segment V with 2 pointed, robust hooks; Vp with 3 pointed hooks, slightly curved. PVIa with 2 to 3 pointed, robust hooks, varying in size; VIIa with 3 pointed, robust hooks, varying in size. Plate VIIIa with 3 pointed, robust hooks. IXa with single robust lanceolate hook; each hook connected by narrow-sclerotized plate. Apical processes of segment IX long, slender, each with long dorsal setae at basal third, apex truncated, slightly curved outward.

Case: (fig 4): Measurements. Length: 7–8 mm ($n = 5$); width: 2–4 mm ($n = 5$). Case flattened dorsoventrally, rectangular, consisting of approximately 5–6 leaf fragments, superimposed to cover the entire body of the larva.

Pupa

Pupa: (Fig 6): Length. 9.63–12.62 mm ($n = 5$).

Head: Dorsal view: presenting two groups of 5–6 long dorsal setae; anteromedian region without setae; basolateral lobes, each with long setae; fronts (fig 6A) directed anteriorly with a pair of long setae, medial region with two long setae, and lateroventral region with two long setae. Mandibles symmetrical, broad basally, curved medially, with long setae on the basal lateral region, inner margin smooth, without teeth.

Thorax: Dorsal view: generally pale brown, with the anterior region dark brown (fig 6A); pronotum narrow, anterior margin dark brown, bearing 8–10 medium-sized dorsal setae; mesonotum short, wider than the pronotum; metanotum shorter than the mesonotum; each midleg with a row of setae shorter than the tarsal setae.

Abdomen: Row of long, thin setae on the posterodorsal region of segments I–VII. (fig 5) Abdominal terga with pairs of anterior hook plates (a) on segments III–VIII, with hooks directed posteriorly, and on segment IX with hooks directed anteriorly; pairs of posterior hook plates (p) on segments I and V, with hooks directed anteriorly (fig 6C); hook-plate pair Ip globular, slightly pronounced posterolaterally with numerous small protuberances; hook-plate pair IIIa, each with 2 pointed, stout hooks; hook-plate pair IVa with 1–2 pointed, stout hooks; hook-plate pair Va with 2–1 pointed, stout hooks; hook-plate pair Vp, each with 4 pointed, stout hooks; hook-plate pair VIa with 2 pointed, stout hooks; hook-plate pair VIIa, each with 2–3 pointed, stout hooks; hook-plate pair VIIIa with 2–3 pointed, stout hooks; IXa with 1 lanceolate, stout hook, each connected by a narrow sclerotized plate (fig 6C). Apical processes of segment IX long, slender, each with long dorsal setae on the basal 1/3, truncated apex, slightly curved externally, and bearing three long apicodorsal setae (fig 6C).

Material examined.

BRAZIL: São Paulo, Assis, Estação Ecológica de Assis, S 22°35'52.36188" W 50°22'16.00212" Córrego Campestre. 26, julho de 2024. G. R. DESIDÉRIO, L. PIOVEZANI T., M. ENCENHA S., V. PERONDINI P., nine larvae (five were reared until the adult stage) and one pupae (reared until the adult stage)

Distribution

Argentina, Brazil (GO,MS,ES,MG,SP,PA,RS,SC), Colombia, Paraguay, Uruguay, Venezuela.

Remarks

This is the first record of the species in the western region of São Paulo state, in an ecotone between the Atlantic Forest and the Cerrado, despite being commonly found in the Cerrado biome. The species is widely found in the Southeast, Central-West, and South regions of Brazil. During development, pupation was observed to occur within five to seven days after the fifth instar. The pupal stage lasted seven to eight days until adult emergence.



Fig 1. *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae)



Fig 2. *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae) - Larval sclerites

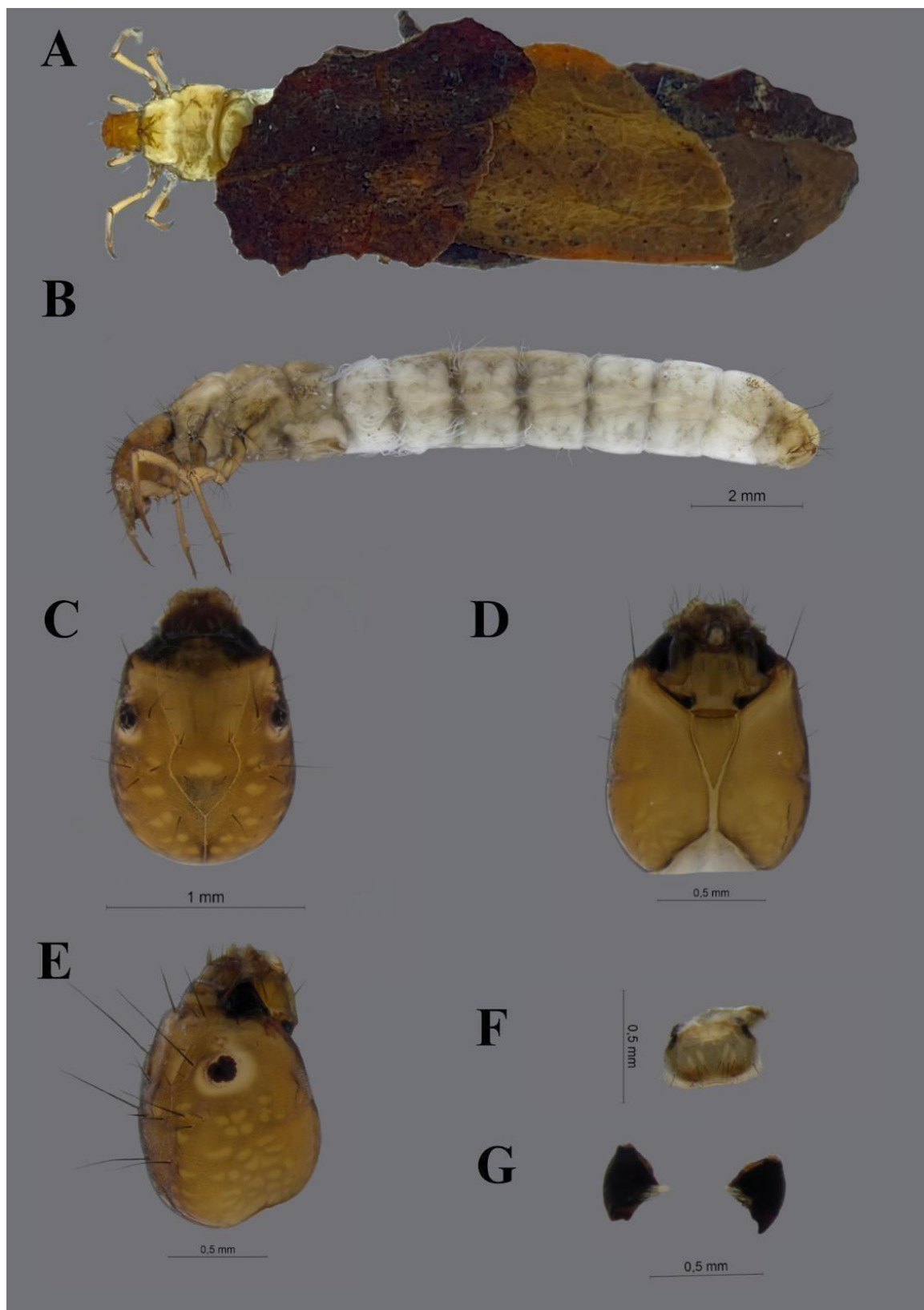


Fig 3. *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae), house and larva: **A** - dorsal view, house; **B** - habitus larva, lateral view; **C** - head, frontal view; **D** - head, ventral view; **E** - head, side view; **F** - labrum, dorsal view; **G** - mandibles, dorsal view.

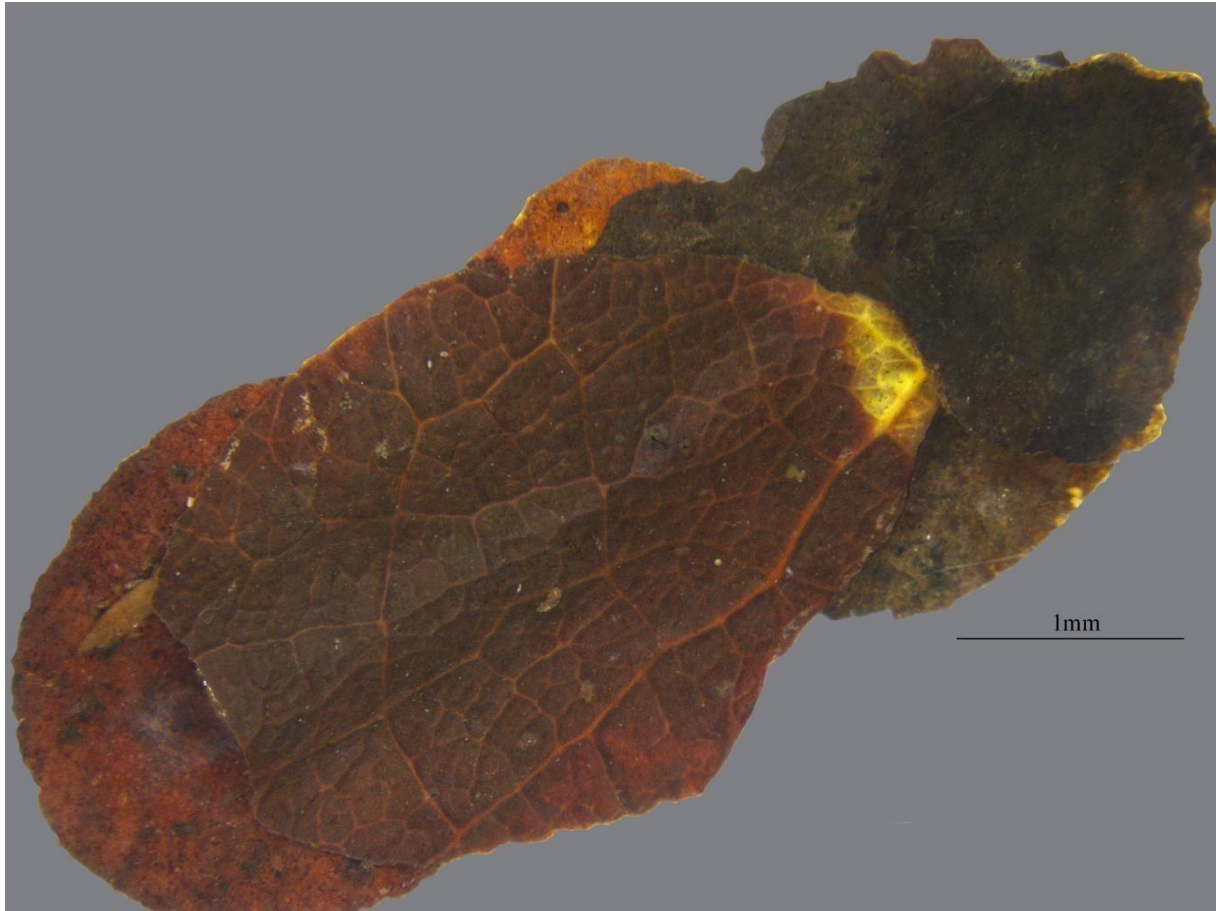


Fig 4. *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae), case ventral view

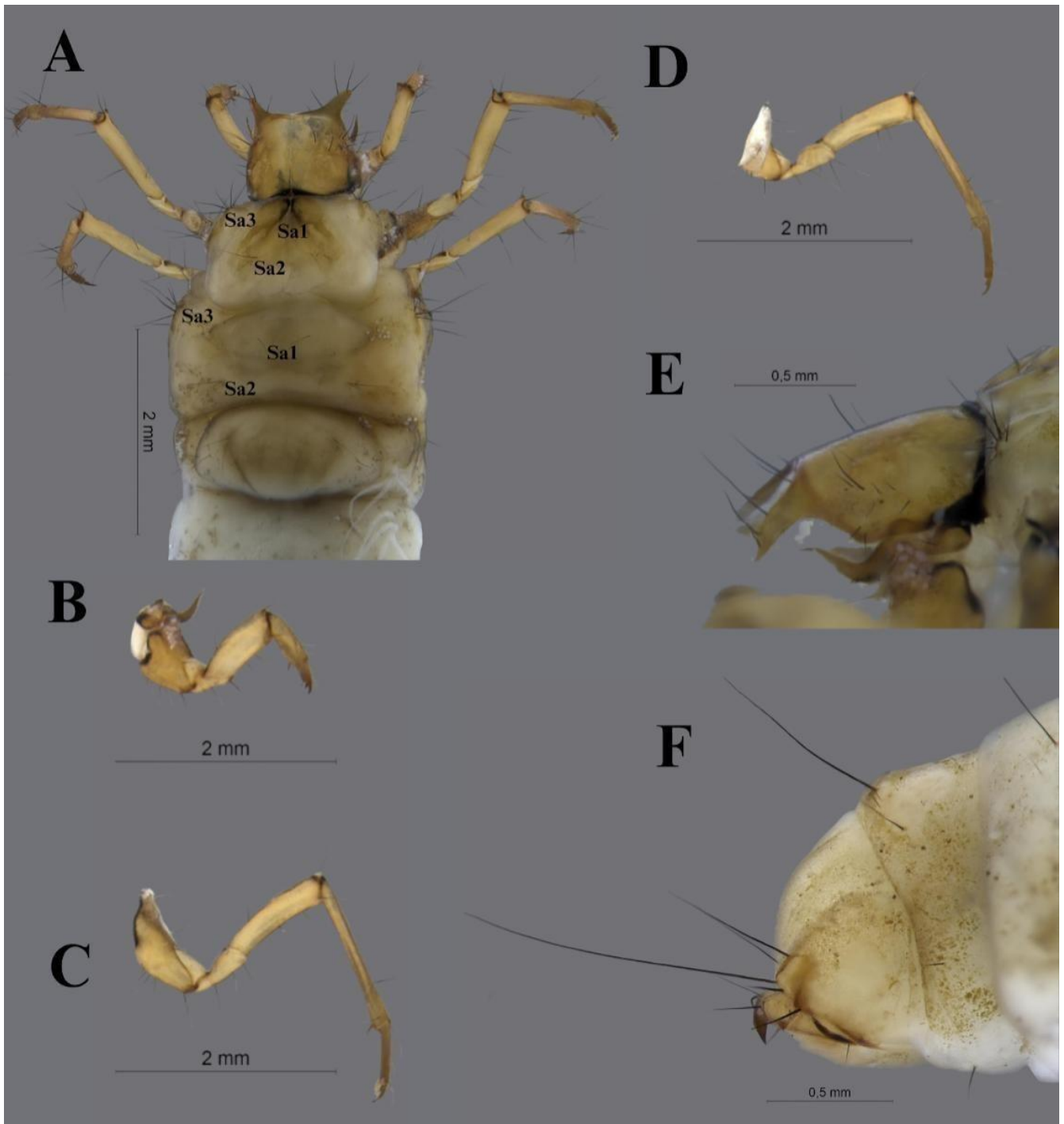


Fig 5. *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae), larva: **A** - thorax, dorsal view; **B** - right front leg, lateral view; **C** - right middle leg, lateral view; **D** - right rear leg, side view; **E** - pronotum, lateral view; **F** - right tarsal claw, lateral view; **G** - larva with house, dorsal view.

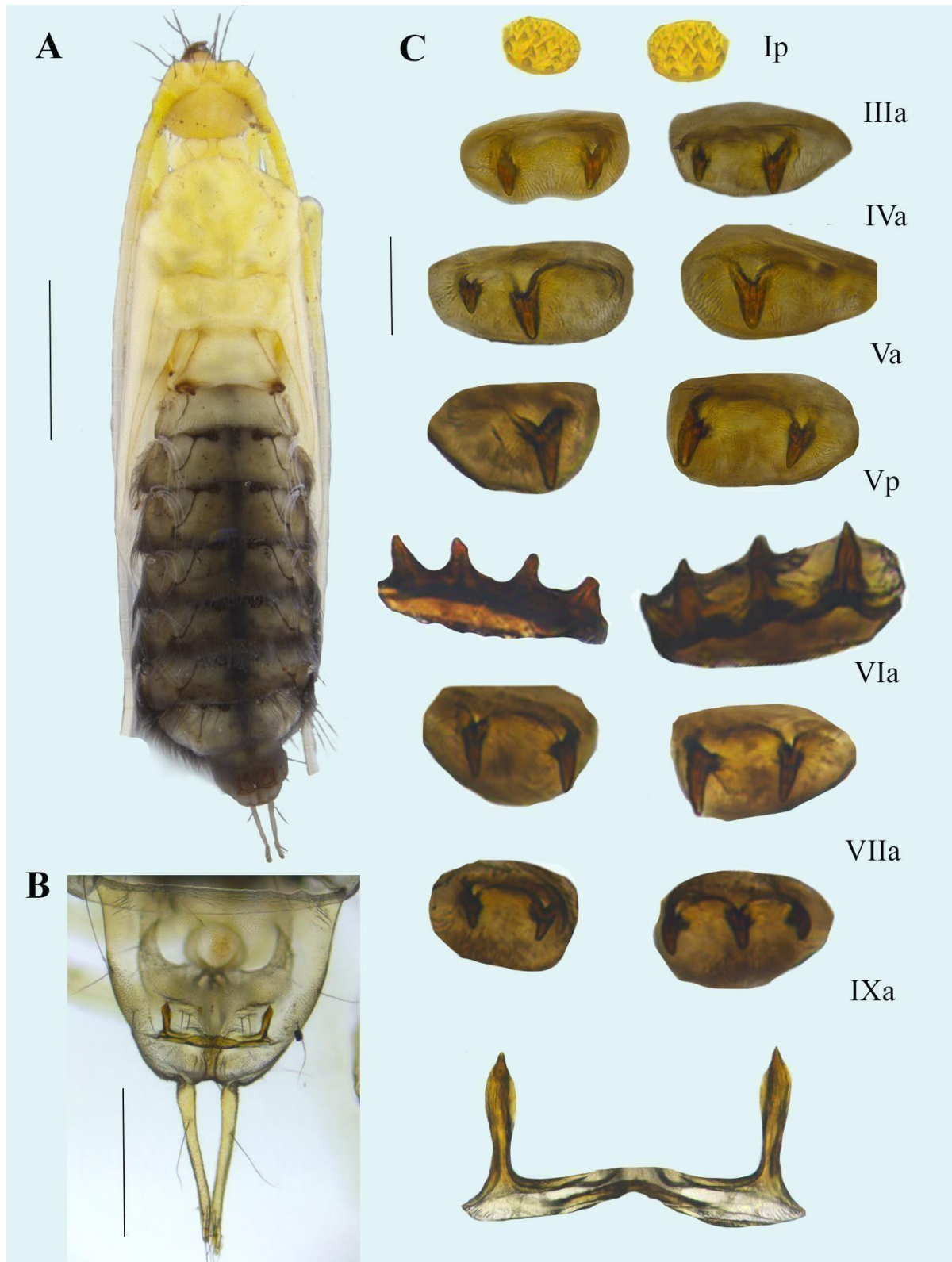


Fig 6. *Phylloicus angustior* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae), Pupa: A, habitus, dorsal view; B, abdominal hook plates, dorsal view; C, apical processes of segments IX–X, dorsal view. Scale bars in mm: A = 2, B = 0.5, C = 0.2. Abbreviations: I, III–IX = abdominal segments; a = anterior; p = posterior

***Phylloicus camargoi* Quinteiro & Calor, 2011**

Phylloicus camargoi Quinteiro & Calor, in Quinteiro et al., 2011:39 [Type locality: Brazil, São Paulo, Ribeirão Preto, 21°10'04"S, 47°51'25"W; MZUSP; ♂; ♀; larva; pupa]. —Calor, 2011:319 [checklist]. —Paprocki and França, 2014:5 [checklist].

Adult male, female and immature. See Quinteiro & Calor, 2011

Material examined

Brazil: São Paulo: Assis. Estação Ecológica de Assis. Córrego Campestre. 22°34'18.1''S 50°22'43.6'' 23. X. 2019. G.R. Desidério, M. Encenha, L. Piovezani e V.P. Passadori (MZSP) Adult 8 ♂

Distribution

Brazil: Cerrado biome (São Paulo state) (Fig. 13).



Fig 7. *Phylloicus camargoi* Quinteiro e Calor, 2011 (Trichoptera: Calamoceratidae), A. Lateral view. B. Dorsal view.

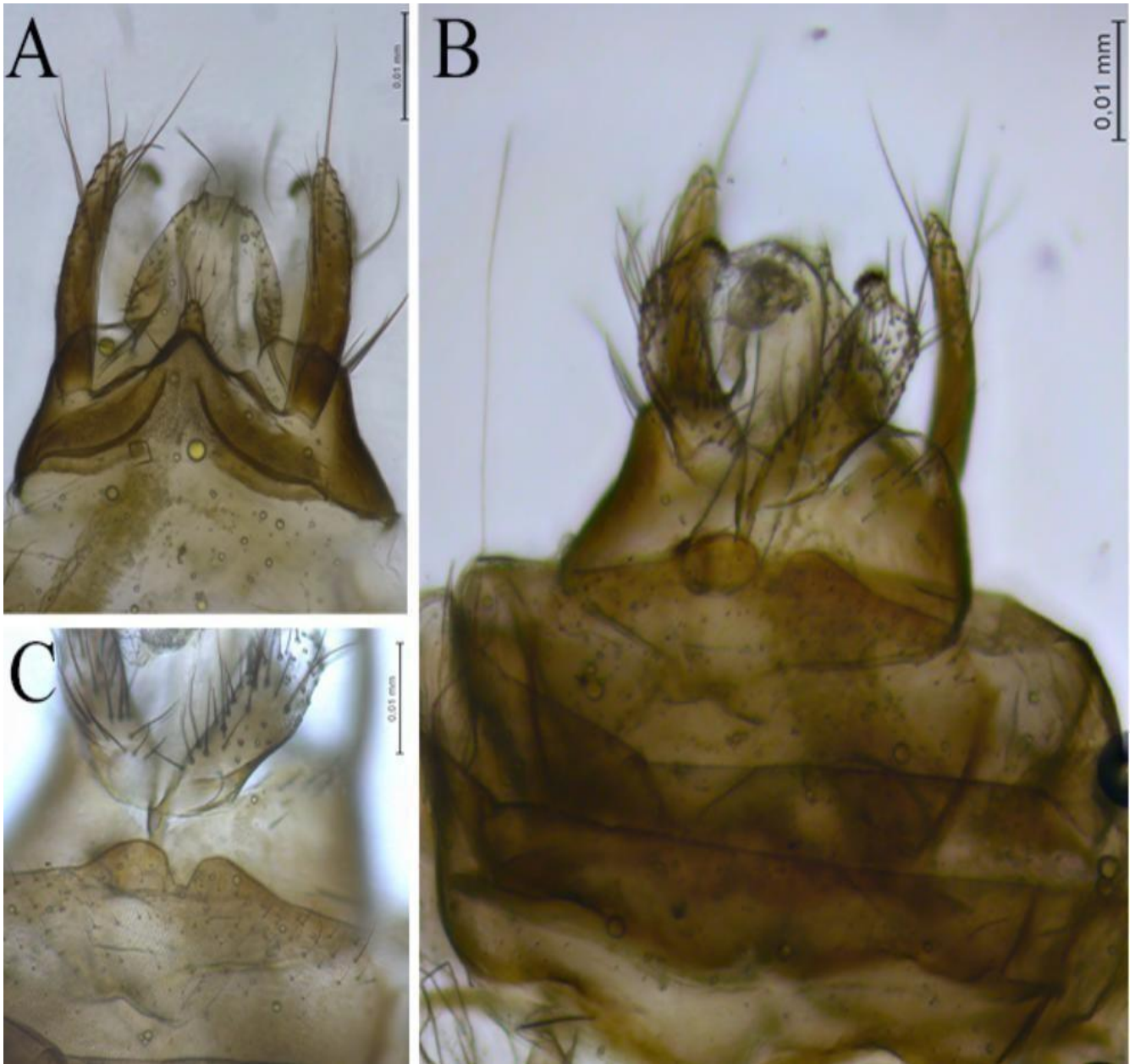


Fig 8. *Phylloicus camargoi* Quinteiro e Calor, 2011 (Trichoptera: Calamoceratidae),
A. Genitalia dorsal view B. Genitalia ventral view. C. IX sternite

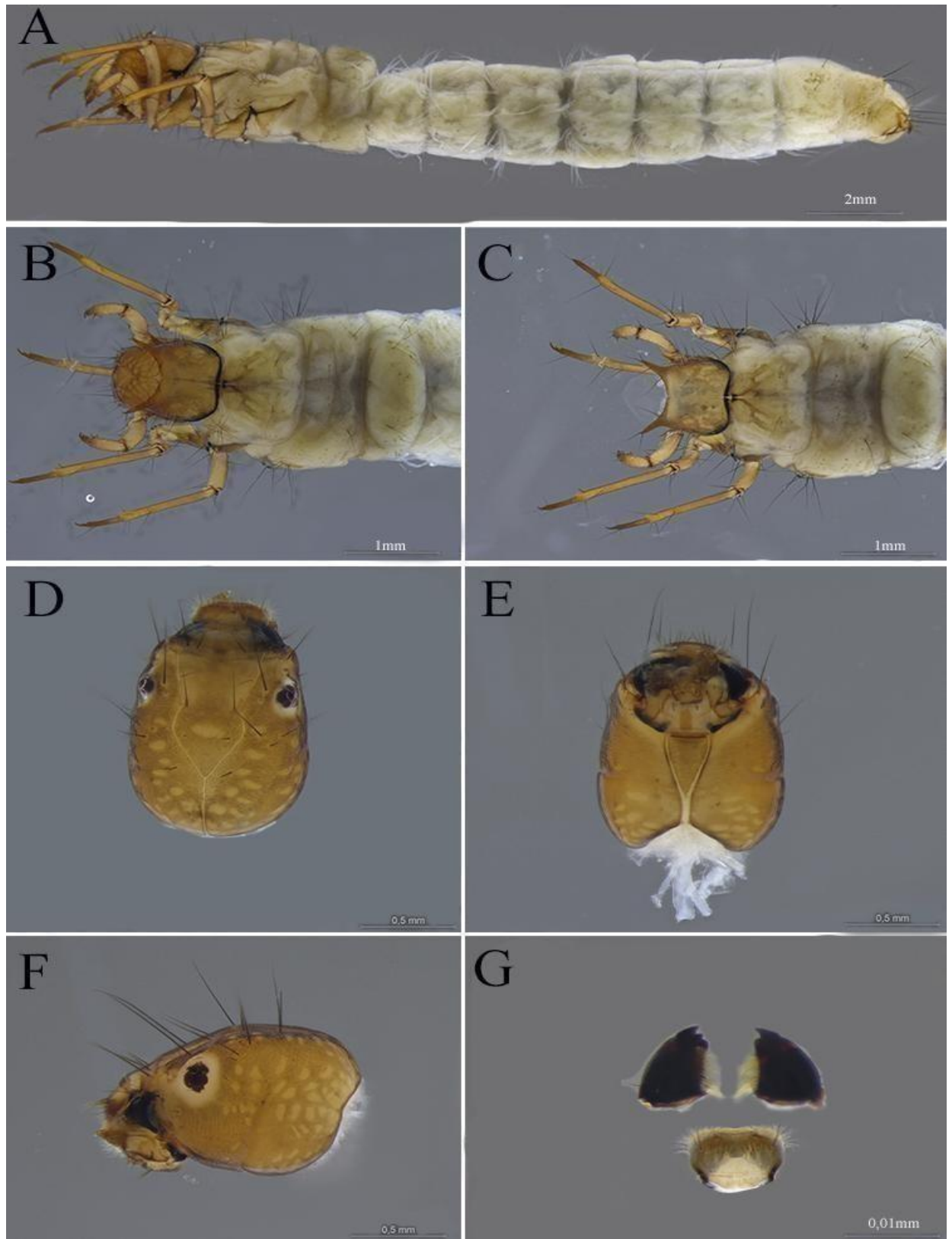


Fig 9. *Phylloicus camargoi* Quinteiro e Calor, 2011 (Trichoptera: Calamoceratidae); A. Habitus lateral, B. Head torax dorsal. C. Torax dorsal. D. Head dorsal. E. Head ventral. F. Head lateral. G. labrum and mandibles.



Fig 10. *Phylloicus camargoi* Quinteiro e Calor, 2011 (Trichoptera: Calamoceratidae), pupae.

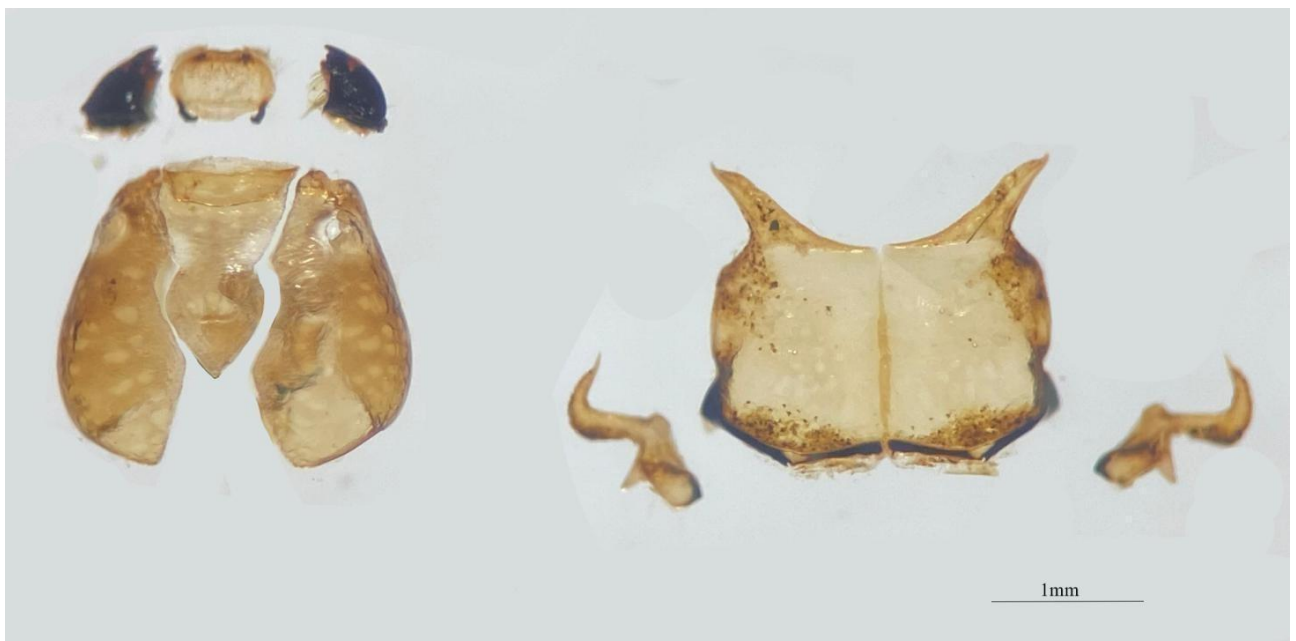


Fig 11. *Phylloicus camargoi* Quinteiro e Calor, 2011 (Trichoptera: Calamoceratidae), larval sclerites. *Remarks*

Adding information to the species description, the male genitalia of *Phylloicus camargoi* have a non-continuous IX sternite suture, showing a distinct interruption (fig. 8). The

anterior margin of the VIII sternite features a slight indentation. In the wing, a description of the coloration is included, where the wing has a yellow coloration (fig.7). The difference between the larvae of *P. angustior* and *P. camargoi* is present in the trocantin (fig.11), where *P. angustior* exhibits a constriction and has two blunt apical teeth on the right mandible, while *P. camargoi* has only one (fig. 9G). The larva presents a triangular frontoclypeus, wider anteriorly, with three main spots. The labrum has secondary setae, and the mandibles have three teeth. (fig. 9G). The pronotum is sclerotized with long anterolateral processes; the mesonotum and metanotum are membranous, with well-defined setal areas (sa1, sa2, and sa3) (fig. 9C). Gills have 1–2 filaments; segments III–VII have setae along the lateral line, and the anal prolegs have sclerotized hooks. During development, pupation was observed to occur within five to seven days after the fifth instar. The pupal stage lasted seven to eight days until adult emergence.

Distribution

Brazil: Cerrado biome (São Paulo state) (Fig. 13).

***Phylloicus camboim* Passadori & Vilarino sp. nov.**

Figs. (10–13) <http://zoobank.org:act:>

Diagnosis

The new species can be distinguished from all its congeners by the following male genital characters. The new species resembles *Phylloicus mirabilis* Cavalcante-Silva et al., 2022, in lateral view, by a flattened, subtriangular preanal appendage (Fig X) and a hindleg with two spurs (Fig X). However, *Phylloicus camboim*, sp. nov., can be distinguished from *P. mirabilis* in several characters: the inferior appendage has the harpago, in lateral view, uniform and cylindrical (Fig. 13B) (with apex enlarged and globose in *P. mirabilis*), the sternum IX, in lateral view, is narrow (Figs. 13B, C) (projecting anterad in *P. mirabilis*), and the corematic structures are short and restricted to segment V (Figs. 12C, D) (present on segments IV–VII in *P. mirabilis*).

Description

Adult male: Anterior wing 6–7 mm (n = 25). Head dark brown (Fig. 12A). Maxillary palp black (Fig. 12B). Antenna twice forewing length; brown. Prothorax dark brown; dorsal

pterothorax glossy dark brown; ventrolateral thorax chestnut brown; mesoscutellum chestnut brown (Fig. 12A). Legs yellowish brown fore legs a little clearer than midlegs and hindlegs. Tibial spur formula 2,4,2. Forewing flat; dark brown, longitudinal white mark at 1/2 length over M1, rounded mark over R4, R5 fork (in alcohol) (Figs. 12B and 13B); forks I, II, III, IV, V present; discoid and medial cells closed. Hindwing basal brush in male; forks II, III, V present (Fig. 13A).

Male genitalia: Preterminal abdominal terga without anteromesal notch. Terga III-V unmodified, without membranous lobes or sclerotized processes (Fig. 12C). Corematic structures present in hapargo. Tergum V short, expanded flanges, lateral and mesal coremata (Fig. 12C, D). Sternum VII short anteromesal process. Sternum VIII similar to VII, smaller process. Tergum IX in dorsal view, mesal ridge extending about half segment length; posterior margin slightly projected, obtuse apex; posteromesal surface with fine setae (Fig. 13C). Sternum IX mesolateral ridges dorsal (Fig. 13D). Preanal appendage longer than tergum X, triangular, crenate lateral margin, long setae (Fig. 13C). Tergum X basodorsal process absent; basolateral processes digitate, length equal to diameter dorsal view; lateral view, tergum tapering posterad, rounded apex (Fig. 13B); dorsal view, shaped mesal incision, apex with short setae (Fig. 13C). Inferior appendage long, 2-segmented (Fig. 13B, D); coxopodite strongly sclerotized, long, cylindrical, long robust setae; harpago short, curved, cylindrical, many apical peglike setae. Phallic apparatus simple, tubular, slightly downcurved, sclerotized opening at apex; lateral view (Fig. 13E), wider at base, tapering apically; endotheca with paired lateral lobes. Phallotremal sclerites average size, longest dimension less than phallobase diameter (Fig. 13E, F).

Adult female: (Fig. 13) Association based on similarity in wing coloration and pattern to male. Anterior wing 6–7 mm. Head dark brown. Maxillary palp black. Antenna twice forewing length; dark brown. Prothorax yellowish brown; dorsal pterothorax glossy dark brown; ventrolateral thorax chestnut brown; mesoscutellum chestnut brown (Fig. 12A). Legs yellowish brown. Tibial spur formula 2,4,2. Forewing flat; dark brown, longitudinal white mark at 1/2 length over M1, round mark over II fork (in alcohol); forks I, II, III, IV, V present; discoid and medial cells closed. Hindwing basal brush in male; forks II, III, V present.

Female genitalia: (Fig. 14) View dorsal terga and sterna sclerotized. Sternum VIII deep notch on anterior margin, small shallow notch on posterior margin, band of small setae on posterior third, row of long setae on posterior margin (Fig. 15A). Sclerotized posteromesal acuminate

process (Fig. 15B). Sternum IX sclerotized anterior and posterior lobes (Fig. 15A). Posterior vaginal sclerite quadrate, rounded anterior margin. Anterior vaginal sclerite triangular, above posterior vaginal sclerite (Fig. 15C). Ventral lobe triangular, very sclerotized (Fig. 15B). Segment X short, flattened preanal appendages, elongated laterally, covered with long setae; tergum X slightly elevated (Fig. 15B).

Immature. Unknown.

Etymology

The name refers to the indigenous peoples of the region. *Camboim* originates from the Tupi-Guarani language, meaning 'from the leaf.' The name is used in apposition.

Material examined

Holotype

♂: Brazil: São Paulo: Assis. Estação Ecológica de Assis. Córrego Campestre. 22°34'18.1''S 50°22'43.6''W. vii.2019. Malaise trap. Passadori leg. (MZSP).

Paratypes

Brazil: São Paulo: 12♂♂ (MZSP), same date as holotype; 3♂♂(MZSP) same data except x.2020; 1♂♂ (DZRJ) xi.2022; 5♂♂(DZRJ) vii.2023; 4♂♂(MZSP) ix.2023; 7

♀ (MZSP), same date as holotype.

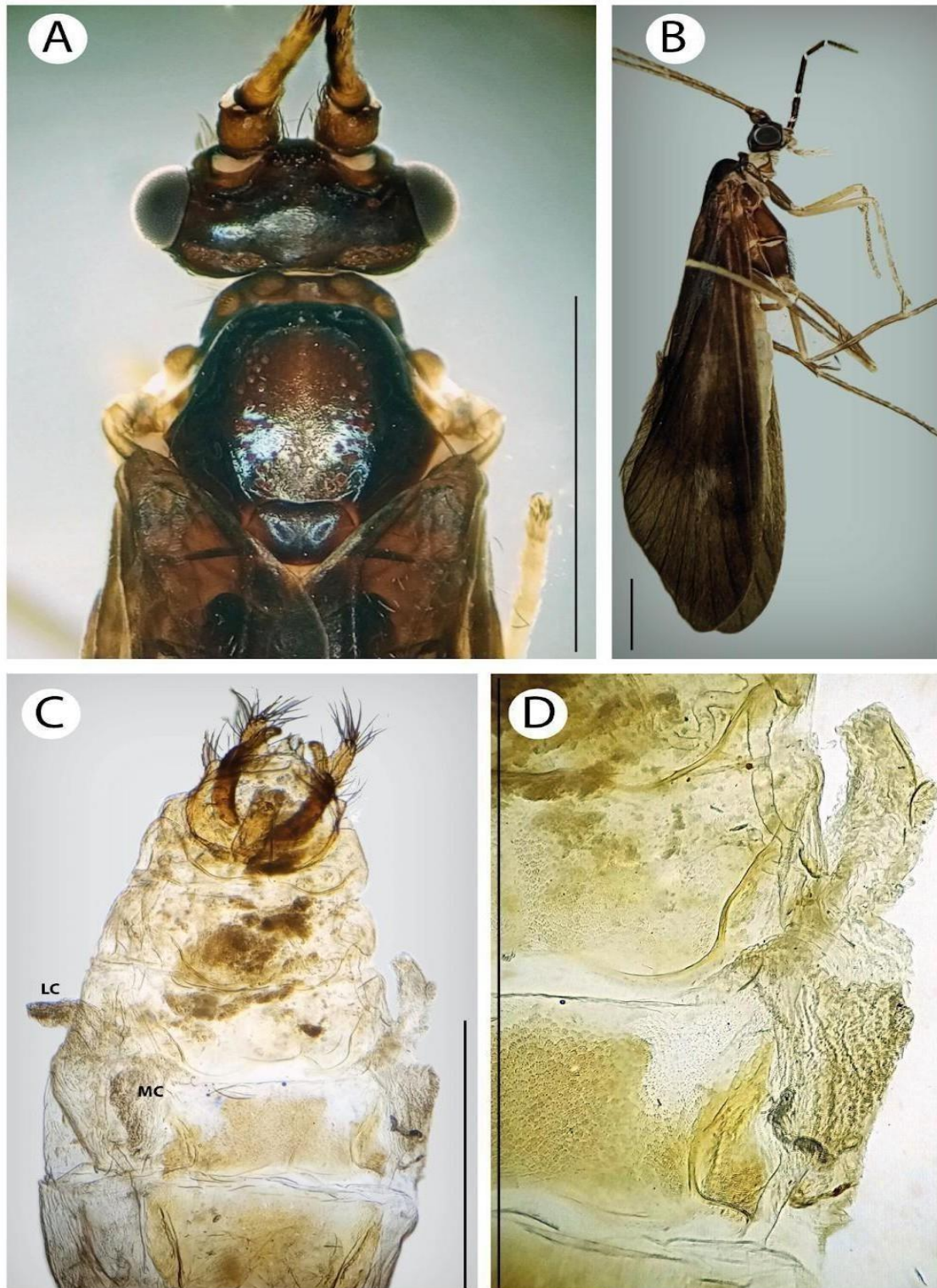


Fig 12. *Phylloicus camboim* **sp. nov.**, adult male. A. head and thorax dorsal view; B. habitus lateral view; C abdomen dorsal view, showing corematic structures; D detail of segment V lateral and mesal coremata. Abbreviations: LC = lateral corema, MC = mesal corema. Scale bar = 1 mm.

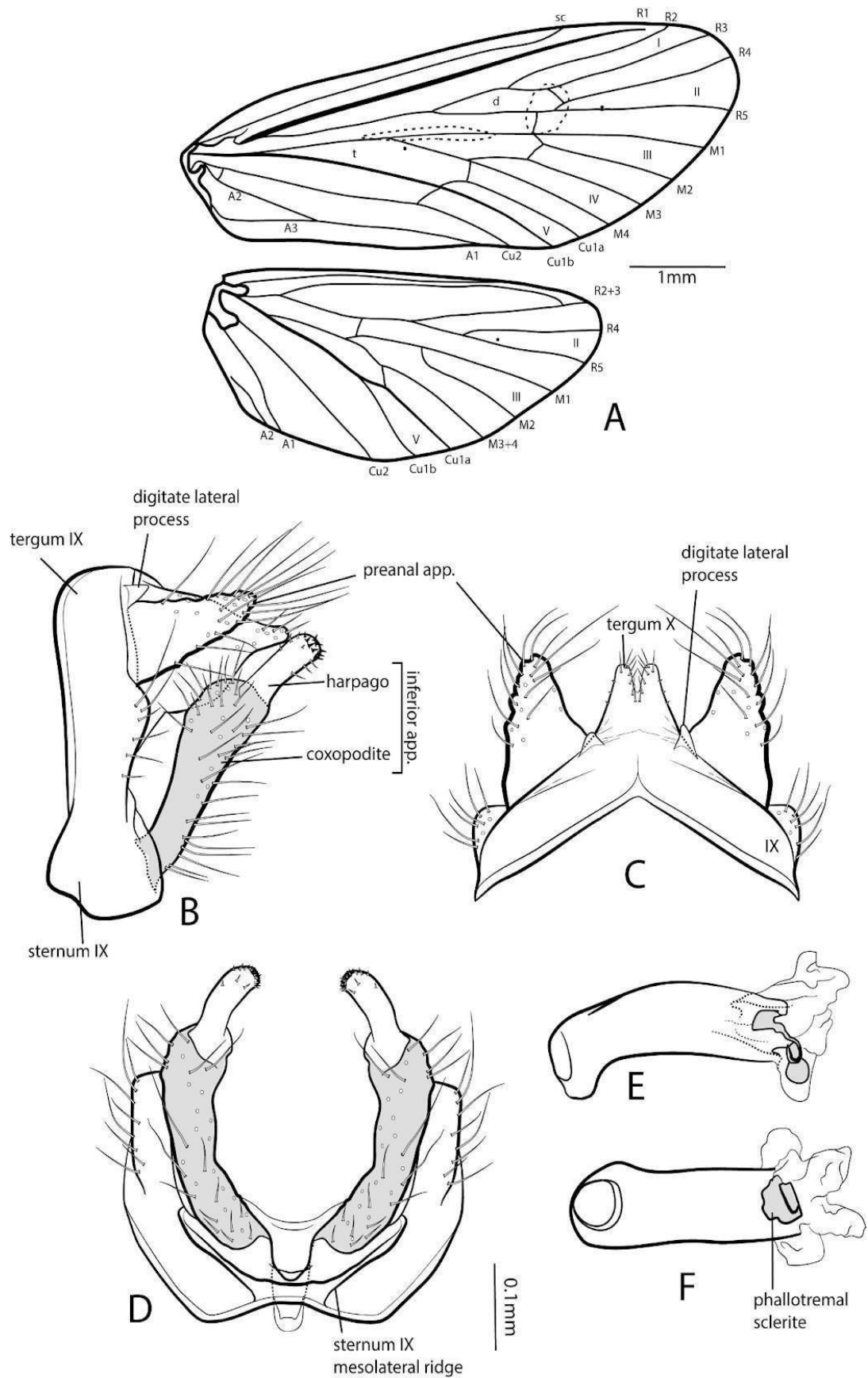


Fig 13. *Phylloicus camboim* sp. nov. A. wing venation; Male genitalia: B. lateral; C. dorsal; D. ventral; E. phallus lateral; F phallus ventral.



Fig 14. *Phylloicus camboim* **sp. nov.** adult, female.

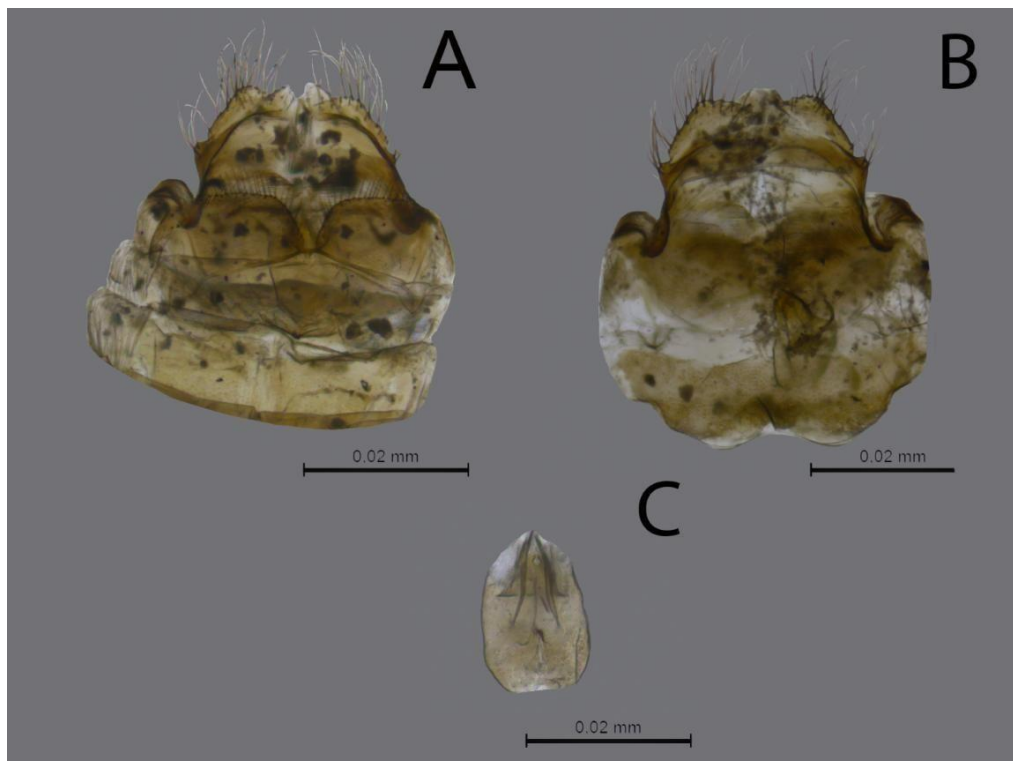


Fig 15. *Phylloicus camboim* **sp. nov.** female. A. Genitalia ventral view; B. Genitalia dorsal view; C. Genital apparatus.

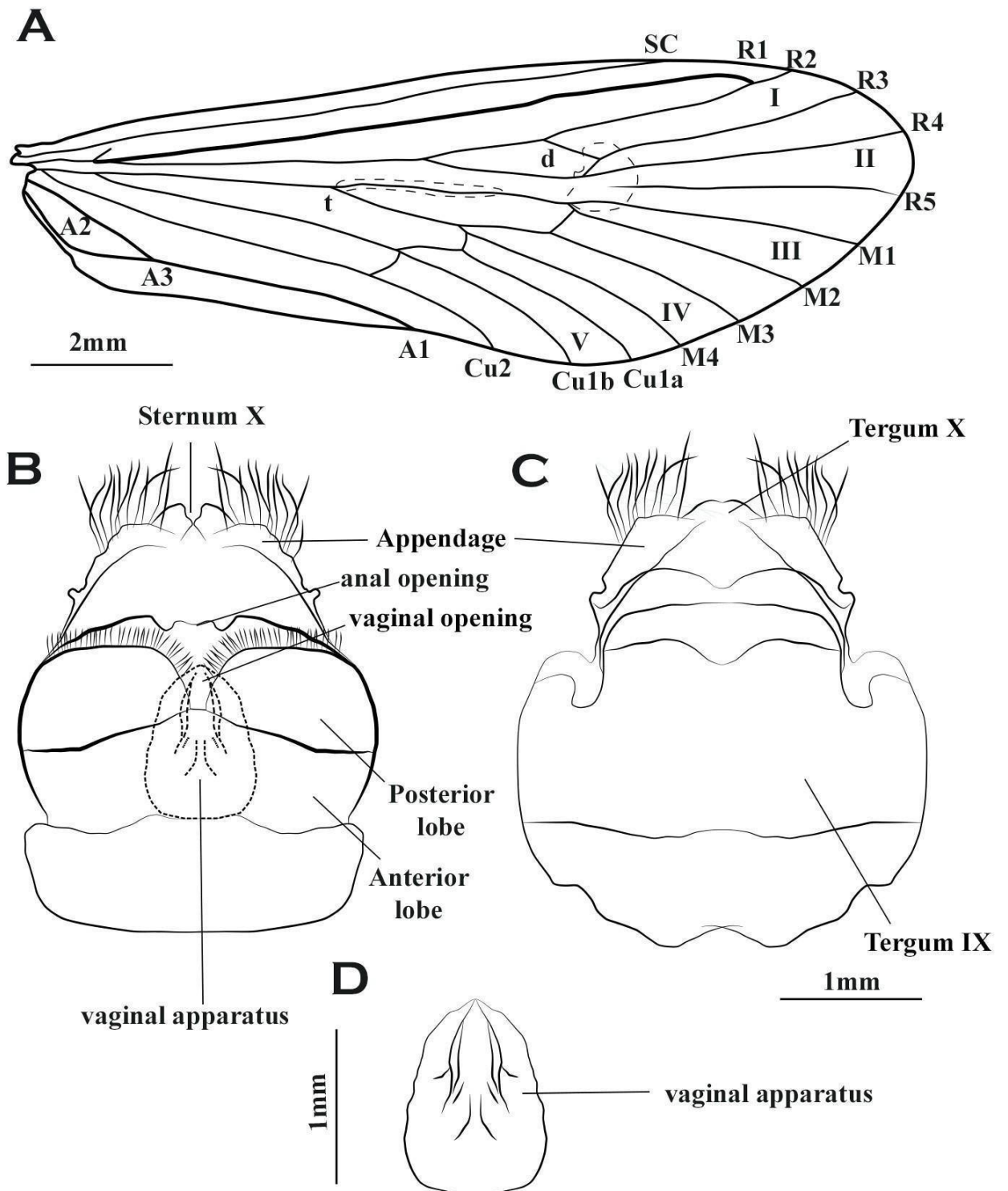


Fig 16. *Phylloicus camboim* **sp. nov.** female. A. wing venation; B. Female genital view ventral; C. Female genital view dorsal; D. Apparatus vaginal.

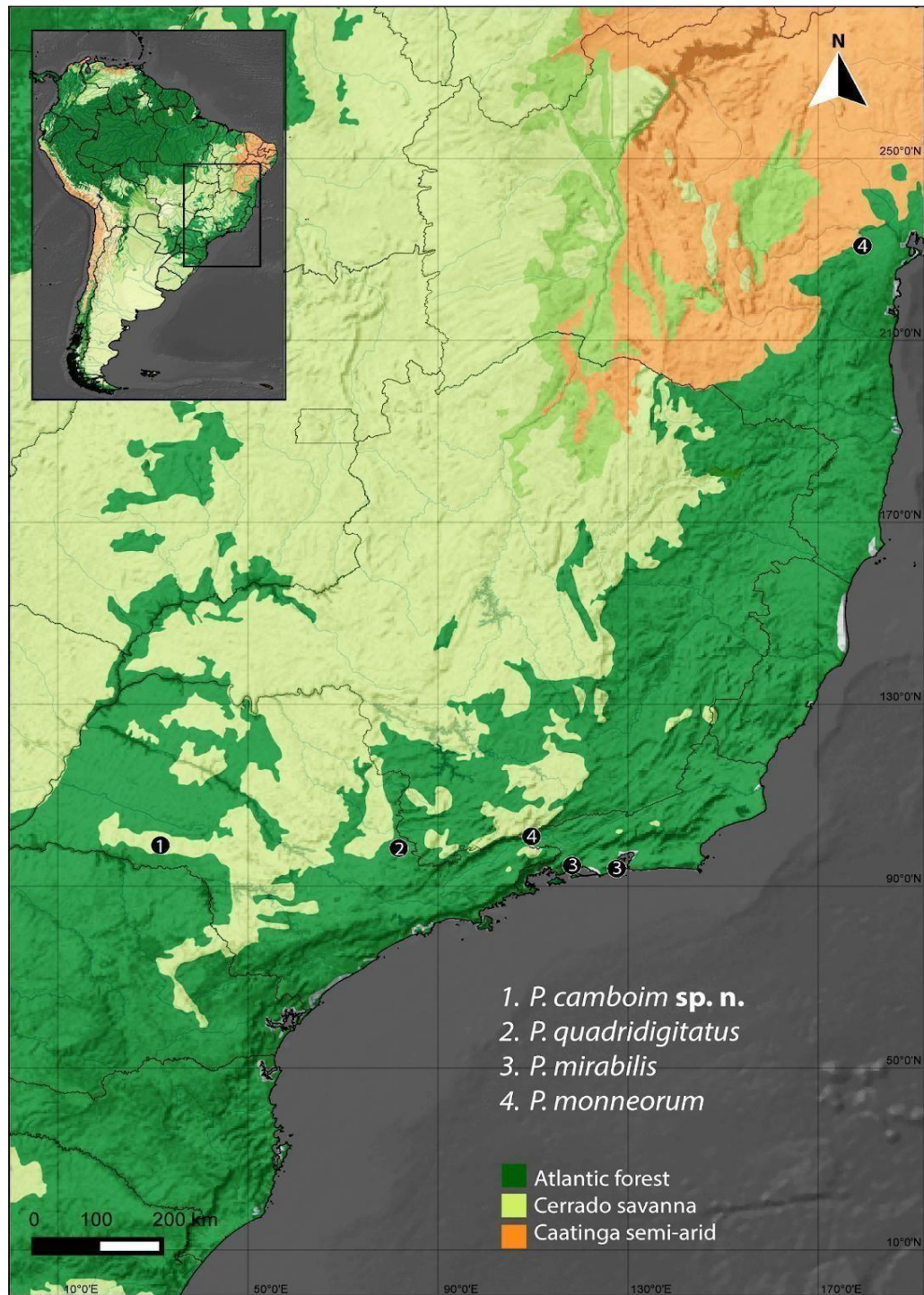


Fig 17. Distribution map of *Phylloicus camboim* sp. n. and similar species that also have the flattened and subtriangular preanal appendage. Ecoregions are highlighted in different colors.

Remarks

The species was collected in riparian habitats at the Estação Ecológica de Assis with

Malaise traps. While the male genital morphology displays unique traits that distinguish it from other species, such as the absence of apical projections on segment X and the specific form of the inferior appendages, it also shares key characteristics with species like *P. quadridigitatus* and *P. mirabilis*.

Discussion

This study contributes to improving the knowledge of *Phylloicus* diversity by reducing the Haeckelian deficit through the description of the immature stages of *Phylloicus angustior*, now 20 species have their larvae described (31% of the currently known diversity) (Holzenthal & Calor 2017, Souza-Holanda et al. 2020). Additionally, the study describes *Phylloicus camboim* (reducing the Linnean shortfall), now the genus has 64 species described (29 in Brazil) and expands the known distribution for *Phylloicus camargoi* within the São Paulo state, since the species was previously known only from the type locality (reducing the Wallacean shortfall). Therefore, the present study reduces important deficits for the São Paulo state *Phylloicus* fauna.

The Trichoptera fauna of the São Paulo state, Brazil, includes nine described species (Calor et al., 2025). However, most of these species are known from specimens found mainly in mountainous areas of the eastern part of the state, which are covered mainly by the Ombrophylus Dense Atlantic Forest. The present study represents the first effort to expand the knowledge of the Trichoptera fauna to the western part of the State of São Paulo, which is covered mainly by Cerrado and Semi Deciduous Stationary Atlantic Forest, seeking to fill the gap in knowledge about the diversity of this highly relevant group of insects.

Acknowledgement

We thank the team at the Laboratory of Aquatic Biology (UNESP-Assis) for their assistance in field collecting and CAPES for their financial support. VPP thanks CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil, - Finance Code 001) for the master's fellowship. AV (grant to FAPESP 2023/01142-5) and GRD (grant to FAPESP 2024/04714-2) thank FAPESP (São Paulo Research Foundation) for postdoctoral fellowships. PCB thanks CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, grant 306400/2022–7) and FAPESP (grant 23/03818-6) for the for financial support.

References

Botosaneanu, L., & Flint, O. S. (1982). On some trichoptera from northern Venezuela and Ecuador (Insecta). *Beaufortia*, 32(2), 13-26.

Calor A.R., Henriques-Oliveira A..L, Quinteiro F.B. (2025). Calamoceratidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Available in: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/10134>. Access on: 13 jan. 2025

Campos, C. M., Desiderio, G. R., Martins, R. T., & Hamada, N. (2023). The Amazonian shredder caddisfly *Phylloicus elektoros* Prather, 2003 (Trichoptera: Calamoceratidae): description of the larva and pupa. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 58(2), 238-249.

Campos, W. A. C., Vieira, T. S. G., & Yamamoto, K. C. (2021). Dieta de sarapós da família sternopygidae em ambientes de praia no Rio Negro, Amazonas. *Revista IberoAmericana de Ciências Ambientais*, 12(2), 482-492.

Carvalho, B. L. D. S. (2023). A fauna de Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta) no Parque Estadual do Lajeado, Tocantins, Brasil .

Cavalcante-Silva, A., Pereira, R., & Calor, A. R. (2022). Caddisflies (Trichoptera) checklist and a new species of *Helicopsyche* von Siebold, 1856, from the Brejo de Altitude de Triunfo, a relict rainforest within the Caatinga domain, Northeast Brazil. *ZooKeys*, 1111, 215.

CBHMP. (n.d.). UGRHI-17 Médio Paranapanema. Retrieved from <https://cbhmp.org/ugrhi-17/>.

Faria, L. R. R., Pie, M. R., Salles, F. F. & Soares, E. D. G. 2021: The Haeckelian shortfall or the tale of the missing semaphoronts. — Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 59: 359–369, <https://doi.org/10.1111/jzs.12435> . Google Scholar

Ferreira, W. R., Macedo, D. R., Ligeiro, R., & Callisto, M. (2015). Influência de habitats fluviais na distribuição da riqueza e na alimentação de macroinvertebrados bentônicos em riachos de cabeceira no Cerrado. XXI Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Brasília-DF.

Holzenthall, R.W.; Calor, A.R. (2017) Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). ZooKeys, v. <https://doi.org/10.3897/zookeys.654.9516> 654, p. 1–566.

Huamantínco, A. A., Dumas, L. L., & Nessimian, J. L. (2005). Description of larva and pupa of *Phylloicus abdominalis* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Calamoceratidae). Zootaxa, 1039(1), 19-26.

Milne L.J. (1936) Studies in North American Trichoptera, 3. Privately printed, Cambridge, Massachusetts, 56–128 pp; Pimentel D.R., Couceiro S.R.M., Salcedo A.K.M. (2020) Diet of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) caddisfly larvae in forest streams of western Pará, central Brazilian Amazonia. Acta Limnol Bras 32:e13. <https://doi.org/10.1590/S2179-425975X0119>

Prather A.L. (2003) Revision of the Neotropical caddisfly genus *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae). Zootaxa 275: 1–214. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.275.1.1>

Quinteiro F.B, Calor A.R., Froehlich CG. (2011) A new species of *Phylloicus* Müller, 1880 (Trichoptera: Calamoceratidae), from southeastern Brazil, including descriptions of larval and pupal stages. Zootaxa 2748: 38–46.

Rueda Martín P.A. (2013) The immature stages of *Phylloicus lituratus* (Trichoptera: Calamoceratidae) with new records of *Phylloicus* and *Banyallarga* species in northwestern

Argentina and southern Bolivia. *Zootaxa* 3669: 321-330.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3669.3.7>

Santos, A.P.M.; Dumas, L.L.; Henriques-Oliveira, A.L.; Souza, W.R.M.; Camargos, L.M.; Calor, A.R. & Pes, A.M.O.. Trichoptera in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. 2021.

Souza-Holanda, P.M., Pes, A.M. and Hamada, N., (2020). Immature stages of three species and new records of five species of *Phylloicus* Müller (Trichoptera, Calamoceratidae) in the northern region of Brazil. *Zootaxa*, vol. 4851, no. 1, pp. 111-136. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4851.1.4> PMID:33056739.

Souza-Holanda, P.M., Pes, A.M. and Hamada, N., (2020). Immature stages of three species and new records of five species of *Phylloicus* Müller (Trichoptera, Calamoceratidae) in the northern region of Brazil. *Zootaxa*, vol. 4851, no. 1, pp. 111-136. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4851.1.4> PMID:33056739.

Tamaris-Turizo, C. E., Pinilla-A, G. A., Guzmán-Soto, C. J., & Granados-Martínez, C. E. (2020). Assigning functional feeding groups to aquatic arthropods in a Neotropical mountain river. *Aquatic Biology*, 29, 45-57.

Ulmer G. (1955) Köcherfliegen (Trichopteren) von den Sunda-Inseln. Teil II. Larven und Puppen der Integripalpia. *Archiv für Hydrobiologie* 21 (Supplement): 408–608.

Ulmer, G. (1905). Neue und wenig bekannte aussereuropäische Trichopteren, hauptsächlich aus dem Wiener Museum. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 20(häft 1), 59-98.

Wantzen, K. M., & Wagner, R. (2006). Detritus processing by invertebrate shredders: a neotropical–temperate comparison. *Journal of the north American benthological society*, 25(1), 216-232.

Capítulo 2- Geometric morphometrics as a tool for species discrimination in *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae)

Vanessa P. Passadori^{1,2}, Marina Miguel ^{1,2}, Albane Vilarino ³ & Pitágoras C. Bispo²

¹Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), FCL, Assis, SP, Brasil. E-mail: vanessa.perondini@unesp.br

²Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Ciências Biológicas, FCL, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, SP, Brasil.

³Laboratório de Sistemática e Biogeografia de Insetos, Departamento de Zoologia, IB, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

ORCID IDs

Vanessa P. Passadori

<https://orcid.org/0009-0006-7632-5962> ***Marina***

Miguel [https://orcid.org/0000-0002-9216-](https://orcid.org/0000-0002-9216-295X)

[295X](https://orcid.org/0000-0003-3912-8928) ***Albane Vilarino*** [https://orcid.org/0000-](https://orcid.org/0000-0003-3912-8928)

Pitágoras C. Bispo [https://orcid.org/0000-](https://orcid.org/0000-0002-7356-8882)
[0002-7356-8882](https://orcid.org/0002-7356-8882)

Abstract

This study employed geometric morphometrics to analyze forewing size and shape variation in *Phylloicus* species, aiming to evaluate its potential as a tool for species discrimination within the genus. Geometric morphometrics is an approach that separately and quantitatively analyzes size and shape variations of specific anatomical structures. In this study, using this approach, forewing centroid size and shape were examined in several *Phylloicus* species to assess whether these variables could provide useful insights for species delimitation and identification. The results revealed significant differences in forewing centroid size and shape among the analyzed species. These results highlight the utility of geometric morphometrics in distinguishing species within *Phylloicus*, contributing to the taxonomic understanding of this diverse and ecologically important group. The application of geometric can include alternative sources of variation to build a more solid taxonomy, particularly for groups with high morphological similarity, where traditional taxonomic methods often have difficulty separating species. Therefore, geometric morphometrics not only can enhance species identification but also provides a more reliable framework for future taxonomic studies.

KEYWORDS

Integrative taxonomy, neotropical biodiversity, species discrimination

Introduction

The definition of species in insects is mainly based on the qualitative analysis of the morphology of the genitalia of adult males. In this context, taxonomic studies in Insecta could include geometric morphometric approaches, seeking to also consider the quantitative analysis of non-articulated morphological structures. Geometric morphometrics enables analysis and visualization of shape changes in complex structures by reducing size variation from the data through superimposition while collecting all features of shape variation (Bookstein 1997). By separating size and shape of selected morphological structures, geometric morphometrics generates new variables that can be integrated with the traditional analysis of male genitalia to delimit and identify species of insects.

This approach has been widely used as an integrative taxonomy tool, and it has been able to distinguish species with high accuracy in the study of many insects' groups (Tatsuta et al., 2018; Zhang et al., 2019; Masonick and Weirauch, 2020; Sauer et al., 2020). The wings have been the most used feature in studies on insects using geometric morphometric, since they have two-dimensional and have a comparable vein pattern, facilitating the acquisition of anatomical landmarks (Tatsuta et al., 2018). In the case of Trichoptera, wing geometric morphometrics was only recently applied in taxonomic studies. For example, this approach was able to distinguish between five species of *Smicridea* McLachlan, 1971 (Annulipalpia: Hydropsychoidea: Hydropsychidae) with a high level of discrimination (above 83 % of correctness) (Sganga et al., 2022). In addition, considering the wing of *Xiphocentron* Brauer, 1870 (Annulipalpia: Psychomyioidea: Xiphocentronidae), this approach was able to correctly assign 73% of the specimens to the corresponding species in a first case with nine species; and 64% of the specimens to the corresponding species in a second case with six species (Vilarino et al. 2024). Therefore, geometric morphometrics has good potential to be applied in the taxonomy of Trichoptera.

Among Trichoptera families, Calamoceratidae Ulmer, 1905 belongs to the superorder Integripalpia, superfamily Leptoceroidea and is worldwide distributed. This family includes nine living genera and about 200 species (Holzenthall & Calor, 2017). In the Neotropical region, we observe the exclusive presence of *Banyallarga* and *Phylloicus* (Holzenthall & Calor, 2017). *Banyallarga* Navás, 1916 has 19 species described (Carvalho, 2023) and *Phylloicus* Müller, 1880 has 63 species described (Campos, 2020). *Phylloicus* exhibits diurnal habits, different from most Trichoptera families (Holzenthall et al. 2015). They have colorful wings with patterns

formed by white, orange, and golden setae or a transparent membrane, sometimes iridescent (Prather, 2003; Rueda-Martín, 2013). The wings are wide, with forewings ranging from 7.0 to 18.5 mm (Prather, 2003). Additional to the different wing colors, in many species, a basal brush of setae is present on the hind wing. This brush varies in length and between the sex; in females, only very short brushes are found (Prather, 2003).

Therefore, *Phylloicus* is a genus with many species, and has visible variation in wing coloration pattern. In Brazil, the genus is represented by 26 species in Brazil (Campos, 2020), some of them with great morphological similarity, this is the case of *P. major* and *P. angustior*, as have been suggested by recent studies (Soares, 2023; Vilarino et al., 2024). In addition, members of the suborder *Integripalpia* have never been analyzed regarding the informativeness of wing shape for species differentiation. Given this, the analysis of the validity of wing size and shape in the separation of *Phylloicus* species may provide important insights into the species delimitation in speciose genera of Trichoptera. In this context, we studied the forewing of nine *Phylloicus* species with the aim of testing whether this source of variation is effective in separating the species of the genus.

Materials and methods

Species studied

In this study, we analyzed 10 male individuals of the following species: *P. bidigitatus* Prather, 2003, *P. fenestratus* Flint, 1974, *P. major* Müller, 1880, *P. obliquus* Navás, 1931, *P. pirapo* Prather, 2003, *P. quadridigitatus* Prather, 2003, *P. abdominalis* Ulmer, 1905, *P. angustior* Ulmer, 1905, and *Phylloicus* n. sp1. The specimens were collected in the Brazilian states of São Paulo, Bahia and Ceará (Fig 1) and were deposited in the Coleção de Insetos

Aquáticos “Prof. Dr. Cláudio Gilberto Froehlich” of the Laboratório de Biologia Aquática (UNESP, Assis) and in the Museu de História Natural da Bahia- UFBA (UFBA, Salvador) (Table 1).

The identification was based on the analysis of the male's genitalia, following studies by Prather (2003). For adult identification, the male genitalia were cleared with 10% KOH at room temperature for two days, stopping the reaction with acetic acid for 5 minutes. After that, the male genitalia were cleaned with 70% alcohol for 30 minutes, followed by 100% alcohol for an additional 30 minutes, then again with 70% alcohol for 30 minutes, and finally fixed in glycerin. The genitalia were dissected with emphasis on the structures of tergites X and XI. This protocol is adapted from Blahnik and Holzenthal (2004).

Table 1-Specimens analyzed in this study. UNESP-Assis: Coleção de Insetos Aquáticos “Prof. Dr. Cláudio Gilberto Froehlich” of the Laboratório de Biologia Aquática (UNESP, Assis); UFBA-Salvador: Museu de História Natural da Bahia- UFBA (UFBA, Salvador).

SPECIES	STATE	MUNICIPALTY	LATITUDE	LONGITUDE	N	DEPOSITORY	TOTAL
<i>P. bidigitatus</i> Prather, 2003	Bahia	Camacan	15°23'02"S	39°33'56"W	5	UFBA-Salvador	10
		Uruçuca	14°26.899'S	39°5.616'W	5	UFBA-Salvador	
<i>P. fenestratus</i> Flint, 1974	Ceará	Barbalha	7°21'59,4"S	39°19'48,8"W	10	UFBA-Salvador	10
<i>P. major</i> Müller, 1880	Bahia	Mucugê	13° 00' 19" S.	41° 22' 15" W	7	UFBA-Salvador	7
<i>P. obliquus</i> Navás, 1931	Bahia	Camacan	15°23'02"S	39°33'56"W	9	UFBA-Salvador	10
		Uruçuca	14°26.899'S	39°5.616'W	1	UFBA-Salvador	
<i>P. pirapo</i> Prather, 2003	Bahia	Salvador	12°58'29"S	38°28'36"W	1	UFBA-Salvador	9
		Senhor do Bonfim	10°27'41" S	40°11'21"w	4	UFBA-Salvador	
	Ceará	Ubajara	03°50'21,2"S	40°54'66,9"W	5	UFBA-Salvador	
<i>P. quadridigitatus</i> Prather, 2003	São Paulo	São Carlos	21°59'S	47°54'W	9	UFBA-Salvador	9
<i>P. abdominalis</i> (Ulmer, 1905)	Santa Catarina	Indaial	26°53'52"S	49°13'55"W	6	UNESP-Assis	9
<i>P. angustior</i> (Ulmer, 1905)	São Paulo	Intervales	24.2857° S	48.4149° W	1	UNESP-Assis	
		Pedregulho	23.5772° S	47.5197° W	1	UNESP-Assis	
		Assis	22.6589° S	50.4164° W	1	UNESP-Assis	
	São Paulo	Assis	22.6589° S	50.4164° W	8	UNESP-Assis	10
	Santa Catarina	Indaial	26°53'52"S	49°13'55"W	2	UNESP-Assis	
<i>P. n. sp.1.</i>	São Paulo	Assis	22.6589° S	50.4164° W	10	UNESP-Assis	10

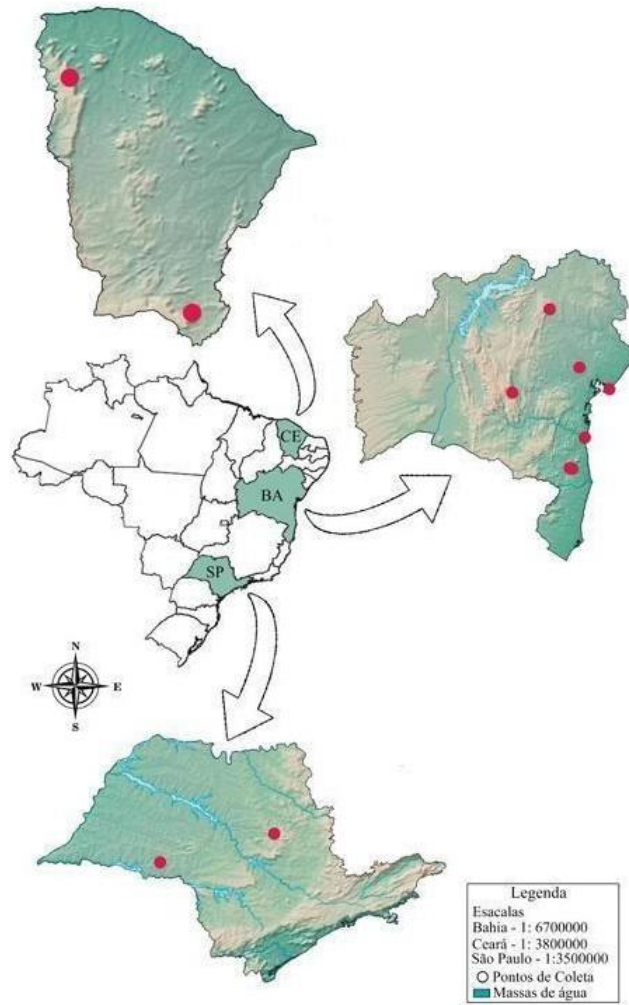


Fig 1- Collection Sites where the specimens studied were sampled.

Preparation of wings and landmark digitization

Using a Leica DM1000 microscope, the right wing was removed from the specimen using forceps and cleaned of its bristles with the aid of a fine-tipped brush, then preserved in 80% alcohol. The wings were photographed using a digital camera (Leica DFC450) on a Leica M205A stereomicroscope. The anatomical landmarks were digitized using TpsDig2 v.2.31 software (Rohlf, 2017), with the intersections or end of veins as references (Fig 2). Differences in scale, position, and orientation were removed using the Procrustes method (Klingenberg, McIntyre, 1998). A total of 10 anatomical landmarks were considered (Fig 2).



Fig 2- Anatomical landmarks selected in the forewing of *Phylloicus* species.

Wing shape and size

The analyses were conducted using the software MorphoJ v1.07a (Klingenberg, 2011). The images for each species were randomly selected and digitized three times by the same user to ensure intra-user repeatability. The analysis of the same image repeated three times by the same user revealed a high intra-observer repeatability value, with a result of 98.2% repeatability. When assessed by different users, there was also a high interobserver repeatability value, achieving a repeatability score of 98%.

Canonical Variate Analysis (CVA) was employed to compare the wing shape in a multivariate space that maximizes species separation (Mitteroecker & Bookstein, 2011). We used Goodall's F to test the variation in wing shape between species. In this case, we used 1000 permutations to test the hypothesis of species difference, considering a significance level of $P < 0.005$. Among the options, Goodall's F was selected because it is supposed to perform better when the sample size is small (Klingenberg & Monteiro, 2005). Our sample of 10 landmarks for 10 individuals and 9 groups is small according to Webster and Sheets (2010). The wing centroid size was determined by the square root of the sum of squared distances from the centroid to each of the landmarks (Bookstein, 1991). We used a one-way ANOVA to test the variation in wing centroid size between species. In case of significant effect, we used the a posteriori test of Tukey.

Results

Variation in Wing Size

Our results revealed significant differences between the wing centroid size of the species (ANOVA, $p < 0.005$, Table 2). Tukey's a posteriori test revealed the following groups, which are sequenced in terms of the wing centroid size: group 1, *P. pirapo*, *P. major* and *P. sp.n.1*; group 2, *P. obliquus*; group 3, *P. angustior*; group 4, *P. abdominalis* e *P. bidigitatus*; and group 5, *P. fenestratus* and *P. quadridigitatus* (Fig 3).

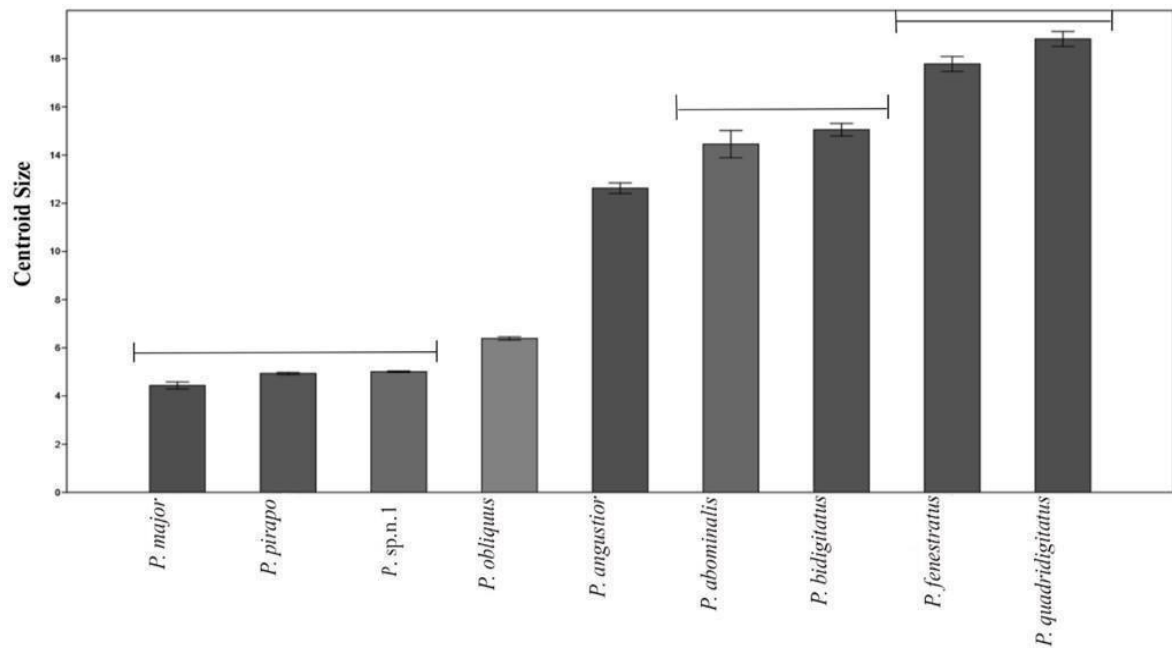


Fig 3: Wing centroid size (mean ± SD) between species of *Phylloicus*. The lines above the bars indicate that there is no statistical difference ($p > 0.05$) between the corresponding species according to the Tukey test.

Table 2: Results of the Analysis of Variance (ANOVA) of the wing centroid size used to test the mean differences among species of *Phylloicus*.

Source of Variation	SS (Sum of Squares)	DF (Degrees of Freedom)	MS (Mean Square)	F	Valor-p	F critical

Between groups	55.226.231,59	8	6.903.278,95	194,80	<0,0001	2,06
Within groups	2.693.320,01	76	35.438,42	-	-	-
Total	57.919.441,60	84	-	-	-	-

Variation in wing shape

The mahalanobis distance between based on the wing shape of *Phylloicus* species is presented in table 3. The wing shape among the species differed from each other (Goodall's F: 30,4347, $p < 0.0001$ to 10000 permutations). The pairwise test on procrustes distances (Goodall's F) indicated significant wing shape differences for all the species except between the following pairs: *P. angustior* x *P. major*; *P. angustior* x *P. abdominalis* and *P. bidigitatus* x *P. obliquus* (Table 4).

Table 3 -Mahalanobis distances between species of *Phylloicus*.

	<i>P. angustior</i>	<i>P. bidigitatus</i>	<i>P. fenestratus</i>	<i>P. major</i>	<i>P. obliquus</i>	<i>P. pirapo</i>	<i>P. abdominalis</i>	<i>P. quadridigitatus</i>
<i>P. bidigitatus</i>	87,622							
<i>P. fenestratus</i>	64,251	82,397						
	31,436	95,467						
<i>P. major</i>	91,954	34,023						
<i>P. obliquus</i>	41,530	88,235	67,669	96,867				
			83,502	57,227	100,500			
<i>P. pirapo</i>	33,462	89,718	81,357	47,913	94,755			
			66,058					
						56,808		
<i>P. abdominalis</i>								
<i>P. quadridigitatus</i>	90,637	85,142	100,581	91,606	97,768	86,192	96,334	
<i>P. sp. 1</i>	97,909	103,672	94,536	100,566	115,322	109,251	92,395	65,862

Table 4- Procrustes distances between species of *Phylloicus*. ns, non-significant differences (Goodall's F, $p < 0.005$ for 10000 permutations).

P. P. P. P. P. P. P. P. angustior bidigitatus fenestratus major obliquus pirapo abdominalis quadridigitatus

<i>P. bidigitatus</i>	0,1304																			
<i>P. fenestratus</i>	0,0480																			
<i>P. major</i>		0,1169																		
<i>P. obliquus</i>	0,0320ns	0,1279	0,0489																	
<i>P. pirapo</i>	0,1423	0,0322ns	0,1270	0,1393																
<i>P. abdominalis</i>	0,0342	0,1380	0,0655	0,0547	0,1547															
<i>P. quadridigitatus</i>	0,0291ns	0,1301	0,0569	0,0379	0,1401	0,0500	0,0907	0,0995	0,0897	0,0907										
<i>P. sp.1</i>	0,1236	0,0873	0,1031																	
	0,0832	0,1400	0,0858	0,0806	0,1588	0,0871	0,0953				0,0564									

The Canonical Variate Analysis (CVA) revealed that along the first axis (36.69%), the species *P.sp.1*, *P. quadridigitatus*, *P. obliquus*, and *P. bidigitatus* separated from *P. fenestratus*, *P. major*, *P. angustior*, *P. pirapo*, and *P. abdominalis*, while the second axis (34.17%) separated *P.sp.1* and *P. quadridigitatus* from [*P. bidigitatus* + *P. obliquus*] (Fig 5). Finally, each of the two groups of species separated on axis 1 also were separated along axis 3 (15.51%), as follows: 1) species *P. sp.1*, *P. bidigitatus* and *P. quadridigitatus* separated from each other, but the scores of *P. obliquus* overlapped with those of the two first species; and 2) *P. fenestratus*, [*P. abdominalis* + *P. angustior* + *P. major*], and *P. pirapo* separated from each other (Fig 6). The wing deformation of *Phylloicus* species in relation to the average is shown in fig 7.

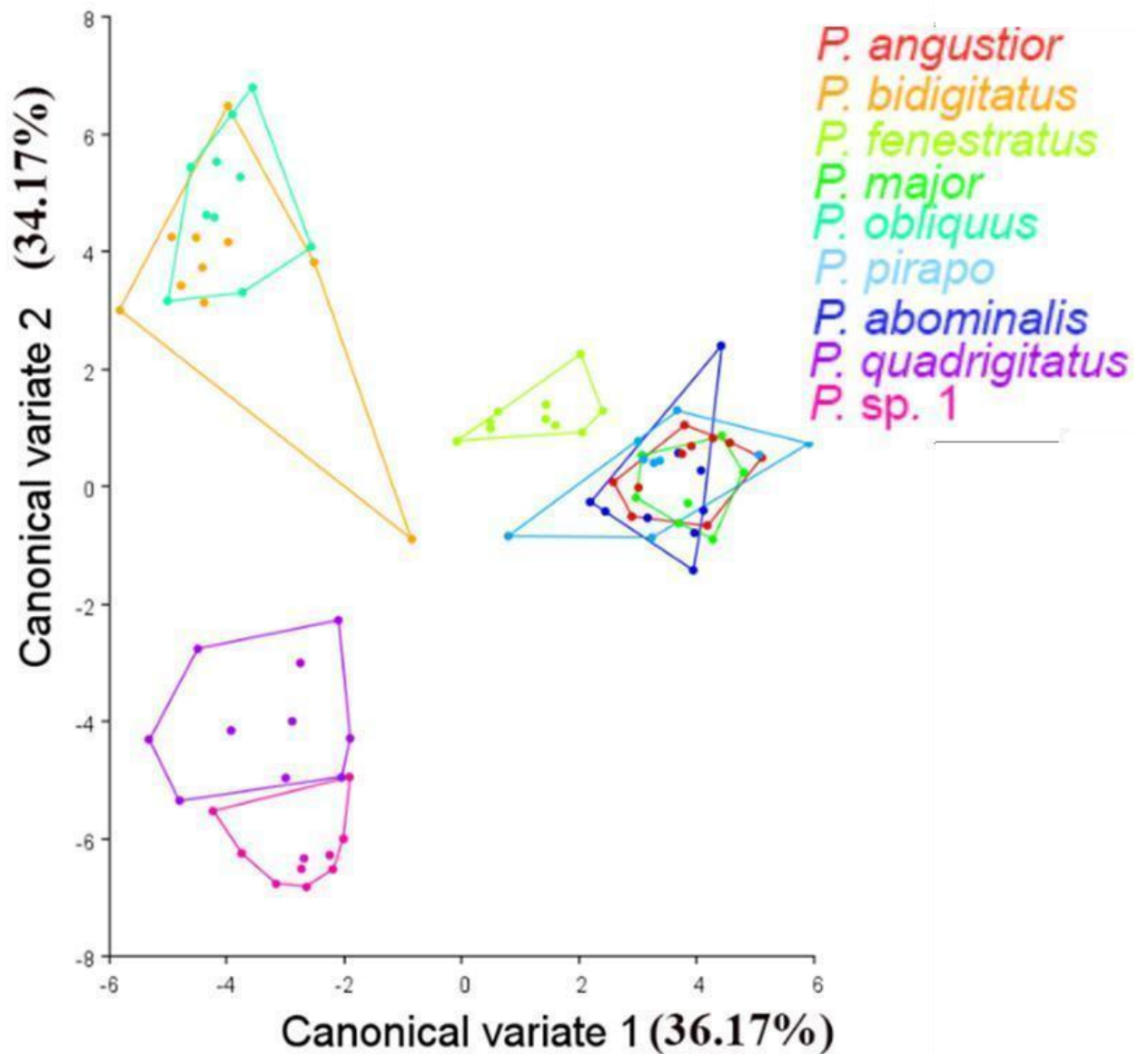


Fig 5- Axis 1 and 2 of Canonical Variates Analysis (CVA) illustrating wing shape variation among species of *Phylloicus*.

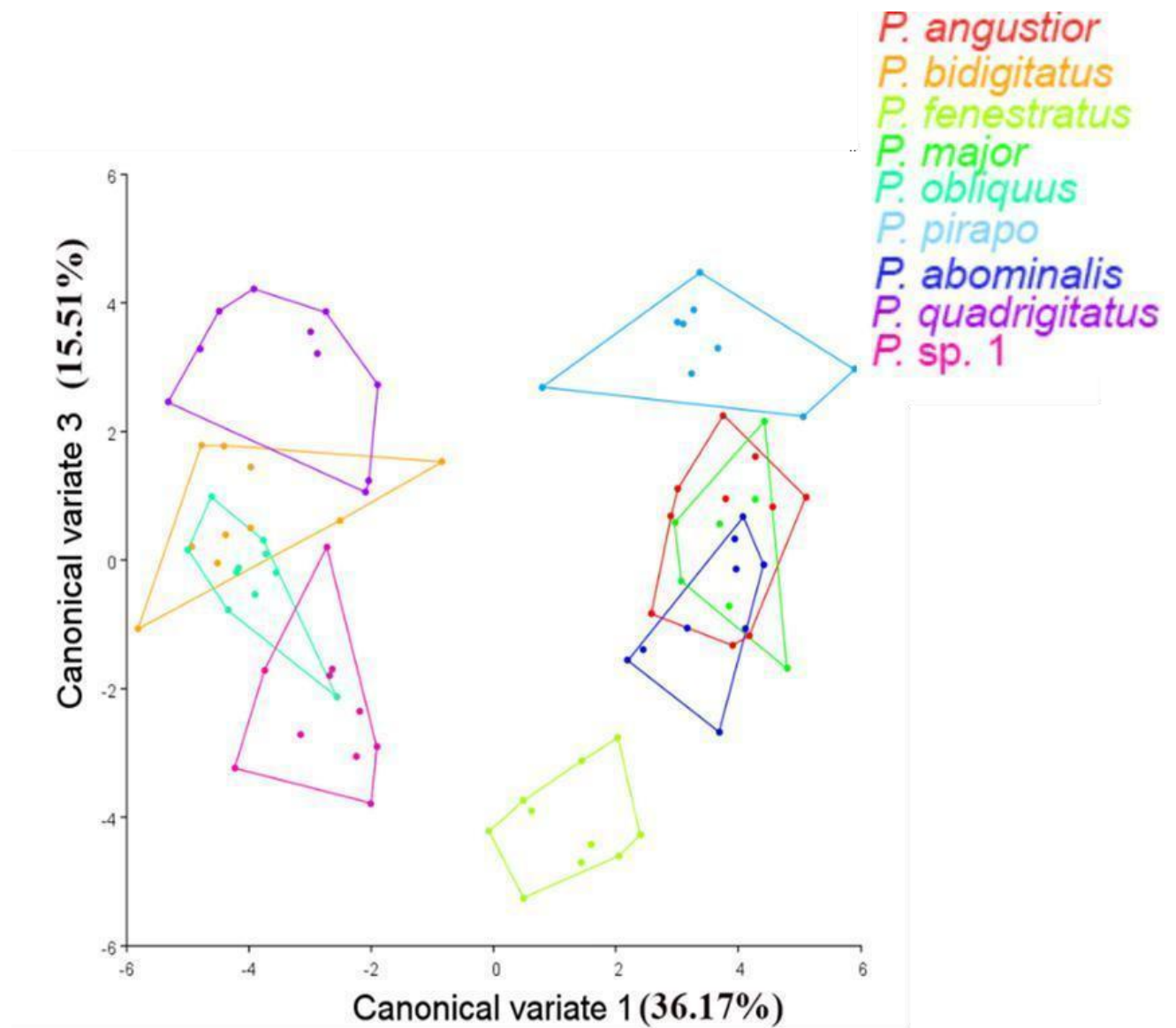


Fig 6- Axis 1 and 3 of Canonical Variates Analysis (CVA) illustrating wing shape variation among species of *Phylloicus*.

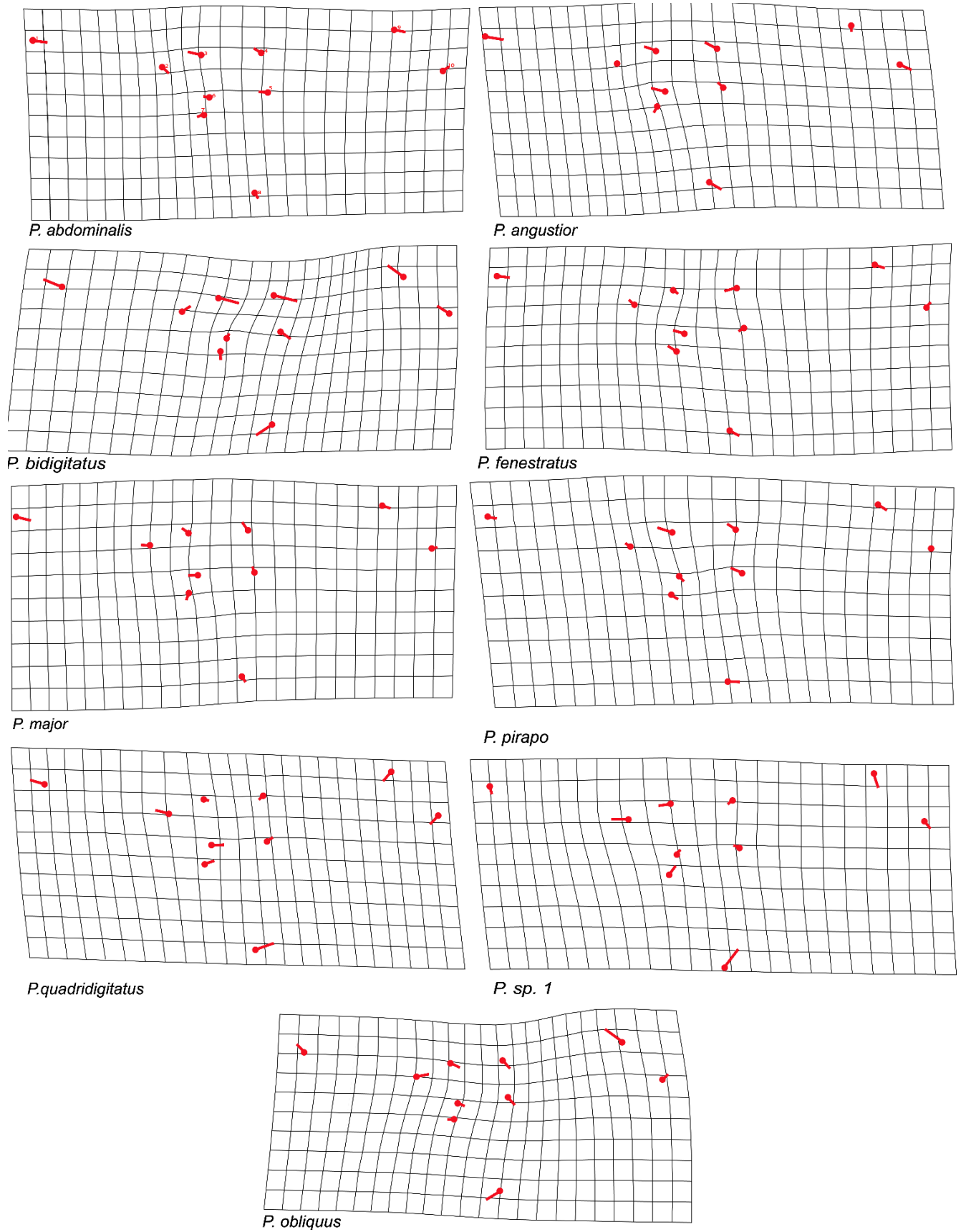


Fig 7- The deformation of the wings of *Phylloicus* species in relation to the average shape.

Discussion

The geometric analysis of the forewings of *Phylloicus* revealed statistically significant differences between the species, both considering the centroid size and shape. It is important to note that those species that were similar in terms of wing centroid size, for example (*P. pirapo*, *P. major* and *P. sp.n.1*), (*P. abdominalis* and *P. bidigitatus*), and (*P. fenestratus* and *P. quadridigitatus*) differed in terms of wing shape. These results indicate that wing size and shape may provide important taxonomic information for the separation of *Phylloicus*. Our results agree with two other studies carried out for Trichoptera (Soares, 2023; Vilarino et al., 2024), which indicate that geometric morphometrics can complement traditional taxonomic studies, that in general are based on the morphological analysis of male genitalia.

Wing shape has been shown to have important taxonomic value for several groups of insects as in studies (Pereira-Rêgo et al., 2011, Laojun et al., 2024, Lozano-Sardaneta et al., 2025, and Smith-Pardo et al., 2025). Considering the validity of wing shape in separating insect species and the ease of analyzing it, it should be used more in taxonomic studies. On the other hand, since geometric morphometrics works with a quantitative approach, there is a need to analyze several specimens that represent the populations or species. This is a difficulty for under sampled or low-density groups. This is the case of Trichoptera since many species of the order are known only from a few specimens. In any case, with the increase in sampling effort and the increase in the number of individuals collected from known species, the geometric morphometric approach may become viable for resolving pending issues of Trichoptera species, including those of *Phylloicus*.

In our view, given the taxonomic history of the order, the morphology of the male genitalia should remain the main criterion for defining species in Trichoptera. However, it is important to consider that the robustness of the validity of a species is greater if more evidence corroborates the hypothesis of its circumscription. Additionally, there are many cases of species with very similar male genitalia, which can generate taxonomic confusion. In this context, an integrative taxonomy can generate a clearer and more robust view of the limits of the species. For example, in the case of *Phylloicus*, geometric morphometrics effectively separated the nine species, since those whose wings did not differ in terms of size differed in terms of shape.

In conclusion, the geometric analysis of forewings in *Phylloicus* was able to separate species, both based on wing size and shape. Therefore, this approach is useful to species delimitation and can complement traditional taxonomic methods. Thus, this study reinforces

the possibility of geometric morphometrics in helping in the taxonomy of Trichoptera. In fact, the present study and others conducted on Trichoptera, such as those by Vilarino et al., 2024 and Sganga et al., 2022, indicate that geometric morphometrics can provide new variables that complement taxonomic studies of the order, which are generally based primarily on the morphology of male genitalia. This strategy can be especially valuable for delimiting wellsampled species that exhibit strong morphological similarity in male genitalia. Additionally, geometric morphometrics can aid in associating males and females based on wing shape, as has already been done for other insect groups (Polihronakis, 2006, Durango-Manrique et al., 2024, Gemmellaro et al., 2024, and Bagbag, 2024,). Given the above, we recommend that the principles of geometric morphometrics should be increasingly incorporated into taxonomic studies of Trichoptera.

Acknowledgement

We thank the team at the Laboratory of Aquatic Biology (UNESP-Assis) for their assistance in field collecting and CAPES for their financial support. VPP thanks CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil, - Finance Code 001) for the master's fellowship. AV (grant to FAPESP 2023/01142-5) thank FAPESP (São Paulo Research Foundation) for postdoctoral fellowship. PCB thanks CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, grant 306400/2022-7) and FAPESP (grant 23/03818-6) for the for financial support.

References

- Bookstein F.L. (1991) Thin-plate splines and the atlas problem for biomedical images Biennial International Conference on Information Processing in Medical Imaging, Springer, pp. 326-342
- Bookstein, F. L. (1997). Shape and information in medical images: A decade of morphometric synthesis. *Computer vision and image understanding*, 66(2), 97-118.
- Campos, C. (2020). Taxonomia e o efeito do aumento da temperatura e dióxido de carbono (CO₂) sobre imaturos de *Phylloicus* Müller 1880 (Trichoptera: Calamoceratidae) da Amazônia Central.
- Carvalho, B. L. D. S. (2023). A fauna de Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta) no Parque Estadual do Lajeado, Tocantins, Brasil.
- Holzenthal, R. W., & Calor, A. R. (2017). Catalog of the Neotropical Trichoptera (caddisflies). *ZooKeys*, (654), 1.
- Holzenthal, R. W., Thomson, R. E., & Ríos-Touma, B. (2015). Order trichoptera. In Thorp and Covich's freshwater invertebrates (pp. 965-1002). Academic Press.
- Klingenberg, C. P., & Monteiro, L. R. (2005). Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*, 54(4), 678-688.
- Masonick, P., & Weirauch, C. (2020). Integrative species delimitation in Nearctic ambush bugs (Heteroptera: Reduviidae: Phymatinae): insights from molecules, geometric morphometrics and ecological associations. *Systematic Entomology*, 45(1), 205-223.

Mitteroecker, P., & Bookstein, F. (2011). Linear discrimination, ordination, and the visualization of selection gradients in modern morphometrics. *Evolutionary Biology*, 38, 100-114.

Prather, A. L. (2003). Revision of the neotropical caddisfly genus *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) (Vol. 275, pp. 1-214). Auckland: Magnolia Press.

Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, 299-316.

Rueda Martin, P. A. (2013). The immature stages of *Phylloicus lituratus* (Trichoptera: Calamoceratidae) with new records of *Phylloicus* and *Banyallarga* species in northwestern Argentina and southern Bolivia.

Sauer, F. G., Jaworski, L., Erdbeer, L., Heitmann, A., Schmidt-Chanasit, J., Kiel, E., & Lühken, R. (2020). Geometric morphometric wing analysis represents a robust tool to identify female mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Germany. *Scientific reports*, 10(1), 17613.

Sganga, J. V., Sganga, D. E., & Iglesias, M. S. (2022). Review and redescription of species in the *brasiliana* group of *Smicridea* (*Rhyacophylax*) (Trichoptera, Hydropsychidae, Smicrideinae): exploration of the utility of geometric morphometrics as a method for delimitation and characterization of species in the genus. *ZooKeys*, 1111, 389.

Soares, H. M. (2023). Aumento de assimetria flutuante induzido por rejeito de mineração em *Smicridea* (*Rhyacophylax*) *coronata* (Trichoptera).

Tatsuta, H., Takahashi, K. H., & Sakamaki, Y. (2018). Geometric morphometrics in entomology: Basics and applications. *Entomological Science*, 21(2), 164-184.

Ulmer, G. (1905). Neue und wenig bekannte aussereuropäische Trichopteren, hauptsächlich aus dem Wiener Museum. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 20(häft 1), 59-98.

Vilarino, A., Sganga, J. V., & Bispo, P. C. (2024). The utility of forewing geometric morphometrics for species discrimination in the caddisfly genus *Xiphocentron* (Trichoptera: Xiphocentronidae), with the description of six new species. *Zoologischer Anzeiger*, 309, 37-54.

Webster, M. A. R. K., & Sheets, H. D. (2010). A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. *The paleontological society papers*, 16, 163-188.

Zhang, M., Ruan, Y., Wan, X., Tong, Y., Yang, X., & Bai, M. (2019). Geometric morphometric analysis of the pronotum and elytron in stag beetles: insight into its diversity and evolution. *ZooKeys*, 833, 21.

Conclusões gerais

Os nossos resultados destacam a relevância de ampliar as amostragens com o objetivo de reduzir os deficits de diversidade em Trichoptera. Neste contexto, a descrição de *Phylloicus camboim* sp. nov., a associação de estágios imaturos e adultos de *P. angustior* e a distribuição geográfica expandida de *P. camargoi* representam contribuições para a redução dos déficits Linneano, Haeckeliano e Wallaceano, respectivamente. Além disso, o estudo destacou a importância de esforços de amostragem em regiões pouco exploradas, como a região oeste do Estado de São Paulo, para ampliar o conhecimento da ordem Trichoptera. Esses resultados enfatizam a necessidade de continuar explorando ecossistemas neotropicais, particularmente aqueles sob crescente pressão antropogênica, como um meio de documentar e preservar sua biodiversidade.

Adicionalmente, o estudo demonstrou o potencial de ferramentas alternativas para superar os desafios impostos pela alta diversidade e similaridade morfológica de grupos de Trichoptera. Neste contexto, a abordagem da morfometria geométrica, que permitiu a separação da variação do tamanho e da forma da asa, foi capaz de separar as espécies de *Phylloicus*. Portanto, essa abordagem quantitativa pode ser usada como complemento em estudos taxonômicos. A integração do tamanho e forma de estruturas específicas com a morfologia da genitália masculina pode facilitar a delimitação das espécies, reduzindo dificuldades taxonômicas e facilitando a identificação.

Concluindo, a busca por estratégias complementares para avaliar a variabilidade intra e interespecífica pode auxiliar a construir uma taxonomia mais sólida, uma vez que permite a delimitação e definição de espécies considerando múltiplas fontes de evidência. Neste contexto, a morfometria geométrica pode fornecer dados relevantes para compor o conjunto de variáveis úteis na circunscrição das espécies. Atualmente, estudos taxonômicos, incluindo aqueles que buscam avaliar o uso de ferramentas são essenciais, uma vez que a rápida identificação pode ajudar a monitorar as espécies em um momento em que há uma forte intensificação de mudanças ambientais globais e perda de biodiversidade. Apenas dessa forma, será possível estabelecer estratégias efetivas de conservação.

Referências gerais

Biasi, C.P. Rendimento e Eficiência no Desdobro de Três espécies tropicais [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Calor, A.R. (2007). Order Trichoptera Kirby 1813 (Arthropoda: Insecta). In Guia on-line de identificação de larvas de insetos aquáticos do Estado de São Paulo. Available at: http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/index_trico

Carvalho, B.L.S., Desidério, G.R., Pes, A.M., Hamada, N. 2023. Discovery of Banyallarga Navás, 1916 (Trichoptera: Calamoceratidae) in Brazil: a new species and an updated identification key to the subgenus *Histricoverpa* Prather, 2004. *Annales Zoologici*, 73: 161–169. doi: 10.3161/00034541ANZ2023.73.2.00

Constantino, R. (2024). Capítulo 5: A importância dos insetos. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. 2ª ed.

Da Rosa Pires, J., Lisboa, L. K., Da Silva, A. L. L., Petrucio, M. M., & Siegloch, A. E. (2015). Levantamento taxonômico e caracterização do hábitat de insetos aquáticos em Unidades de Conservação de uma ilha subtropical. *Biotemas*, 28(3), 57-67.

De Moor F.C., Ivanov, V.D. (2008). Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595:393–407. 9113-2

Faria, L.R.R., Pie, M.R., Salles, F;F., Soares, E.D.G. (2021) The Haeckelian shortfall or the tale of the missing semaphoronts. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 59, p. 359–369... <https://doi.org/10.1111/jzs.1243>

Francoy, T. M., Prado, P. R. R., Gonçalves, L. S., da Fontoura Costa, L., & De Jong, D. (2006).

Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie*, 37(1), 91-97.

Frandsen, P. B., Holzenthal, R. W., Espeland, M., Breinholt, J., Thomas Thorpe, J. A., Simon, S. & Zhou, X. (2024). Phylogenomics recovers multiple origins of portable case making in caddisflies (Insecta: Trichoptera), nature's underwater architects. *Proceedings of the Royal Society B*, 291(2026), 20240514 <https://doi.org/10.1098/rspb.2024.0514>.

Fornel, R., & Cordeiro-Estrela, P. (2012). Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20*, 101-120.

Ge, X., Peng, L., Morse, J. C., Wang, J., Zang, H., Yang, L., ... & Wang, B. (2024). Phylogenomics resolves a 100-year-old debate regarding the evolutionary history of caddisflies (Insecta: Trichoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 201, 108196. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108196>

Henriques-Oliveira, A. L., Dumas, L. L., & Nessimian, J. L. (2020). Leptoceroidea (Insecta: Trichoptera: Integripalpia) from Serra do Caparaó, Southeast Brazil, including a new species of *Atanatolica* Mosely (Leptoceridae). *Zootaxa*, 4763(1), 31-49.

Holzenthal, R.W., Calor, A.R. (2017) Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). *ZooKeys*.;654:1–566, <https://doi.org/10.3897/zookeys.654.9516>

Holzenthal, R.W., Blahnik, R.J., Prather, A.L. & Kjer, K.M. (2007). Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), caddisflies. In *Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy*. (Z. Q. Zhang & W. A. Shear, eds). *Zootaxa* 1668:639-698.

Hortal, J., Bello, F., Diniz-Filho, J.A.F., Lewinsohn, T.M., Lobo, J.M., Ladle, R.J. (2015).

Seven Shortfalls that Beset Large-Scale Knowledge of Biodiversity. *Ann Rev Ecol Evol Syst.*;46:523–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054400>

Karaouzas, I., Zamora-Muñoz, C., Bariáin, M. S., Waringer, J., & Holzenthal, R. W. (2024). Order Trichoptera. In *Identification and Ecology of Freshwater Arthropods in the Mediterranean Basin* (pp. 437-501). Elsevier.

Li, X., & Wiens, J. J. (2023). Estimating global biodiversity: the role of cryptic insect species. *Systematic Biology*, 72(2), 391-403.

Malm, T., Johanson, K.A., Wahlberg, N. (2013). The evolutionary history of Trichoptera (Insecta): A case of successful adaptation to life in freshwater. *Systematic Entomology*, v. 38, p. 459–473. <https://doi.org/10.1111/syen.12016>

Mesquita, J. D. A. (2023). Avanços em taxonomia de insetos: da metodologia tradicional à integrativa.

Morse, J.C.(2021). Trichoptera World Checklist. <http://entweb.clemson.edu/database/trichopt/index.htm> (accessed 15 Mar 2022).

Morse, J.C., Frandsen, P.B., Graf, W., & Thomas, J.A. (2019). Diversity and Ecosystem Services of Trichoptera. *Insects*, 10, 100–125. <https://doi.org/10.3390/insects10050125>

Mutanen, M., & Pretorius, E. (2007). Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*, 32(2), 371-386.

Orlofske, J. M., & Baird, D. J. (2014). Incorporating continuous trait variation into biomonitoring assessments by measuring and assigning trait values to individuals or taxa. *Freshwater Biology*, 59(3), 477-490.

Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7, 1-14.

Paprocki, H., & Silva, L. M. (2024). Capítulo 32: Trichoptera Kirby, 1813. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 2ª ed.

Pereira, R. (2023). Sistemática e biogeografia de Helicopsychidae do Novo Mundo (Trichoptera): desafios no enfrentamento dos déficits de conhecimento da biodiversidade. Tese Não publicada. Disponível em: repositorio.ufba.br/handle/ri/39912 Acesso em fev. 2025.

Prather, A.L. (2003). Revision of the neotropical caddisfly genus *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae). *Zootaxa*. 275: 1-214.

Rafael, J. A., Melo, G. A., de Carvalho, C. J., Casari, S. A., & Constantino, R. (2024). Apresentação: A diversidade de insetos no Brasil. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 2ª ed.

Rueda Martín PA. (2013) The immature stages of *Phylloicus lituratus* (Trichoptera: Calamoceratidae) with new records of *Phylloicus* and *Banyallarga* species in northwestern Argentina and southern Bolivia. *Zootaxa* 3669: 321–330.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3669.3.7>

Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., & Crozier, R. H. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual review of entomology*, 55(1), 421-438.

Sganga, J. V., Angrisano, E. B., & Iglesias, M. S. (2025). Diversity of Trichoptera (Insecta) in protected and unprotected areas of the Argentinian Parana and Araucaria Forest provinces. *Journal of Insect Conservation*, 29(1), 6.

Sganga, J. V., Sganga, D. E., & Iglesias, M. S. (2022). Review and redescription of species in the *brasiliensis* group of *Smicridea* (*Rhyacophylax*) (Trichoptera, Hydropsychidae, Smicrideinae): exploration of the utility of geometric morphometrics as a method for delimitation and characterization of species in the genus. *ZooKeys*, 1111, 389.

Silva, E. F. D. (2015). Influência da altitude na diversidade e distribuição de insetos da caatinga na Serra da Engabelada, Paraíba (Nordeste do Brasil).

Silva-Pereira, E. (2024). Contribuição para o conhecimento taxonômico de *Brevitentoria* Weaver, 1984 (Trichoptera: Integripalpia) no Cerrado do Distrito Federal, Brasil.

Dissertação não publicada. Disponível em:
<https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/40442>. Acesso em: fev. 2025.

Sawyer, D., Mesquita, B., Coutinho, B., de Almeida, F. V., Figueiredo, I., & Eloy, L. (2018). Perfil do Ecossistema: Hotspot de biodiversidade do cerrado.

Soares, H. M. (2023). Aumento de assimetria flutuante induzido por rejeito de mineração em *Smicridea* (*Rhyacophylax*) *coronata* (Trichoptera). Dissertação não publicada. Disponível em:
<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/72587> Acesso em: fev. 2025.

Tatsuta H, Takahashi KH, Sakamaki Y (2018) Geometric morphometrics in entomology: Basics and applications. *Entomological Science* 21(2): 164–184.

Thimótheo, M. G. R. (2022). Morfometria geométrica de *Plesiopoma curvidens*

(Siluriformes: Loricariidae), com comentários a respeito da evolução da forma do corpo em Hypoptopomatinae. Trabalho de conclusão de curso não publicado. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/2d726cce-2daa-40aa-87b059c163717826> Acesso em: fev. 2025.

Thomas JA, Frandsen PB, Prendini E, Zhou X, Holzenthal RW. (2020) A multigene phylogeny and timeline for Trichoptera (Insecta). *Syst Entomol.* 45 : 670–686.
<https://doi.org/10.1111/syen.12422>

Vilarino, A., & Calor, A. R. (2024). Comparative geometric morphometrics of male genitalia in *Xiphocentron* subgenera (Trichoptera: Xiphocentronidae): new species, revision and phylogenetic systematics of the subgenus *Sphagocentron*. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 82, 407-431.

Vilarino, A., Sganga, J. V., & Bispo, P. C. (2024). The utility of forewing geometric morphometrics for species discrimination in the caddisfly genus *Xiphocentron* (Trichoptera: Xiphocentronidae), with the description of six new species. *Zoologischer Anzeiger*, 309, 37-54.

Wiggins, G.B. (2004). *Caddisflies: The Underwater Architects*; University of Toronto Press: Toronto, ON, Canada; Buffalo, NY, USA; London, UK; 292p, ISBN 0-8020-3714-3.

Weaver, J.S., III. (1984) The evolution and classification of Trichoptera. Part I: the groundplan of Trichoptera. In: Morse, J.C. (Ed.) *Proceedings of the 4th International Symposium on Trichoptera*. Dr. W. Junk, The Hague, pp. 413–419.