



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

JÚLIA FOCHEZATO

Biologia de microlepidópteros (*Gracillariidae*) associados a *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Neveling (*Thymelaeaceae*) e *Psychotria suterella* Müll. Arg. (*Rubiaceae*) na Mata Atlântica.

PORTOALEGRE
2018

JÚLIA FOCHEZATO

Biologia de microlepidópteros (Gracillariidae) associados a *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Neveling (Thymelaeaceae) e *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae) na Mata Atlântica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador(a): Prof. Dr. Gilson R. P. Moreira

PORTO ALEGRE
2018

JÚLIA FOCHEZATO

Biologia de microlepidópteros (Gracillariidae) associados a *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Neveling (Thymelaeaceae) e *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae) na Mata Atlântica.

Aprovada em ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Héctor A. Vargas

Profa. Dra. Paula Beatriz de Araujo

Dra. Rosângela Brito

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais Genírio e Damaris pelo apoio em todos os momentos da minha formação escolar e acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilson R. P. Moreira por me aceitar como aluna no seu laboratório. Obrigada por toda paciência e compreensão e por me ensinar a nunca desistir dos meus objetivos. A Dra. Gislene L. Gonçalves pela colaboração nesse trabalho, sempre disposta em sanar minhas dúvidas. A Dra. Rosângela Brito por todas as orientações e dias destinados a revisão dos manuscritos.

Aos meus queridos amigos Carolina e Daniel que me acolheram desde a minha chegada em Porto Alegre tornando meus finais de semana sempre agradáveis e cheios de risadas.

Aos meus colegas do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI), Gabriela, Cristiano, Pedro e Sofia e também aos ex-colegas Luan e José por toda ajuda e por todos momentos que passamos juntos.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal pelos ensinamentos durante as disciplinas, assim como os funcionários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus ex-professores da Universidade de Caxias do Sul (UCS), em especial a Gládis F. da Cunha, Raquel Balestrin e Wilson S. Azevedo Filho que me apoiaram e incentivaram durante a escolha de permanecer na vida acadêmica.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	6
Referências	8
CAPÍTULO II	10
<i>Phyllocnistis hemera</i> sp. nov. (Lepidoptera: Gracillariidae): a new species of leaf-miner associated with <i>Daphnopsis fasciculata</i> (Thymelaeaceae) in the Atlantic Forest.....	11
Abstract	11
Keywords	11
Introduction	11
Material and methods	12
Results	12
Discussion	18
Acknowledgements	18
References	19
Supplementary Material	20
CAPÍTULO III	21
Descrição dos estágios imaturos e história de vida de uma nova espécie da Oecophyllembiinae (Lepidoptera: Gracillariidae) da Mata Atlântica.	21
Introdução	22
Materiais e métodos	23
Resultados	25
Discussão	29
Referências bibliográficas	30
Legendas das figuras	32
Tabelas	35
Figuras	37

CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
CAPÍTULO V - ANEXOS	47
Normas para publicação na Revista Brasileira de Entomologia	47
Normas para publicação na Revista Austral Entomology	51

RESUMO

Gracillariidae (Lepidoptera), embora ainda pouco estudada, é considerada a maior família de microlepidópteros minadores de folhas. Esses insetos, cujo tamanho não ultrapassa 10 mm de envergadura, chamam atenção pelas cores brilhantes e pelo desenvolvimento hipermetamórfico. Este trabalho teve o objetivo de descrever os estágios imaturos de duas novas espécies de gracilarídeos para a região Neotropical, associadas a duas hospedeiras distintas: *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Neveling (Thymelaeaceae) e *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), cujas populações são encontradas no município de São Francisco de Paula, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As descrições e ilustrações tiveram como base a microscopia óptica e eletrônica de varredura. A anatomia das minas também foi explorada através de cortes histológicos. Análises filogenéticas com base em DNA mitocondrial (COI) incluindo espécies congênicas, também foram conduzidas, e revelaram uma grande magnitude de divergência genética entre as linhagens (de 23 a 30%). Embora pertencentes a subfamílias distintas (Phyllocnistinae e Oecophyllembiinae, respectivamente) ambas apresentam os primeiros instares do tipo *sap-feeding*, cuja larva é achatada e com aparelho bucal prognato, adaptado para dilacerar os tecidos foliares e possibilitar a ingestão de fluidos. A seguir na ontogênese, ambas apresentam também um ínstar do tipo *spinning*, cuja larva não se alimenta e possui as estruturas bucais atrofiadas, com exceção do espinerete usado para tecer o casulo pupal. A primeira espécie, encontrada em *D. fasciculata*, alimenta-se de tecido subepidérmico no primeiro ínstar, passando para o parênquima paliçádico nos demais instares. Já a segunda espécie, associada a *P. suterella*, alimenta-se de parênquima paliçádico durante todo o seu desenvolvimento. Estes gracilarídeos destacam-se por serem, respectivamente, o primeiro registro em Thymelaeaceae em nível mundial e o primeiro Oecophyllembiinae assinalado para o Brasil.

ABSTRACT

Although little studied yet, Gracillariidae (Lepidoptera) is the largest family of leaf-miner microlepidoptera. Their size does not exceed 10 mm (wingspan), but call the attention due to their brilliant color and by having hypermetamorphic development. The main goal of this study was to describe the immature stages of two new gracillariid species for the Neotropical region, associated with distinct host plants: *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Neveling (Thymelaeaceae) and *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), from populations located in the São Francisco de Paula municipality, Rio Grande do Sul state, Brazil. Descriptions and illustrations were based on optical and scanning electron microscopies. The mine anatomy was explored by performing histologic sections. Phylogenetic analyses based on mitochondrial DNA (COI) including congeneric species were also conducted, and revealed a great magnitude of divergence among lineages (from 23 to 30% of genetic distance). Although belonging to different subfamilies (Phyllocnistinae and Oecophyllembiinae, respectively), both species present sap-feeding instars, in which the larvae is dorso-ventrally flattened and prognathous, adapted to lacerate leaf tissue and ingest fluids. Afterwards in ontogeny, both also present a spinning instar, a non-feeding morphotype bearing atrophied mouth parts, except the spinneret used to build the pupal cocoon. The first species, found on *D. fasciculata* feeds on subepidermic tissue during the first instar, changing to palisade parenchyma during other instars. The second species, associated with *P. suterella* feeds on palisade parenchyma throughout its development. These gracillariid species account respectively for the world record on Thymelaeaceae and the first Oecophyllembiinae to be found in Brazil.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Minas são canais ou galerias formados por larvas de insetos herbívoros dentro de tecidos das plantas, como parênquima ou epiderme, o qual fornece alimento e abrigo para as larvas (Hering, 1951). As minas podem ser construídas por representantes de quatro ordens de insetos: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera (Sinclair & Hugues, 2010). Podem ser classificadas quanto à forma, por exemplo: minas serpenteantes, lineares, em forma de manchas ou blocos e digitadas; além disso, seu formato pode auxiliar na identificação tanto em nível genérico quanto específico (Moore, 1966). Alguns microlepidópteros podem passar todo o estágio larval dentro de uma única mina, em um grande número de angiospermas (De Prins & De Prins, 2018). Algumas dessas espécies estão associadas a hospedeiras de interesse econômico, tais como *Citrus* sp., *Coffea* sp., *Malus* sp. e *Theobroma* sp. (Sinclair & Hugues, 2010; De Prins & Kawahara, 2012).

Gracillariidae é considerada a principal família de microlepidópteros minadores e apresenta aproximadamente 1950 espécies no mundo, com exceção da Antártica. Destas, em torno de 180 foram descritas para a região Neotropical e apenas 38 para o Brasil (Brito e Duarte, 2018; De Prins & De Prins, 2018). Brito et al. (2016) estimaram que no Neotrópico esse número possa ser até 20 vezes maior, o que reflete o baixo esforço amostral de espécimes coletados na região. São várias as dificuldades no estudo do grupo, sendo considerada a principal o tamanho reduzido dos adultos, que pode variar de 2-10 mm de envergadura de asa (Davis, 1987). Recentemente, Kawahara et al. (2017) propuseram a divisão de Gracillariidae em oito subfamílias com base em caracteres moleculares: Lithocolletinae Stainton, 1854, Acrocercopinae Kawahara & Ohshima, 2017, Phyllocnistinae Herrich-Schäffer, 1857, Marmarinae Kawahara & Ohshima, 2017, Oecophyllembiinae Réal & Balachowsky, 1966, Gracillariinae Stainton, 1854, Parornichinae Kawahara & Ohshima, 2017 e Ornixolinae Kuznetsov & Baryshnikova, 2001.

O ciclo de vida é a característica mais marcante dessa família. Os ovos podem ser depositados na superfície adaxial ou abaxial da folha na planta hospedeira (Sinclair & Hugues, 2010). Após a eclosão, a larva entra em contato com a epiderme da planta, por onde penetra dando início a alimentação e a construção da mina (Davis, 1987). As larvas

apresentam hipermetamorfose, ou seja, transformações larvais morfológicas ao longo da ontogênese. Assim, podem ser divididas em três tipos morfológicos que podem variar de acordo com a espécie: 1) larva *sap-feeding* (primeiros ínstaes), é caracterizada pela cabeça prognata com peças bucais adaptadas à dilaceração de tecidos e ingestão de líquidos; cabeça e corpo achatados com pernas e pseudopódios reduzidos ou, na maioria dos casos, ausentes; 2) larva *tissue feeding*, apresenta cabeça hipognata com peças bucais do tipo mastigadora; cabeça e corpo cilíndrico com pernas e pseudopódios geralmente presentes, sendo esse último, presente do terceiro ao quinto e no décimo segmento abdominal; 3) larva *spinning*, também conhecida como pré-pupa, caracterizada pelo aparelho bucal atrofiado apresentando somente o espinerete funcional, utilizado na construção do casulo. Esse último morfotipo é característico de *Phyllocnistis* Zeller, mas pode ser encontrado também em algumas espécies dos gêneros: *Marmara* Clemens, *Cameraria* Chapman, *Metriochroa* Busck e *Chrysaster* Kumata (Kumata, 1978). No entanto, Brito et al. (2013) descreveram o primeiro gracilarídeo desprovido de ínstaes *sap-feeding*.

As espécies do grupo têm uma grande variação quanto a história de vida. Podem utilizar para a construção da mina, além de tecidos foliares, flores e frutos, podendo alterar sua forma de alimentação durante o seu desenvolvimento (Davis, 1987). Algumas espécies podem ser consideradas monófagas ou oligófagas, no entanto, representantes de Gracillariidae podem se alimentar de diversas famílias de plantas espalhadas nos diferentes continentes (De Prins & De Prins, 2018; Kawahara et al., 2017). As minas foliares também apresentam variações, com uso potencial como caracteres diagnósticos entre as espécies (Davis 1987). Algumas são estreitas e serpenteantes, podendo continuar assim até o final no estágio larval, apenas aumentando a largura das galerias. Outras começam serpenteantes formando manchas no decorrer do desenvolvimento, ou formam manchas desde o início do desenvolvimento, podendo cobrir parcialmente ou totalmente a superfície foliar. As fezes também podem auxiliar na identificação, já que algumas deixam rastros visíveis, muitas vezes com padrões distintos ao longo do desenvolvimento larval (Davis, 1987).

O objetivo deste trabalho foi descrever os estágios imaturos de duas novas espécies de gracilarídeos minadores de folhas associados a duas plantas hospedeiras, *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Nevling (Thymelaeaceae) e *Psychotria suterella* Müll.Arg. (Rubiaceae), ocorrentes no município de São Francisco de Paula, estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Contempla-se a morfologia geral externa destes em nível de

microscopia óptica e de varredura, suas histórias de vida, incluindo a descrição anatômicas das minas, bem como inferências moleculares com base em DNA mitocondrial (COI) quanto as relações filogenéticas dentro da família. Os respectivos resultados integram dois artigos, um já publicado e outro que fará parte de uma publicação em colaboração, de maior escopo, incluindo a descrição de outras duas espécies.

Referências

Brito, R., Gonçalves, G. L., Vargas, H. A., Moreira, G.R.P., 2013. A new Brazilian *Passiflora* leafminer: *Spinivalva gaucha*, gen. n., sp. n. (Lepidoptera, Gracillariidae, Gracillariinae), the first gracillariid without a sap-feeding instar. *ZooKeys* 291, 1–26.

Brito, R., De Prins, J., De Prins, W., Mielke, O.H.H., Gonçalves, G.L., Moreira, G.R.P., 2016. Extant diversity and estimated number of Gracillariidae (Lepidoptera) species yet to be discovered in the Neotropical region. *Rev. Bras. Entomol.* 60, 275–283.

Brito R, & Duarte M. Gracillariidae. 2018. Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil, <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2476> (acessado em janeiro de 2018).

Davis, D.R., 1987. Gracillariidae. In: Stehr, F.W. (Ed.), *Immature Insects*, vol. I. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, pp. 372–374.

De Prins, J., De Prins, W., 2018. Global Taxonomic Database of Gracillariidae (Lepidoptera), <http://www.gracillariidae.net> (acessado em janeiro de 2018).

De Prins, J., Kawahara, A.Y., 2012. Systematics, revisionary taxonomy, and biodiversity of Afrotropical Lithocolletinae (Lepidoptera: Gracillariidae). *Zootaxa* 3594, 1–283.

Hering, E., 1951. *Biology of the leaf miners*. Uitgeverij Junk, Gravenhage, pp. 420.

Kawahara, A.Y., Plotkin, D., Ohshima, I., Lopez-Vaamonde, C., Houlihan, P., Breinholt, J.W., Kawakita, A., Xiao, L., Regier, J.C., Davis, D.R., Kumata, T., Sohn, J.C., De

Prins, J., Mitter, C., 2017. A molecular phylogeny and revised higher-level classification for the leaf-mining moth family Gracillariidae and its implications for larval host use evolution. *Syst. Entomol.* 42, 60–81.

Kumata, T., 1978. A new stem-miner of alder in Japan, with a review of the larval transformation in the Gracillariidae (Lepidoptera). *Insecta Matsumurana* 13, 1-27.

Moore, K. M., 1966. Observations on some Australian forest insects. 22. Notes on some Australian leaf-miners. *The Aust. Zool.* 13, 303-349.

Sinclair, R.J., & Hughes, L., 2010. Leaf miners: The hidden herbivores. *Austr. Ecol.* 35, 300-313.

CAPÍTULO II

Artigo publicado como:

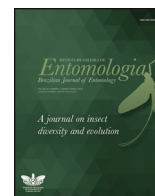
Fochezato, J., Brito, R., Isaias, R. M. S., Gonçalves, G. L., Moreira, G. R. P., 2018. *Phyllocnistis hemera* **sp. nov.** (Lepidoptera: Gracillariidae): a new species of leaf-miner associated with *Daphnopsis fasciculata* (Thymelaeaceae) in the Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Entomologia*. 62, 57-65.



SOCIEDADE BRASILEIRA
DE ENTOMOLOGIA
FUNDADA EM 1937

REVISTA BRASILEIRA DE
Entomologia
A Journal on Insect Diversity and Evolution

www.rbentomologia.com



Systematics, Morphology and Biogeography

Phyllocnistis hemera **sp. nov.** (Lepidoptera: Gracillariidae):
a new species of leaf-miner associated with *Daphnopsis fasciculata*
(Thymelaeaceae) in the Atlantic Forest



Júlia Fochezato^a, Rosângela Brito^a, Rosy Mary dos Santos Isaias^b, Gislene Lopes Gonçalves^{c,d},
Gilson R.P. Moreira^{a,*}

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Universidad de Tarapacá, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Recursos Ambientales, Arica, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2017

Accepted 1 November 2017

Available online 15 November 2017

Associate Editor: Héctor Vargas

Keywords:

Microlepidoptera

New species

Morphology

DNA barcoding

Neotropical region

ABSTRACT

During recent studies performed in the Atlantic Forest, a new species of Phyllocnistinae (Gracillariidae), *Phyllocnistis hemera* **sp. nov.**, leaf miner of *Daphnopsis fasciculata* (Thymelaeaceae) was discovered. The adults are described and illustrated as well as the immature stages, with notes on natural history including a description of the leaf mine. Additionally, DNA barcode sequences were compared to other representatives of Phyllocnistinae to test for the specific status of *P. hemera* and to infer phylogenetic relationships. This is the fifth species described for the genus *Phyllocnistis* in the Atlantic Forest and the first record of a gracillariid mining Thymelaeaceae leaves.

© 2017 Sociedade Brasileira de Entomologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

The Gracillariidae (Lepidoptera) is one of the most diverse families of leaf mining microlepidoptera. Approximately 2000 species have been described in 106 genera, with cosmopolitan distribution but not found in the Antarctic region (Davis, 1987; De Prins and De Prins, 2017). Kawahara et al. (2017) carried out a phylogenetic analysis and proposed a new classification for the group, dividing Gracillariidae into eight subfamilies. The Phyllocnistinae, one of the subfamilies retained in the new classification, has been the recent focus of taxonomic studies of the Neotropical region (Kawahara et al., 2009; Davis and Wagner, 2011; Brito et al., 2012; De Prins et al., 2016; Brito et al., 2017a,b).

Phyllocnistinae is a monotypic subfamily represented by species of *Phyllocnistis* Zeller, 1848. This genus has currently 108 species described worldwide, but only 27 for the Neotropics (De Prins and De Prins, 2017; Brito et al., 2017a). Representatives of this genus can be distinguished from the other gracillariids by a set of typical fasciae and strigulae on the forewings, and by a set of tergal spines on the abdominal segments on the pupae. The larvae usually

present three sap-feeding instars followed by a spinning instar (Davis, 1987). The sap-feeding instar feeds on cell fluid which is released by the laceration of leaf tissue; the spinning instar, which does not feed, is responsible for the construction of a silk cocoon within which pupation occurs. Only two species, *P. citrella* Stainton and *P. tethys* Moreira & Vargas, have information regarding the type of tissue used as food by the sap-feeding larvae. Those of *P. citrella* are known to feed on epidermal cells, while larvae of *P. tethys* feed upon the spongy tissue (Achor et al., 1997; Brito et al., 2012).

Hostplants are known only for a third of the species of *Phyllocnistis*. They belong to 34 families of angiosperms, 13 of which occur in the Neotropics (De Prins and De Prins, 2017). Recently, during collections performed in the Atlantic Forest, in southern Brazil, a gracillariid representative associated with Thymelaeaceae was found for the first time. The comparison at both morphological and molecular levels confirmed that it is a new *Phyllocnistis* species. Here we provide illustrations and description of the corresponding adult and immature stages, and highlight important characteristics regarding its life history and feeding habits in association with the characterization of the leaf mine. DNA barcode (COI) was obtained from some specimens in order to establish the specific status and its phylogenetic relationships with representatives of the Phyllocnistinae.

* Corresponding author.

E-mail: gilson.moreira@ufrgs.br (G.R. Moreira).

Material and methods

The specimens were reared in small plastic vials under controlled abiotic conditions (14 h light/10 h dark; $25 \pm 2^\circ\text{C}$) at the *Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul state (RS), Brazil, during May 2016, January, June and July 2017. They came from field-collected leaf mines associated with the host plant *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Neveling (Thymelaeaceae), at the *Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza (CPCN Pró-Mata/PUCRS 29°28'36" S, 50°10'01" W)*, São Francisco de Paula, RS.

Morphological analysis

Adults were pinned and dried. Immature stages were fixed with Dietrich's fluid and preserved in 75% ethanol. At least 3 specimens of each stage were used to describe the immatures. For adult gross morphology the specimens were cleared in 10% potassium hydroxide (KOH) and slide-mounted in Canada balsam. Morphological analysis and descriptions were performed with the aid of a Leica[®] M125 stereomicroscope with an attached Sony[®] Cyber-shot DSC-H10 digital camera for photography. Genitalia structures were analyzed and photographed with a Nikon AZ 100 M stereomicroscope. The software CorelDraw[®] X8 and Corel Photo Paint[®] X8 were used for vectorization and image processing. The terminology used for the description of forewing pattern and genitalia follows Brito et al. (2017b) and Kobayashi and Hirowatari (2011), respectively.

For scanning electron microscopy, specimens were dehydrated in a Bal-tec[®] CPD030 critical-point drier, mounted on metal stubs with double-sided tape and coated with gold in a Bal-tec[®] SCD050 coater. Photographs were taken under a JEOL[®] JSM5800 scanning electron microscope at the *Centro de Microscopia Eletrônica (CME)*, UFRGS.

For histological sections, leaf fragments (0.5 cm²) with mines ($n=6$) were fixed in FAA (37% formaldehyde, acetic acid, 50% ethanol, 1:1:18, v/v) for 48 h, dehydrated in an n-butyl series, embedded in Paraplast and sectioned transversely (12 μm) in a rotary microtome (Jung Biocut). The sections were stained in safranin-astrablue (2:8, v/v) (Bukatsch, 1972, modified to 0.5%), and mounted in colorless varnish (Paiva et al., 2006). Photographs were taken under a Leica DM 2500-LED light microscope with a Leica DFC 7000T camera.

Museum collections

The material examined was deposited in the following entomological collections:

LMCI	Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
MCTP	Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from larval tissue of three specimens of *P. hemera* (LMCI 292-25C, D and E) using the Purelink genomic DNA extraction kit (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the DNA barcode region (sensu Hebert et al., 2003), i.e. a 660-base pair (bp) segment of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (CoI), with the universal primers and conditions proposed by Folmer et al. (1994). Variants obtained matched the region sequenced in other *Phyllocnistis* deposited in the GenBank and BOLD Systems databases. PCR products were treated

Table 1

Specimens used in this study to infer the specific status of *Phyllocnistis hemera* and phylogenetic relationship within the genus.

Group	Genus	Species	Accession number	
			Genbank	BOLD systems
Ingroup	<i>Phyllocnistis</i>	<i>citrella</i>	KF919121	GREC094-12
		<i>gracilistylella</i>	AB614510	–
		<i>hemera</i> sp.n.	MG264519	MISA019-17
		<i>hyperpersea</i>	HQ971045	RDOPO395-10
		<i>magnoliella</i>	KF492018	LTOL1038-11
		<i>ourea</i>	KY006927	MISA013-16
		<i>saligna</i>	AY521491	–
		<i>selene</i>	KY006929	MISA015-16
		<i>phoebus</i>	KY006928	MISA014-16
		<i>perseafovia</i>	HM382097	RDOPO394-10
		<i>populiella</i>	KR941466	CNRVE3067-15
		<i>tethys</i>	JX272049	–
		<i>vitegenella</i>	KR938941	–
Outgroup	<i>Angelabella</i>			
		<i>tecomae</i>	KM983605	–
	<i>Marmara</i>			
	<i>arbutiella</i>	FJ412783	LBCS922-07	

with exonuclease I and FastAP thermosensitive alkaline phosphatase (Thermo Scientific), sequenced using BigDye chemistry and analyzed in an ABI3730XL (Applied Biosystems). Sequences were automatically aligned using the algorithm Clustal X in MEGA v5 (Tamura et al., 2011) running in full mode. Data generated in this study were deposited in GenBank and BOLD (Table 1).

Phylogenetic trees were reconstructed to test the specific status of the new species and to infer its relationships within the genus. Representative taxa belonging to *Phyllocnistis* were incorporated, particularly Neotropical species already described (Table 1). The tree was rooted with species of *Angelabella* Vargas & Parra and *Marmara* Clemens and representatives of the subfamilies Oecophyllembiinae and Marmarinae, known to be closely related to *Phyllocnistiane* (Kawahara et al., 2017).

Phylogenetic reconstruction used distance (neighbor-joining [NJ]) and model-based methods (Maximum Likelihood [ML] and Bayesian Inference [BI]). The substitution model GTR+G was used for ML and BI according to the Akaike Information Criterion (AIC) performed in MEGA v5. The NJ and ML analyses were run in MEGA v5 using default parameters for tree inference. Monophyly confidence limits were assessed with the bootstrap method (Felsenstein, 1985) at 60% cutoff after 1000 bootstrap iterations. The BI analysis was implemented in BEAST v1.8.4 (Drummond et al., 2012), using an uncorrelated lognormal clock and a Yule prior on branching rates. Four independent runs of 10 million generations and a burn-in period of 10,000 (the first 1000 trees were discarded) were implemented; the remaining trees were summarized in TreeAnnotator v1.6.2 (Drummond and Rambaut, 2007) and used to infer a maximum a posteriori consensus tree. Bayesian posterior probabilities (BPP) were used as an estimate of branch support. Consensus trees were visualized and edited in FigTree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/201/>). The genetic distances between the same pairs of taxa used in the phylogenetic analysis (including outgroups) were analyzed using the Kimura 2-parameter (K2P) model, with 1000 bootstrap replications in MEGA v5.

Results

Phyllocnistis hemera Brito & Fochezato **sp. nov.** (Figs. 1–7)

Type material. MALE HOLOTYPE: São Francisco de Paula municipality, Rio Grande do Sul (RS), Brazil; preserved pinned and dried,

reared from a mine associated with *D. fasciculata*, 22–24.VI.2016, G.R.P. Moreira, R. Brito and J. Fochezato colls. (LMCI306–47). PARATYPES: Same locality, 28–30.VI.2017, G.R.P. Moreira and J. Fochezato coll., two males (LMCI 319–30 and 319–36) and two females (LMCI 319–35 and 319–45); 22–24.VI.2016, G.R.P. Moreira, R. Brito and J. Fochezato coll., one male (LMCI 306–46) and one female (LMCI 306–43) donated to MCTP (60251, 60252, respectively); 01–02.VII.2017, G.R.P. Moreira and J. Fochezato coll., one female (LMCI 320–43), donated to MCTP (60253).

Additional specimens examined from the same locality and host plant, all preserved pinned and dried: 22–24.VI.2016, G.R.P. Moreira, R. Brito and J. Fochezato colls., four males (LMCI 306–26, 32, 36 and 40) with genitalia on slides (GRPM 50–144 to 147, respectively); three females (LMCI 306–34, 35 and 49) with genitalia on slides (GRPM 50–148 to 150, respectively); 28–30.VI.2017, G.R.P. Moreira and J. Fochezato colls., one male (LMCI 319–69).

Additional immature specimens of *P. hemera* were deposited at LMCI, all dissected from leaf mines of *D. fasciculata* collected at the type locality: 10–13.II.2015, G.R.P. Moreira and R. Brito coll., preserved in 100% ethanol at -10°C and used for DNA extraction (LMCI 292–25); 28–30.VI.2017, G.R.P. Moreira and J. Fochezato coll. and preserved in 75% ethanol. Eight sap-feeding larvae (LMCI 319–9), three spinning larvae (LMCI 319–8) and three pupae (LMCI 319–7) were used for microscopic studies. Additionally, nine leaf mine fragments containing sections of *P. hemera* mines (LMCI 320–9 to 11) from the type locality were fixed and preserved in FAA as described above, and used in the histological sections, 01–02.VII.2017, G.R.P. Moreira and J. Fochezato coll.

Diagnosis. *P. hemera* adults are easily distinguished from the other Neotropical *Phyllocnistis* by a longitudinal fascia on the forewing with superior border enlarged, reaching the costal margin. Its pupal stage is similar to that of *P. drimiphaga* Kawahara, Nishida & Davis in having the cocoon-cutter divided into three processes, the central longer than the lateral ones, and by the similar arrangement of tergal spines on abdominal segments. However, *P. hemera* has lateral processes shorter and wider than *P. drimiphaga*, and two pairs of setae on the clypeus, while *P. drimiphaga* has only one pair. The spinning larva of *P. hemera* is similar to that of *P. ourea* Brito & Moreira, as both share ventral ambulatory, single callus on central meso- and metathorax. However, these species differ in the location of the ventral calli on the abdominal segments (Ab); *P. hemera* has ventral calli on abdominal segments 3 to 7 (Ab 3–7), while *P. ourea* has calli on Ab 3–6.

Description. *Adult* (Fig. 1). Male and female similar in size and color. Forewing length 3.51–4.17 mm ($n=5$). **Head:** antennae silver, ~ the length of forewing. A pair of tufts formed by a set of scales emerging from the base of antenna are directed to the frons.

Labial palp slender, silver, ~0.5 mm in length. **Proboscis** without scales. **Thorax:** Forewing ground color white silver, with light

yellow fasciae bearing brown borders. Longitudinal fascia with well-marked border, which is much wider and convex on the basal half, reaching the costal margin; longitudinal fascia emerges from the wing base toward the median region, being completely connected to the first transverse fascia. The latter emerges on the costal margin and is slightly connected to the second transverse fascia. The second transverse fascia crosses the wing from the costal margin toward the inner margin; it is disconnected from the third and fourth fascia. Last two fasciae fused, forming a blotch on the distal region. Costal strigulae emerge from second, third and fourth transverse fasciae. Apical strigulae emerge from apical spot. Inner marginal fringes mostly light brown. **Abdomen:** covered with silver scales.

Male genitalia (Fig. 2A–D). One pair of coremata located between the intersegmentary membrane of Ab 8 and 9; the coremata are formed by a set of long, fine scales, reaching $\sim 0.4\times$ the size of valvae (Fig. 2B and C). Uncus absent. Tegumen narrow at base, widening toward the apex, forming a dorsal sclerotized arch; small setae occur next to the lateral borders of the tegumen; tuba analis narrow and membranous, surpassing the distal margin of tegumen. Valvae digitiform, slightly narrower and finer on base, widening toward the apex. Setae vary in size from small to medium on ventral distal region, forming a line; along the valva, setae varying in size are randomly arranged (Fig. 2A and C). Saccus U-shaped. Phallus elongated, weakly sclerotized, cylindrical and partially wrinkled, with fine apex. Cornuti absent (Fig. 2D).

Female genitalia (Fig. 2E–G). Anterior and posterior apophyses similar in shape; the posterior half the size of the anterior; the posterior apophyses reach Ab 8 and the anterior ones the posterior portion of Ab 7. Anal papillae with medium-sized setae, randomly arranged. Ostium bursae located on median region of the eighth abdominal sternum; ductus bursae long, membranous and slender; corpus bursae ellipsoid and membranous; signum wide, slightly rectangular with two spines on the proximal margin; one acute, well developed, the other of reduced size (Fig. 2E–G). Variation in these structures was found, such as: (1) one of the signa with an acute spine, the other without spines; (2) both signa bearing well developed spines; (3) one single signum containing a spine with bifurcated apex.

Immature stages

Sap-feeding larva (Figs. 3A, 4 and 7D). Leaf miner, flattened dorsoventrally (Fig. 4D), hypermetamorphic, presenting three instars. Body light yellow, 5.39–7.67 mm (min–max length); average last instar head capsule width ~ 0.64 mm ($n=5$) (Fig. 7D). **Head:** prognathous, setae absent; labrum slightly bilobed with small hypopharyngeal spines next to lateral margin. Labium shaped like the labrum, however wider and with greater number of spines



Fig. 1. Adult of *Phyllocnistis hemera*, dorsal view: (A) wings spread, pinned and dried (LMCI 306–47); (B) wings folded, on *Daphnopsis fasciculata* leaf surface. Scale bars: 1 mm.

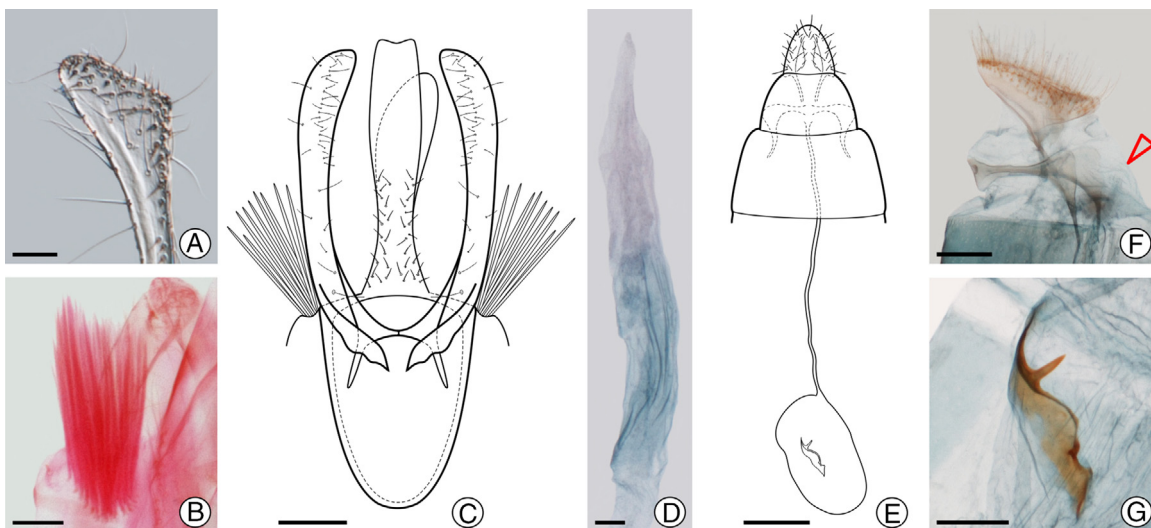


Fig. 2. *P. hemera* genitalia under light microscopy: (A–D) male genitalia; (E–G) female genitalia. (A) apex of left valva, mesal view (LMCI 319–69); (B) left corema, ventral (LMCI 306–26); (C) male genitalia, ventral; (D) aedeagus, lateral (LMCI 306–36); (E) female genitalia, ventral; (F) female last abdominal segments, lateral (LMCI 306–49) with the ostium bursae indicated by arrow; (G) signum in detail, ventral (LMCI 306–49). Scale bars: 50 (A, B, D), 100 (C, F, G), 400 μm (E).

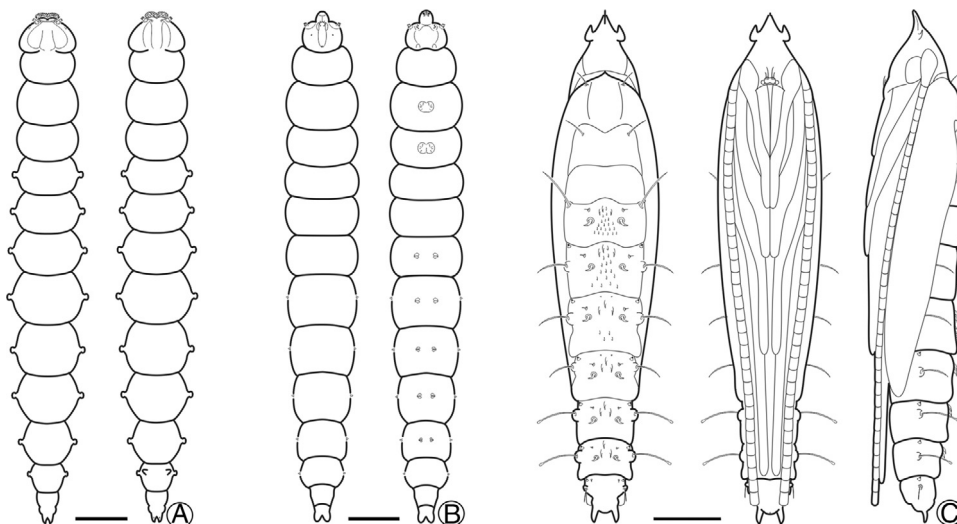


Fig. 3. Larval and pupal morphology of *P. hemera* under light microscopy: (A) sap-feeding larva, dorsal and ventral views; (B) spinning larva, dorsal and ventral; (C) pupa, dorsal, ventral and lateral, respectively. Scale bars: 500 μm .

(Fig. 4A–C and E); a small aperture on labium indicating the rudimentary spinneret (Fig. 4F). Labial and maxillary palpi absent. Antenna 3-segmented; the second segment with two sensilla, the distal one with a single apical sensillum (Fig. 4G). On anterior section of lateral region of the head, one rounded stemma followed by a microseta (Fig. 4H). **Thorax:** without setae, legs absent; presence of one pair of latero-dorsal prothoracic spiracles, with peritreme not differentiated (Fig. 4I). **Abdomen:** setae, prolegs and calli absent; a pair of laterodorsal lobes from first to eighth abdominal segment (Fig. 4J and M–N). These lobes are dorsoventrally flattened; on Ab 8 there is a second pair of lateroventral lobes with fine apex (Fig. 4K and L); last abdominal segment slightly divided, with pairs of microsetae on ventral region (Fig. 4O).

Spinning larva (Figs. 3B, 5 and 7E). Endophyllous, cylindrical, with coloration similar to the sap-feeding larva, 5.47–6.04 mm (min–max length). Body covered with microtrichia. **Head:** setae absent or reduced, except for three pairs located on the clypeal region; buccal apparatus modified into an anteriorly located, trophic lobe presenting corrugated tegument (Fig. 5A, B, D and E). Labial palpi absent; maxilla represented by three pairs of small

setae. The trophic lobe in ventral view is long, with functional apical aperture (Fig. 5C). Antennae short, 3-segmented; three sensilla emerge from the second segment and one, bristle-like seta from the apical segment (Fig. 5H). **Thorax:** setae reduced or absent. Legs absent; prothoracic shield slightly evident, represented by an irregular, corrugated, central area (Fig. 5F). Laterally on prothoracic tergum one pair of rounded spiracles, with peritreme slightly elevated (Fig. 5G). A single ambulatory callus centrally on ventral region of meso- and metathorax; slightly divided on metathorax (Figs. 3B and 5I and J). **Abdomen:** one pair of ambulatory calli ventrally on Ab 3–7 (Figs. 3B and 5M and N), smaller compared to those on meso- and metathorax. One pair of small lateral sensilla on Ab 4–7 (Fig. 5L), which decrease in size antero-posteriorly. Last abdominal segment partially divided into two lobes (Fig. 5K) with two pairs of microsetae on ventral region (Fig. 5O).

Pupa (Figs. 3C, 6 and 7G). Dark brown (Fig. 7G), 3.92–4.08 mm (min–max length). Cocoon-cutter with three projections; the central one lanceolate, longer and wider, with serrated border; the lateral ones shorter, hook-shaped (Fig. 6A–B and D). Clypeus slightly bilobed, with two pairs of small setae (Fig. 6B). Antenna long

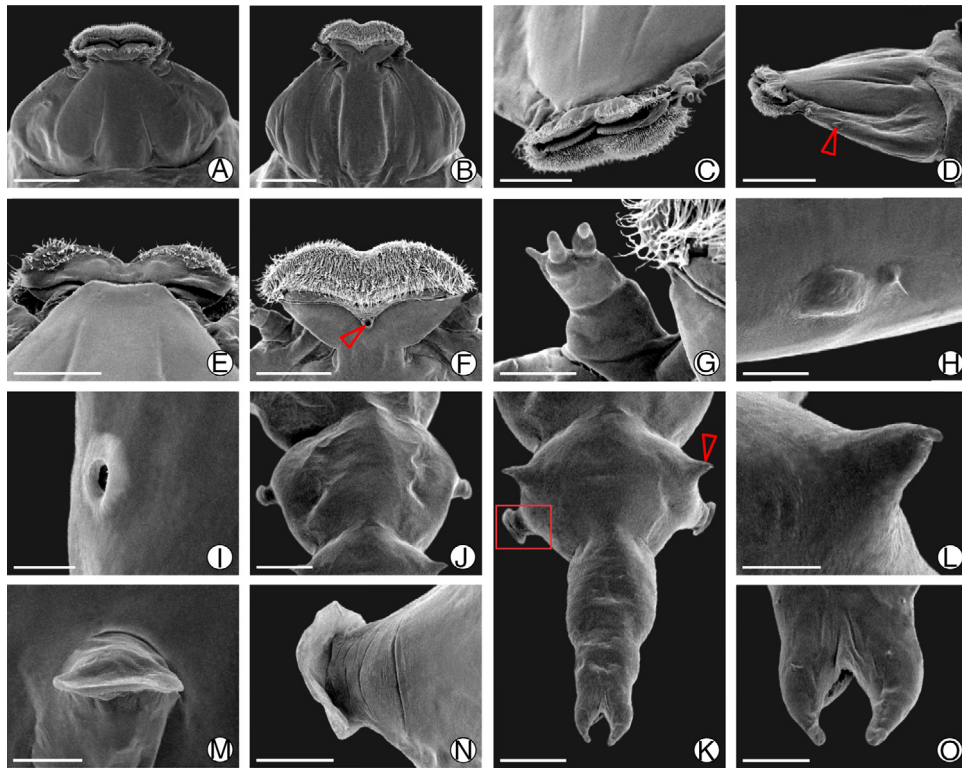


Fig. 4. Scanning electron micrographs of *P. hemera* sap-feeding larva: (A–D) head under dorsal, ventral, anterior and lateral views (arrow indicates stemma); (E) labrum, dorsal; (F) labium, ventral (arrow indicates spinneret aperture); (G) antenna, ventral; (H) stemma in detail (indicated by arrow in D), lateral; (I) prothoracic spiracle, dorsal; (J) segment A7, ventral; (K) segments A8–10, ventral; (L) detail of latero-ventral lobe indicated by arrow in K, ventral; (M, N) latero-dorsal lobe, highlighted by the red rectangle in K, lateral and dorsal; (O) last abdominal segment, ventral. Scale bars: 200 (A, B, D, K), 70 (C), 100 (E, F, O), 30 (G), 20 (H), 10 (I), 250 (J), 25 (L), 50 (M), 40 μm (N).

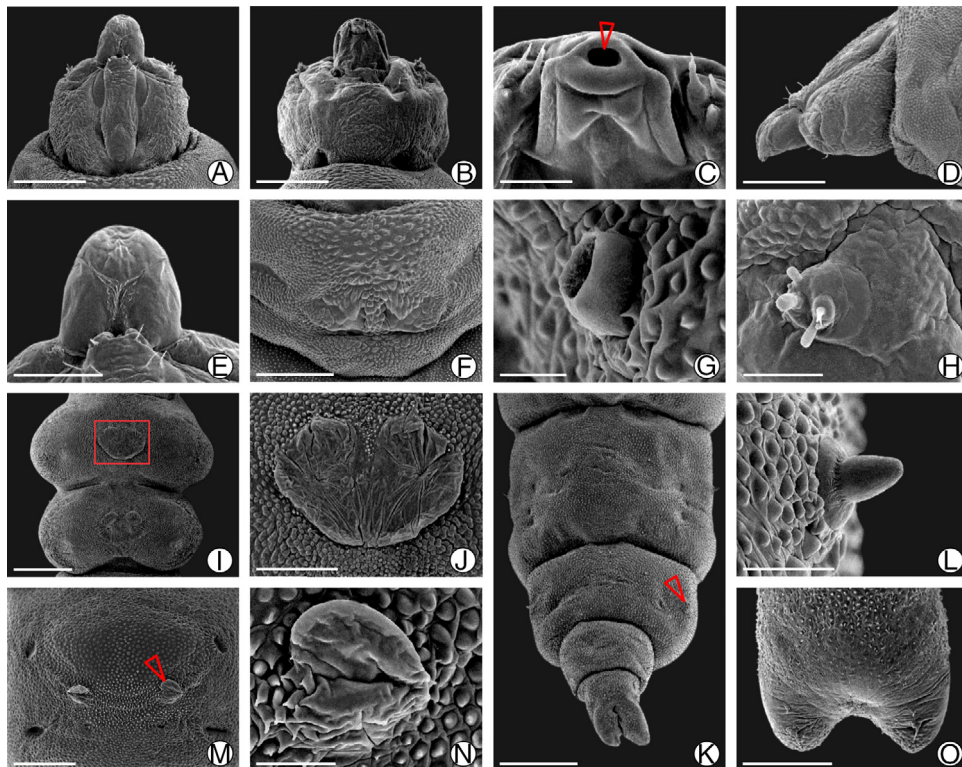


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *P. hemera* spinning larva: (A, B) head, dorsal and ventral views; (C) spinneret, antero-lateral (arrow indicates functional aperture); (D) head, lateral; (E) detail of trophic lobe, dorsal; (F) prothoracic shield, dorsal; (G) prothoracic spiracle, lateral; (H) antenna, anterior; (I) meso- and metathoracic calli, ventral; (J) mesothoracic callus in detail (indicated by rectangle in I), ventral; (K) abdominal segments Ab 7–10, dorsal; (L) latero-sensillum indicated by arrow in K, dorsal; (M) abdominal segment Ab 7, ventral (arrow indicates one of the calli); (N) callus in detail, ventral (indicated by arrow in M); (O) last abdominal segment, ventral. Scale bars: 200 (A, B, D, E, K), 150 (C, F), 10 (G, N), 20 (H, L), 250 (I), 80 (J, O), 100 μm (M).

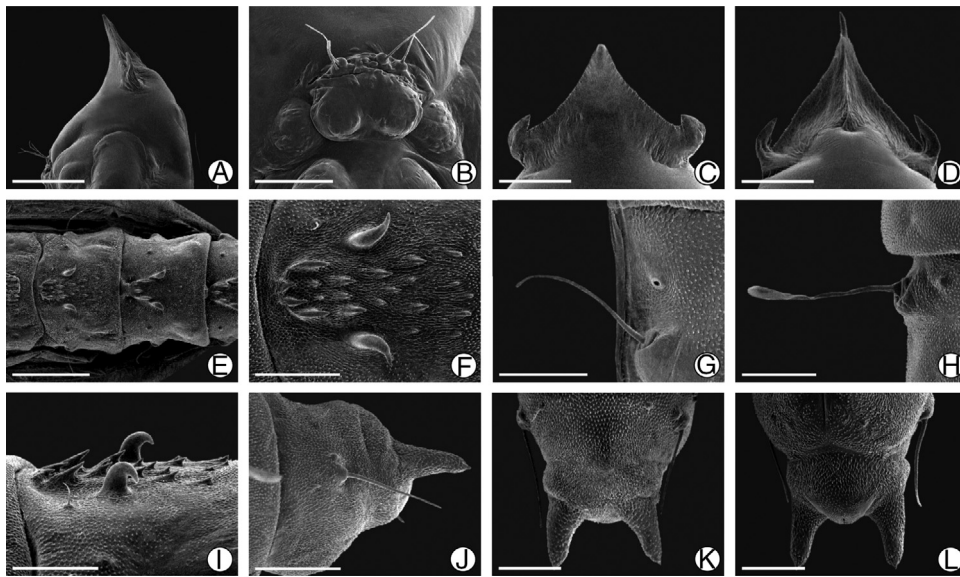


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *P. hemera* pupa: (A) head, lateral view; (B) setae over clypeus, ventral; (C, D) cocoon-cutter, ventral and dorsal; (E) terga of abdominal segments Ab 3–4, dorsal; (F) detail of segment Ab 3, dorsal; (G) lateral seta with fine apex, adjacent to spiracle on abdominal segment Ab 4, dorsal; (H) lateral seta of Ab 7 with clavate apex, dorsal; (I) detail of tergum of Ab 3, lateral; (J–L) last abdominal segments, lateral, dorsal and ventral. Scale bars: 200 (A), 80 (B), 100 (C, D, G, K, L), 400 (E), 150 μm (F, H, I, J).



Fig. 7. Natural history of *P. hemera*: (A) Host plant, *Daphnopsis fasciculata* at the type locality; (B) seedling of *D. fasciculata* with several mines; (C) leaf with a single *P. hemera* mine on adaxial surface (closed and open arrows indicate the beginning and final portions of the mine); (D) sap-feeding larva, latero-dorsal view; (E) spinning larva, latero-dorsal; (F) pupal cocoon, dorsal; (G) pupa, dorsal; (H) pupal exuvium protruded from cocoon after adult emergence. Scale bars: 40 (B), 3 (C), 1 (D, E, G, H), 0.3 mm (F).

and filiform, reaching the last abdominal segments (Fig. 3C); proboscis extending to anterior margin of Ab 2; anterior, median and posterior legs reaching Ab 3, Ab 4 and Ab 7, respectively; forewings

extending to the posterior portion of Ab 5 (Figs. 3C and 6E). A set of small, posteriorly directed spines, dorsally at the center from second to seventh abdominal segments (Fig. 6I); on tergum of the

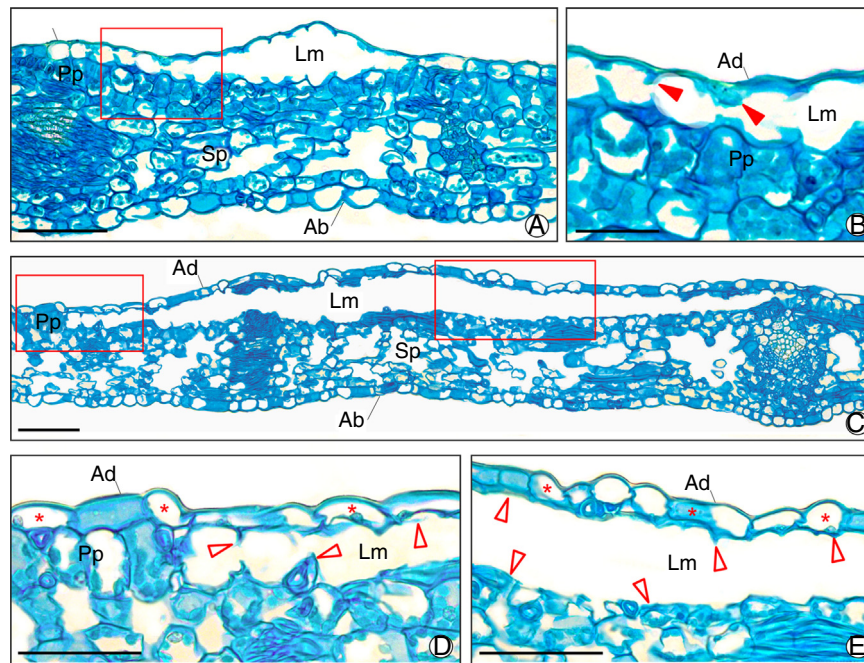


Fig. 8. Transverse histological sections of *P. hemera* mine on *Daphnopsis fasciculata* leaf. (A) initial portion (location indicated by dashed line in Fig. 7C); (B) detail of initial portion (enlarged area marked with a rectangle in A); (C) intermediate portion (location indicated by unbroken line in Fig. 7C); (D, E) details of intermediate portion (enlarged areas marked with rectangles in C). Asterisks indicate intact cells of epidermis. Closed and open arrows indicate cellular fragments left on epidermis and palisade parenchyma after feeding. Ab, abaxial surface of epidermis; Ad, adaxial surface of epidermis; Lm, leaf mine; Pp, palisade parenchyma; Sp, spongy parenchyma. Scale bars = 100 μ m (A, C), 50 μ m (B, D, E).

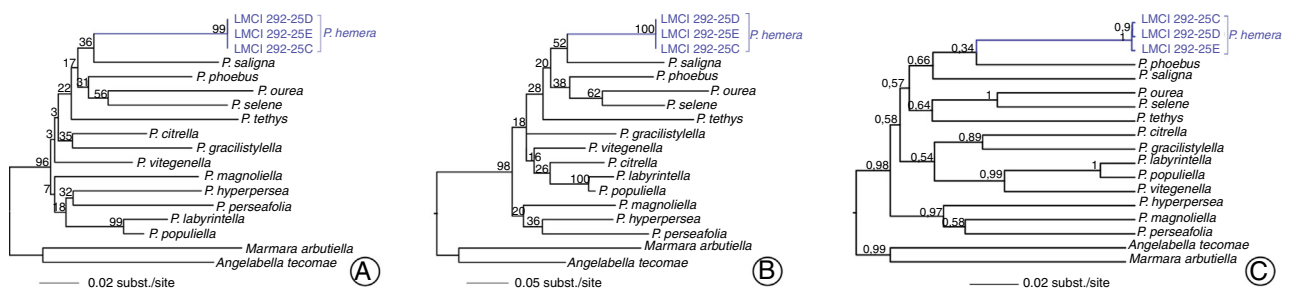


Fig. 9. Phylogenetic reconstruction for *P. hemera* based on 660 bp of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I gene ('DNA barcode' region) using three methods: (A) distance (Neighbor-joining), (B) Maximum likelihood, and (C) Bayesian inference. Numbers above branches indicate node support (bootstrap for A and B and posterior probability for C). Samples in blue highlight the new taxon.

same abdominal segments, also one pair of stout spines and one pair of posteriorly directed small setae (Fig. 6E, F and I). A pair of medium-sized setae laterally on meso- and metathorax. One pair of setae with fine apex on pleura from Ab 2–5 (Fig. 6G); from Ab 6–7 the setae have clavate apex (Fig. 6H). Open spiracles present on Ab 2–7 (Fig. 6G). The eighth abdominal segment presents one pair of microsetae dorsolaterally on tergum, one pair of spiracles partially closed and one pair of medium-sized setae posteriorly directed (Fig. 6J and K). One pair of posteriorly directed, digitiform caudal processes on last abdominal segment (Fig. 6J–L).

Etymology. *Hemera*, in Greek mythology is the daughter of the night and represents the divinity that personifies the daylight, here making an allusion to the light and bright color of the forewings of this species.

Distribution. *P. hemera* is known only from its type locality, the Dense Umbrophilous Forest (= Atlantic Forest sensu stricto), CPCN Pró-Mata, São Francisco de Paula municipality, Rio Grande do Sul, Brazil.

Host plant (Fig. 7A). *D. fasciculata* (Meisn) Neveling (Thymelaeaceae). The host plant of *P. hemera* occurs as either a shrub or a small tree, endemic to Brazil and occurring in the

following regions: Midwest (Distrito Federal), Southeast (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo) and South (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul) (Rossi, 2017).

Life history (Fig. 7B–H). Eggs of *P. hemera* are deposited on the adaxial leaf surface. After eclosion, the sap-feeding larva (Fig. 7D) penetrates the leaf blade starting the mine construction. In the beginning the mine is narrow and serpentine-shaped, increasing in width during development (Fig. 7B). Centrally along the mine a path of black feces left by the larva can be seen by transparency (Fig. 7B). Mines are initially constructed within the adaxial epidermal cells (Fig. 8A) by cutting the anticlinal cell walls (Fig. 8B). Later the larva goes deeper into leaf tissues and install within palisade parenchyma cells, also by cutting the anticlinal cell walls (Fig. 8C). The epidermal cells remain intact over the intermediary mine (Fig. 8C–E), while fragments of the anticlinal cell walls of the palisade parenchyma cells remain in the lateral portions of the mine (Fig. 8D) but are totally consumed in the central portion (Fig. 8E).

The spinning larva (Fig. 7E) does not feed and is responsible for the construction of the cocoon. This is endophylous and constructed at the final portion of the mine, and completely covered by whitish silk that provokes a slight leaf wrinkling (Fig. 7F). The pupal cocoon

is ruptured by the pupa's cocoon-cutter (Fig. 7G) during adult emergence. Later, the pupal exuvia is seen partially protruding from the cocoon (Fig. 7H). More than one mine were found in most of the mined leaves. A few mines were found on full grown *D. fasciculata* trees. The greatest density of leaves mined by *P. hemera* was found on young plants, especially those located in humid sections of trail borders existing in the type locality. The larvae were found active in the field from February to August, suggesting the species is multivoltine.

Phylogenetic inference

A total of 660 nucleotide sites were analyzed, of which 268 (40%) were variable. In accordance with our phylogenetic hypothesis, the monophyly of the new species was recovered in both methods of inference (distance and model-based), with high node support values (Fig. 9). Since the topologies were slightly different, all are presented. The sister relationship of *P. hemera* was not well resolved: node supports were quite low in all trees (NJ, Bayesian and ML). In the NJ and ML inferences, *P. hemera* clustered with *P. saligna* (Fig. 9). In the Bayesian analysis, the closest related lineage was *P. phoebus*; however, the node support (BPP) was very low. The genetic distance estimated between *P. hemera* and other taxa ranged from 14% to 20% ($\pm 2\%$) (see Supplementary Material; Fig. S1). The distance of the new species to the outgroups was 24% ($\pm 3\%$).

Discussion

P. hemera is described here based on morphological and molecular characters, showing enough stable characters in both types of analysis to separate it clearly from other congeneric species. Phylogeny showed a monophyletic status for the new species, but did not resolve close relationships. Different methods of reconstruction retrieved different results for sister taxa of *P. hemera*, although with low support. In the NJ and ML trees it was close to *P. salignela*, whereas in Bayesian inference it clustered with *P. phoebus*, a sympatric species from the same region of Atlantic Forest (Brito et al., 2017a). A comparative assessment of genetic distance to other Neotropical *Phyllocnistis* indicates a minimum of 12% for *P. hemera* to *P. citrella* and *P. vitegenella*, which indicates a great amount of divergence sampled in *Phyllocnistis*. Such high diversity is likely reflected in the evolutionary history reconstructed for the genera, e.g. by the absence of unknown lineages in the phylogeny, suggested by the putative long-branch attraction apparently found in *P. hemera* and *P. salignela* relationship (NJ and ML trees).

The forewing pattern of *P. hemera* resembles those described for congeneric species in the Neotropical region (Brito et al., 2017a), regarding number of fasciae and strigulae, presenting one well-marked longitudinal fascia, two visible transversal fasciae, three costal and four apical strigulae, the last emerging from the apical spot. Comparing *P. hemera* to the other congeneric Neotropical species the greatest similarity is found with *P. bourquini* Pastrana, a species described for Argentina; both species share forewing light yellow fasciae, but they can be contrasted by the morphology of the third and fourth fasciae, which are separated in *P. bourquini* and united in *P. hemera*. Another character that differentiates *P. hemera* from *P. drimiphaga* is the male valva; in *P. drimiphaga* the valva is divided into two lobes (Kawahara et al., 2009), the dorsal being more prominent than the ventral, while *P. hemera* has the distal portion of the valva undivided.

As already mentioned, the presence of ambulatory calli on the ventral region of meso- and metathorax in the spinning larva has already been described for *P. ourea*, also a species from the

Atlantic forest. Ambulatory calli are not exclusive characters of *Phyllocnistinae*, and they also occur in representatives of the *Oecophyllembiinae* – *Angelabella* Vargas & Parra, *Eumetriochoera* Kumata, *Metricochoera* Busck and *Prophyllocnistis* Davis, a gracillariid subfamily closely related to the *Phyllocnistinae* (Vargas and Parra, 2005; Kumata, 1998; Busck, 1900; Davis, 1994; Kawahara et al., 2017). Stemmata have already been described for the sap-feeding larvae of some *Phyllocnistis* species of the Neotropical region, such as *P. ourea* Brito & Moreira and *P. selene* Brito & Moreira, which have two stemmata on the lateral region of the head. Thus *P. hemera* is the only species known so far with a single stemma followed by a microseta (Brito et al., 2017b).

The species described here is the first gracillariid associated with a Thymelaeaceae plant. As already described, *D. fasciculata* has a broad distribution in southeast Brazil (Rossi, 2017), suggesting that *P. hemera* might be distributed in other regions not evaluated in this study, which should be further explored. Interestingly, results presented here regarding the histology of the mine give further support for the existence of a broad feeding habit in relation to use of leaf tissues within *Phyllocnistis*. In other words, our data suggest that although highly species-specific to a given type of leaf tissue, species within this genus may use any kind of tissue, including the epidermis (e.g. *P. citrella*, Archor et al., 1997), spongy parenchyma (e.g. *P. tethys*, Brito et al., 2012), and palisade parenchyma (e.g. latter instars of *P. hemera*, as demonstrated here). The ultimate factors that lead to this variation in tissue usage remain to be determined. *P. hemera* uses the epidermis initially, and moves to the palisade parenchyma in the intermediary phase of the mine, which may indicate a search for better nutritional resources. Epidermal cells may function as lenses for capturing sunlight and as a consequence have large water-filled vacuoles and scarce cytoplasm. Palisade parenchyma cells, on the other hand, are commonly cytoplasm-rich, and may accumulate energetic molecules (Evert, 2006; Bowes and Mauseth, 2008).

The Atlantic forest is known for its extreme diversity with approximately 50% of the species considered endemics (Stemann et al., 2009). However, only five species of *Phyllocnistis* are known for the region (Brito et al., 2012, 2017a). As suggested by Brito et al. (2016), the vast majority of Neotropical gracillariid species remain to be discovered. Data presented in this study regarding a new species of *Phyllocnistis* for the Atlantic forest support further the hypothesis proposed by such authors in the sense that the scarcity of species described for the region is largely due to a lack of sampling, associated with a taxonomic impediment.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank the *Instituto de Meio Ambiente* (IMA/PUCRS) for allowing access to the study area and for providing assistance with fieldwork at the CPCN Pró-Mata. We are also grateful to Thales O. Freitas (UFRGS) for use of laboratory facilities for molecular analyses, and to CME-UFRGS for the use of equipment and assistance in scanning electron microscopy. We thank Lafayette Eaton for editing the text. We are also grateful to Shigeki Kobayashi (Osaka Prefecture University) and two anonymous referees, whose comments improved substantially the first version of the manuscript. J. Fochezato was supported by a CAPES Master's Program Fellowship. GL Gonçalves received a research fellowship from FAPERGS (Process 16/2551-0000485-4). GRP Moreira and RS Isaias were supported by CNPq fellowships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.rbe.2017.11.001](https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.001).

References

- Achor, D.S., Browning, H., Albrigo, L.G., 1997. Anatomical and histochemical effects of feeding by *Citrus* leaf miner larvae (*Phyllocnistis citrella* Stainton) in *Citrus* leaves. *J. Am. Soc. Horticult. Sci.* 122, 829–836.
- Bowes, B.G., Mauseth, J.D., 2008. *Plant Structure: A Colour Guide*, 2nd ed. Manson Publ Ltda, London.
- Brito, R., Gonçalves, G.L., Vargas, H.A., Moreira, G.R.P., 2012. A new species of *Phyllocnistis* Zeller (Lepidoptera: Gracillariidae) from southern Brazil, with life-history description and genetic comparison to congeneric species. *Zootaxa* 3582, 1–16.
- Brito, R., De Prins, J., De Prins, W., Mielke, O.H.H., Gonçalves, G.L., Moreira, G.R.P., 2016. Extant diversity and estimated number of Gracillariidae (Lepidoptera) species yet to be discovered in the Neotropical region. *Rev. Bras. Entomol.* 60, 275–283.
- Brito, R., Mielke, O.H.H., Gonçalves, G.L., Moreira, G.R.P., 2017a. Description of three new species of *Phyllocnistis* Zeller, 1848 (Lepidoptera: Gracillariidae) from the Atlantic Forest, south Brazil, with notes on natural history and phylogeny. *Austr. Entomol.*, <http://dx.doi.org/10.1111/aen.12298>.
- Brito, R., Lopez-Vaamonde, C., Gonçalves, G.L., Mielke, O.H.H., Moreira, G.R.P., 2017b. Taxonomic revision of the Neotropical *Phyllocnistis* Zeller, 1848 (Lepidoptera: Gracillariidae), with descriptions of seven new species and host plant associations. *Zootaxa* 4341, 301–352.
- Bukatsch, F., 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61, 255.
- Busck, A., 1900. New species of moths of the superfamily Tineina from Florida. *Proc. United States Natl. Museum* 23, 225–254.
- Davis, D.R., 1987. Gracillariidae. In: Stehr, F.W. (Ed.), *Immature Insects*, vol. 1. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, pp. 372–374.
- Davis, D.R., 1994. Neotropical Microlepidoptera XXV. New leaf-mining moths from Chile, with remarks on the history and composition of Phyllocnistinae (Lepidoptera: Gracillariidae). *Trop. Lepidoptera* 5, 65–75.
- Davis, D.R., Wagner, D.L., 2011. Biology and systematics of the New World *Phyllocnistis* Zeller leafminers of the avocado genus *Persea* (Lepidoptera, Gracillariidae). *ZooKeys* 97, 39–73.
- De Prins, J., Brito, R., Moreira, G.R.P., 2016. An annotated taxonomic checklist of the Neotropical Gracillariidae (Lepidoptera) with links to the information on host plants and parasitoids. *Zootaxa* 4158, 1–51.
- De Prins, J., De Prins, W., 2017. Global Taxonomic Database of Gracillariidae (Lepidoptera), <http://www.gracillariidae.net> (accessed August 2017).
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Evert, R.F., 2006. *Esau's Plant Anatomy*, 3rd ed. John, Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 313–321.
- Kawahara, A.Y., Nishida, K., Davis, D.R., 2009. Systematics, host plants, and life histories of three new *Phyllocnistis* species from the central highlands of Costa Rica (Lepidoptera, Gracillariidae, Phyllocnistinae). *ZooKeys* 27, 7–30.
- Kawahara, A.Y., Plotkin, D., Ohshima, I., Lopez-Vaamonde, C., Houlihan, P., Breinholt, J.W., Kawakita, A., Xiao, L., Regier, J.C., Davis, D.R., Kumata, T., Sohn, J.C., De Prins, J., Mitter, C., 2017. A molecular phylogeny and revised higher-level classification for the leaf-mining moth family Gracillariidae and its implications for larval host use evolution. *Syst. Entomol.* 42, 60–81.
- Kobayashi, S., Hirowatari, T., 2011. Two Chloranthaceae leafminers of the genus *Phyllocnistis* (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) from Japan, with descriptions of new species and pupal morphology. *Lepidoptera Sci.* 62, 156–165.
- Kumata, T., 1998. Japanese species of the subfamily Oecophyllembiinae Réal and Balachowsky (Lepidoptera: Gracillariidae), with descriptions of a new genus and eight new species. *Insecta Matsumurana* 54, 77–131.
- Paiva, J.G.A., Fank-De-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., Graciano-Ribeiro, D., 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot. Bras.* 20, 257–264.
- Rossi, L., 2017. Thymelaeaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14944> (accessed August 2017).
- Stemann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P., Kamino, L.H.Y. (Eds.), 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 509 pp.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Vargas, H.A., Parra, L.E., 2005. Um nuevo género y una nueva especie de Oecophyllembiinae (Lepidoptera: Gracillariidae) de Chile. *Neotrop. Entomol.* 34, 227–233.

Supplementary Material:

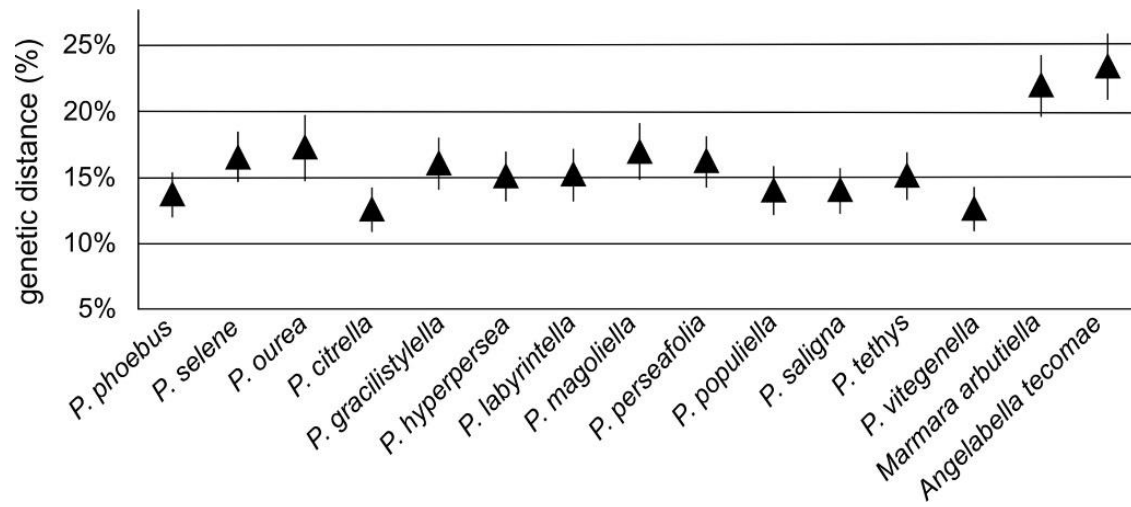


Fig. S1. Graph depicting pairwise genetic distance (in percentage) between *P. hemera* and other congeners, as well as outgroups (*Angelabella* and *Marmara*) based on 660 base pairs of the 'DNA barcode' region of the cytochrome oxidase I (COI) gene, using the Kimura 2-parameter model.

CAPÍTULO III

Descrição dos estágios imaturos e história de vida de uma nova espécie da Oecophyllembiinae (Lepidoptera: Gracillariidae) da Mata Atlântica.

Introdução

Oecophyllembiinae (Lepidoptera) Réal & Balachowsky, uma das subfamílias de gracilarídeos com menor número de espécies reconhecidas no mundo, apresenta atualmente seis gêneros: *Angelabella* Vargas & Parra; *Corythoxestis* Meyrick; *Eumetriochroa* Kumata; *Guttigera* Diakonoff; *Metriochroa* Busck e *Prophyllocnistis* Davis. Compreende um total de 30 espécies, sendo que destas, apenas duas foram descritas para a região Neotropical: *Angelabella tecomae* Vargas & Parra e *Prophyllocnistis epidrimys* Davis, ambas encontradas no Chile (De Prins & De Prins, 2018). As larvas dessa subfamília costumam apresentar dois tipos morfológicos. Os primeiros instares são do tipo *sap-feeding*, com cabeça prognata, responsáveis por dilacerar os tecidos da planta e se alimentar apenas do líquido liberado. O último instar é do tipo *spinning*; nessa fase a larva não se alimenta e é responsável pela construção do casulo (Vargas & Parra, 2005; Davis, 1994). Todos os oecophyllembíneos apresentam o primeiro par de espiráculos localizados no mesotórax das larvas (Kumata 1998). Caracteres encontrados nos adultos dessa subfamília se referem a venação diferenciada, com M₁ e M₂ surgindo a partir da veia R_s. Nas pupas, o *cocoon-cutter* apresenta processos laterais e/ou cerdas cefálicas longas; além disso, espinhos terciais com a presença de apenas um par de cerdas dorsais no abdômen e cremaster com um ou mais pares de processos caudais (Kobayashi et al. 2013; Kawahara et al. 2017).

Representantes de Oecophyllembiinae são registradas como hóspedes de plantas das seguintes famílias: Actinidiaceae, Apocynaceae, Aquifoliaceae, Araliaceae, Balsaminaceae, Rubiaceae, Oleaceae, Styracaceae e Zingiberaceae. Há registro de sete taxa se alimentando de 11 espécies de hospedeiras da família Rubiaceae, sendo que *Metrochroa psychotriella* Busck se alimenta de espécies do gênero *Psychotria* (De Prins & De Prins, 2018).

Pela primeira vez no Brasil, foi encontrado um representante dessa subfamília associado a *Psychotria suterella* Mull. Arg. (Rubiaceae), no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza (PRÓ-MATA), São Francisco de Paula, RS. O objetivo principal deste trabalho é descrever os estágios imaturos dessa nova espécie com base em caracteres morfológicos, utilizando-se a microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os adultos são descritos em detalhe por Moreira *et al.* (2018), de onde procede uma caracterização preliminar aqui incluída, com vistas a permitir uma diagnose taxonômica. Além disso, a anatomia da mina foliar foi descrita através de cortes histológicos e uma

análise filogenética com base em DNA mitocondrial (COI) incluindo espécies dos demais gêneros de *Oecophyllembiinae* foi também incluída.

Materiais e métodos

Os espécimes utilizados neste estudo foram criados a partir de folhas minadas, mantidas em potes plásticos contendo algodão umedecido sob condições abióticas controladas (14h luz/10h escuro; $25 \pm 5^\circ\text{C}$) no Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI), Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Foram todas coletadas sobre a planta hospedeira, *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), no Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza (CPCN Pró-Mata/PUCRS; $29^\circ 28' 36''$ S, $50^\circ 10' 01''$ W), São Francisco de Paula, RS. Vouchers correspondentes encontram-se depositados na Coleção LMCI, sob o número de acesso 320 (01-02.VIII.2017, Moreira G.R.P. & Fochezato, J. legs.)

Análises morfológicas

Os adultos foram mantidos a seco, montados em micro-alfinetes, valendo-se da técnica de dupla-montagem. Os estágios imaturos foram fixados com fluído de Dietrich e preservados em álcool 75%. Ao menos dois espécimes de cada estágio foram utilizados nas descrições. Para o estudo da morfologia externa dos adultos, os espécimes foram clarificados em solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% e montados em lâmina microscópicas, usando balsamo do Canadá como meio de inclusão. As observações e descrições morfológicas ao nível óptico foram realizadas com estereomicroscópio Leica® M125 e fotografados com uma câmera Sony® Cyber-shot DSC-H10 acoplada. As genitálias foram observadas e fotografadas com um estereomicroscópio Nikon AZ 100 M. Para a vetorização dos desenhos, executados sobre as fotografia correspondentes, foram utilizados os softwares CorelDraw® X8 and Corel Photo Paint® X8.

Para o microscopia eletrônica de varredura, os espécimes foram desidratados utilizando o aparelho “ponto crítico” Bal-tec CPD030 e posteriormente montados em fita dupla-face em *stubs* metálicos. A metalização em ouro foi realizada em um metalizador Bal-tec SCD050. O material foi examinado e fotografado em um microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM6060 no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

Foram realizados cortes histológicos utilizando-se pequenos fragmentos de folhas (circa 0,5cm²) contendo minas. Os mesmos foram fixados em FAA (37% formaldeído, ácido acético, 50% etanol, 1:1:18, v/v) por 48h, desidratados em série alcoólica n-butílica e embebidos em Paraplast. Após, foram seccionados transversalmente (12µm) com micrótomo (Jung Biocut). As secções foram coradas com safranina (2:8, v/v) (Bukatsch, 1972; modificado para 0,5%) e montados em verniz (Paiva et al., 2006). As fotografias foram obtidas a partir do estereomicroscópio Leica DM 2500-LED com uma câmera Leica DFC 7000.

Análise molecular

DNA genômico foi extraído a partir de tecidos de larvas de dois espécimes coletados em *P. suterella* (LMCI 292-30 e 292-31A) utilizando o kit comercial *Purelink genomic DNA extraction kit* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Utilizamos a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) para amplificar um fragmento de 650 pares de base do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (*CoI*; região barcode *sensu* Hebert et al., 2003). Os primers utilizados e as condições da reação de PCR foram descritos por Folmer et al. (1994). Os produtos de PCR foram tratados pelo método enzimático (Exonuclease I e fosfatase alcalina; Thermo Scientific), sequenciados utilizando a bioquímica BigDye e analisados em um sequenciador ABI3730XL (Applied Biosystems). As sequencias foram alinhadas automaticamente utilizando o algoritmo Clustal X dentro do MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) utilizados parâmetros padrão. Os dados gerados serão depositados nas bases de dados NCBI/Genbank e BOLD Systems (Tabela 1).

Uma árvore filogenética foi reconstruída para inferir as relações da linhagem coletada em *P. suterella* comparativamente aos demais gêneros de Oecophyllembiinae, bem como estimar a magnitude da divergência entre àquela e as demais linhagens. Foram incorporados táxons dos demais gêneros, incluindo ainda alguns não nominados (encontrados em simpatria, porém em plantas hospedeiras distintas) (Tabela 1). A árvore foi enraizada com representantes da subfamília Marmarinae (*Marmara* spp.), proximamente relacionada à Oecophyllembiinae de acordo com Kawahara et al. (2017). As sequências comparativas utilizadas foram originalmente geradas pelo grupo de pesquisa do LMCI, a exceção de *Angelabella tecomae*, e o grupo externo, obtidos da base de dados pública NCBI/Genbank (Tabela 1).

Utilizou-se a inferência Bayesiana para reconstrução da árvore, através do programa BEAST 2 (Bouckaert et al., 2014), utilizando o critério de Yule para taxas de especiação. O modelo de substituição GTR + G foi estimado no programa jModeltest 2 (Darriba et al. 2012) de acordo com o Critério de Informação Akaike. Quatro corridas independentes de 10 milhões de gerações e um período de *burn-in* de 10,000 (as primeiras 1000 árvores foram descartadas) foram empregados na análise; as árvores restantes foram resumidas no algoritmo TreeAnnotator 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007) e usada para inferir uma árvore consenso máxima *a posteriori*. Como estimativa de suporte dos ramos foi utilizada a probabilidade Bayesiana posterior (BPP), considerando significativos valores acima de 0.9. A árvore consenso foi visualizada e editada no programa FigTree 1.2 (Rambaut 2009; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/201/>). A distância genética entre os mesmos pares de taxa utilizados na análise filogenética (incluindo *outgroups*) foi analisada usando o modelo Kimura 2-Parametros (K2P) (Kimura 1980), com 1000 replicações de *bootstrap*.

Resultados

Diagnose. A identificação desta espécie pode ser feita com base na coloração dos adultos (Fig. 1a), peças bucais e venação (Figs. 1b, c), em associação: corpo cinza-escuro; palpos maxilares ausentes; asas anteriores com três pares de áreas prata-brilhantes, alinhadas transversalmente nas margens. Asas anteriores são desprovidas de R_1 e, as posteriores, quanto à CuP. Em particular, as asas anteriores apresentam as veias radiais e medianas com origem independente na célula, sendo a R_4 e R_5 fusionadas próximo a base.

Quanto a genitália masculina (Fig. 1d,e,g): tegumen subtrapezoidal, com comprimento cerca o dobro das valvas e coberto por cerdas filiformes esparsas; tuba analis com comprimento um pouco superior às valvas; valvas subretangulares, com processo distal curvo, proeminente, portando cerdas simples (não partidas e desprovidas de ornamentos); vinculum em forma de Y; saccus alongado, subcilíndrico; edeago longo, achatado, cerca de 5x as valvas em comprimento, com porção distal bulbiforme, sem cornuti (Fig. 1e). Quanto à genitália feminina (Fig. 1f, h): papilas anais globulares típicas, individualizadas; apófises posteriores e anteriores curtas, as posteriores mais extensas; óstio da bolsa estreito, não esclerotinado, localizado ventralmente na margem anterior do oitavo segmento abdominal; ducto da bolsa membranoso, afilando progressivamente na porção

distal; curto, estendendo-se anteriormente até o sexto segmento abdominal; corpo da bolsa pequeno, com formato esférico, sem signum (Fig. 1f).

Morfologia dos estágios imaturos

Larva *sap-feeding* (Figs. 2a; 3a-l; 6c). Minadora foliar, achatada dorso-ventralmente, corpo amarelado. Cabeça: prognata, cerdas reduzidas ou ausentes; hipofaringe do tipo raspadora (Fig. 3c); estematas ausentes. Antena uni-segmentada com três sensilas apicais e uma cerda longa e afilada (Fig. 3f). Labro levemente bilobado, em formato de espátula; hipofaringe desprovida de cerdas, com projeções lamelares fusionadas distais; labio bilobado, sem espinerete aparente (Figs. 3c, e). Tórax: escudo protorácico dorsal subretangular, com pequenas corrugações próximo à borda, no centro e na região anterior; tais corrugações existem também na região anterior dos esternos pró, meso e metatorácico (Figs. 2a, 3g, k). Um par de espiráculos mesotorácicos, com localização anterior, latero-dorsal (Fig. 3h). Pernas torácicas ausentes. Abdômen: Pseudopódios e calos ausentes. Um par de lóbulos abdominais laterais, voltados à região posterior do corpo, na margem posterior, do primeiro ao oitavo segmento abdominal (Figs. 2a, 3i-j). Nono e décimo segmentos abdominais subcilíndricos, de menor largura quando comparados aos anteriores. Último segmento abdominal levemente subdividido distalmente, formando duas projeções longitudinais.

Larva *spinning* (Figs. 2b; 4a-l; 6d). Endofítica, subcilíndrica e com coloração similar a larva *sap-feeding*. Corpo coberto por microtríquias. Cabeça: hipognata, peças bucais reduzidas e estematas ausentes (Figs. 4a,b). Palpo labial bi-segmentado, acompanhado de uma cerda adicional próximo à base; cada segmento com uma cerda afilada apical, sendo o basal menor; espinerete tubiforme, com um par de cerdas, posterior, próximo à base (Fig. 4f). Palpo maxilar também bi-segmentado, com uma cerda curta apical, com cerda longa e afilada próximo à base (Fig. 4c). Antena curta uni-segmentada, com duas sensilas de ápice arredondado e quatro com ápice afilado (Fig. 4d). Labro estreito com borda anterior semi-convexa, projetada anteriormente, com três pares de cerdas filiformes (Fig. 4e). Quetotaxia cefálica reduzida; um par de microcerdas laterais próximo às antenas e quatro pares em vista ventral. Tórax: escudo protorácico não diferenciado, protórax com quatro pares de microcerdas dorsais, e um par, lateral. Meso e metatórax com seis pares de microcerdas na região dorsal, sendo dois pares menores, localizados no dorso, e quatro maiores, localizadas lateralmente; um par de cerdas com tamanho similar na região lateral

(Figs. 2b, 4h). Pernas torácicas vestigiais, com um par de microcerdas em posição anterior, na base (Fig. 4g). Abdômen: dois pares de microcerdas dorsais nos segmentos um a oito, acompanhados lateralmente por um par de cerdas com tamanho mediando, sendo essas últimas do primeiro ao último segmento abdominal (Fig. 2b). Um par de pseudopódios (Fig. 4i) do terceiro ao sexto segmento, com formato levemente alongado transversalmente, com bordas laterais com uma fileira de crochês (Fig. 4j); cada pseudopódio apresenta anteriormente por um par de microcerdas. Último segmento levemente subdividido distalmente (Fig. 4k-l), com dois pares de cerdas adicionais, na região distal (um meso-dorsal e, outro, terminal).

Pupa (Figs. 2c; 5a-m; 6e). Coloração amarelada. Cabeça: *Cocoon-cutter* com projeção única, subtriangular com bordas levemente serrilhadas (Figs. 5b-c). Um par de cerdas filiformes e alongadas sobre o clipeo, com o ápice partido (Figs. 5a, d-f). Antenas longas e filiformes alcançando a região terminal do sexto segmento abdominal. Palpo labial alcançando o mesotórax, e probóscide, o metatórax. Tórax: um par de cerdas dorsais longas sobre o meso e metatórax, neste último acompanhadas por concavidades situadas na margem anterior (Figs. 5 g-h). Pernas pró, meso e metatorácicas alcançando o segundo, quarto e sétimo segmento abdominal, respectivamente (Fig. 2c). Abdômen: um par de cerdas longas dorsais do primeiro ao nono segmento; um par de cerdas supraespiraculares, do segundo ao oitavo segmento, neste último voltadas para a região posterior do corpo (Fig. 2c); um par de cerdas longas subespiraculares do terceiro ao sétimo segmento (Fig. 5j). Espiráculos dorsolaterais (Fig. 5i), com peritrema pouco desenvolvido, na região anterior, do segundo ao oitavo segmento. Presença de um pequeno par de ganchos dorsais na cremaster voltados anteriormente, na região posterior do nono segmento (Figs. 5k-l). Último segmento bifurcado (Fig. 5m).

Distribuição. Essa espécie é conhecida apenas na sua localidade tipo, correspondente a fragmentos de Floresta Ombrófila Densa (= Atlantic Forest *sensu stricto*), CPCN Pró-Mata, município de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil.

Planta hospedeira (Fig. 6a). *Psychotria suterella* Müll. Arg. é uma planta do tipo arbusto nativa do Brasil. Ocorre em diversas formações florestais, do Espírito Santo ao estado Rio Grande do Sul (Taylor & Zappi, 2015). No CPCN Pró-Mata ocorre principalmente

no interior da mata, particularmente nas bordas das trilhas, sendo um dos principais da vegetação arbustiva correspondente.

História de vida (Figs. 6b-g, 7a-c). Os ovos são depositados na face adaxial da folha (Fig. 6b). Após a eclosão, a larva *sap-feeding* (Fig. 6c) penetra na folha. Inicialmente, a mina é estreita, normalmente contornando a margem foliar. Durante o desenvolvimento da larva, a mina aumenta de calibre formando um caminho serpenteante (Fig. 6b). Não formam-se rastros contínuos de fezes, as quais são dispersas ao longo da mina. Através dos cortes histológicos (Fig. 7a-c) foi demonstrado que a larva se alimenta apenas do parênquima paliçádico, deixando intacta a epiderme e o parênquima esponjoso. A larva *spinning* (Fig. 6d) não se alimenta e é responsável pela construção do casulo (Fig. 6f). Este é endofítico e construído na porção final da mina. O mesmo é revestido internamente de seda e externamente forma pregas, promovendo um dobramento na folha. O casulo é rompido pelo *cocoon-cutter* da pupa (Fig. 6e) durante a emergência do adulto deixando a exúvia (Fig. 6g) é vista parcialmente protraída do casulo após a emergência do adulto. Não é comum encontrar mais de uma mina por folha. As larvas foram encontradas ativas no campo de fevereiro a agosto, sugerindo que a espécie é multivoltina, sendo mais abundante no outono.

Inferência filogenética

Um total de 610 sítios nucleotídicos foram analisados, dos quais 270 (44%) apresentaram variação. A linhagem presente em *P. suterella* foi recuperada como monofilética e altamente divergente em relação a todas as demais (Fig. 8; Tabela 1). As linhagens Neotropicais são distantemente relacionadas àquela de *Psychotria*, incluindo aquelas simpátricas (i.e., ocorrentes na mesma área do CPCN Pró-Mata) ainda não descritas (sp2, sp3 e sp4), hospedeiras de *Drymis*, *Fuchsia* e *Ilex*, e as duas espécies reconhecidas para o Chile, *A. tecomae* e *P. epidrymis*. *Guttigera schefflerella* Kobayashi, Huang & Hirowatari, 2013, uma espécie Paleártica e com ocorrência na planta hospedeira *Schefflera octophylla* (Araliaceae), foi o táxon mais proximamente relacionado aquele de *Psychotria suterella*, embora o suporte do nó (BPP) não seja suficientemente alto, indicando um possível efeito de atração de ramos longos (Fig. 8). A magnitude da divergência genética (utilizando o modelo de distância K2P) foi alta entre todos os pares de linhagens de Oecophyllembiinae, variando de 23,5 a 30% ($\pm 3\%$) (Tabela 2).

Discussão

Essa espécie diferencia-se das demais em Oecophyllembiinae pela ausência de palpos maxilares, em associação a asas anteriores desprovidas de R₁, tendo as veias radiais e medianas com origem independente na célula, e R₄ and R₅ fusionadas próximo a base. Dessa forma, inferimos que o material estudado trata-se de um novo gênero, que está sendo descrito em detalhe (Moreira et al. 2018). De acordo com a análise molecular (DNA mitocondrial) apresentada, envolvendo representantes de todos os gêneros de Oecophyllembiinae conhecidos (e linhagens Neotropicais ainda não descritas), tal espécie diverge geneticamente (K2P) em ca. 25% comparativo as demais, sendo mais proximamente relacionada à *Guttigera schefflerella*.

É comum nas pupas de oecophyllembíneos, a presença de *cocoon-cutter* com processos laterais, como no caso de *Corythoxestis yaeyamensis* Kumata e *Guttigera schefflerella* Kobayashi, Huang & Hirowatari, ou com um par de cerdas robustas como em *A. tecomae* (Kobayashi et al. 2013; Vargas & Parra 2005). Tal característica difere da nova espécie, pois a mesma não apresenta processos ou cerdas fortes laterais à tal estrutura. Os representantes de *Metriochroa* e *Eumetriochroa* podem ser consideradas similares a espécie aqui descrita, pois no primeiro caso apresentam cocoon-cutter simples e triangular (Kobayashi et al., 2013). Além disso, segundo esse último autor, todos os representantes de Oecophyllembiinae apresentam espinhos terciais com apenas um par de cerdas dorsais nos segmentos abdominais, característica também encontrada na espécie aqui descrita. Já a cremaster geralmente apresenta mais de um par de processos caudais, esses ventrais e/ou dorsais. Espécies de *Metriochroa* apresentam dois caudais pares além de processos ventrais (perianais), diferindo da nova espécie que possui apenas um par de pequenos processos caudais em forma de gancho voltados anteriormente, já os processos ventrais na espécie nova estão ausentes.

Busck (1900) propôs o gênero *Metriochroa*, ao descrever *M. psychotriella* (espécie tipo). Esta espécie apresenta como planta hospedeira representantes do gênero *Psychotria*: *P. nervosa* Benth (= *P. lupulina*) e *P. undata* Jacq (De Prins & De Prins, 2018). Segundo a descrição original, em *M. psychotriella*, a larva *spinning* possui cinco pares de pseudopódios, do segundo ao sexto segmento abdominal. No presente caso, entretanto, os pseudopódios são encontrados apenas do terceiro ao sexto segmento abdominal. Ao comparar as larvas da espécie aqui descrita com as demais da região Neotropical, podemos dizer que ela é similar a *A. tecomae*, pois a cabeça da larva *spinning*

de ambas espécies apresentam espinerete alongado, presença de palpos labiais e maxilares desenvolvidos, além de pernas torácicas vestigiais. Porém, *A. tecomae* apresenta calos ambulatórios do terceiro ao sexto segmento abdominal enquanto a espécie aqui descrita possui pseudopódios com crochês em forma de gancho nos mesmos segmentos. *Prophylocnisis epidrimys* também apresenta pseudopódios com crochês nas larvas *spinning*, no entanto, estes se encontram arranjados em uma única fileira na base, diferente da espécie nova, onde estes circundam quase que totalmente os pseudopódios. A larva *sap-feeding* da espécie aqui descrita também é diferente dos demais Oecophyllembiinae descritos para a região Neotropical. Por exemplo: *A. tecomae* não apresenta lobos laterais e *P. epidrimys* apresenta um par de projeções laterais no oitavo segmento abdominal com um processo caudal tripartido.

Cabe ainda ressaltar que essa é a primeira espécie de Oecophyllembiinae que apresenta informações relacionadas ao tipo de tecido usado pela larva, o que impede uma comparação abrangente a respeito, o que deve ser melhor explorado no futuro. A ausência de cerdas na hipofaringe, cujo formato sugere função escavadora é desconhecida para tal morfotipo (*sap-feeding*) em nível de família, e deve ser também melhor explorado.

Referências bibliográficas

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, et al. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Computational Biology* **10**, e1003537.

Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* **61**, 255.

Busck A. 1900. A new of moths of the superfamily Tineina from Florida. *Proceedings of the United States National Museum* **23**, 225-254.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**, 772.

Davis DR. 1994. Neotropical Microlepidoptera XXV. New leaf-mining moths from Chile, with remarks on the history and composition of Phyllocnistinae. *Tropical Lepidoptera* **5**, 65–75.

De Prins J, & De Prins W. Global taxonomic database of Gracillariidae (Lepidoptera). [Acessado em 30 de jan 2018.] Disponível em URL: <http://www.gracillariidae.net>

Drummond, A. & A. Rambaut, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**, 294–299.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL & deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* **270**, 313–321.

Kawahara AY, Plotkin D, Ohshima I, *et al.* 2017. A molecular phylogeny and revised higher-level classification for the leaf-mining moth family Gracillariidae and its implications for larval host use evolution. *Systematic Entomology* **42**, 60–81.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.

Kobayashi S, Huang GH, Nakamura A & Hirowatari T. 2013. Four new species of Gracillariidae (Lepidoptera) from China and Japan, and description of the pupal morphology of the genera *Corythoxestis*, *Eumetriochroa*, *Guttigera* and *Metriochroa*. *Zootaxa* **3619**, 101-129.

Kumata T. 1998. Japanese species of the subfamily Oecophyllembiinae Réal and Balachowsky (Lepidoptera: Gracillariidae), with descriptions of a new genus and eight new species. *Insecta Matsumurana New Series* **54**, 77–131.

Moreira GRP, Brito RA, Fochezato J *et al.* 2018. Three new genera and species of leaf-miner, oecophyllembiine moths (Lepidoptera: Gracillariidae) from the Atlantic Forest. *Austral Entomology* (in prep.).

Paiva JGA, Fank-De-Carvalho SM, Magalhães MP & Graciano-Ribeiro. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica* **20**, 257–264.

Rambaut, A. FigTree v1.2.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. [Acessado 14 Fev 2018.] Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2009

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.

Taylor CM, Zappi DG. Psychotria. 2005. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. [Acessado 23 dez 2018]. Disponível em URL: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14224>

Vargas HA & Parra LE. 2005. Um nuevo género y una nueva especie de Oecophyllembiinae (Lepidoptera: Gracillariidae) de Chile. *Neotropical Entomology* **34**, 227–233.

Legendas das figuras:

Fig. 1. Morfologia dos adultos em microscopia óptica. (a) *habitus*, asas distendidas, macho preservado em alfinete; (b, c) asas anterior e posterior, respectivamente; (d) genitália masculina, vista ventral; (e) edeago em detalhe, ventral; (f) valva esquerda, mesal (direção indicada por ponta de flecha em d); (g) genitália feminina, ventral; (h) papila anal direita em detalhe, ventral. Barras das escalas = 1 (a), 0,2 (b,c), 0,5 (d,f), 0,25mm (g, h).

Fig. 2. Morfologia larval e pupal sob microscopia óptica: (a) larva *sap-feeding*, vista dorsal e ventral, respectivamente; (b) larva *spinning*, dorsal e ventral, respectivamente; (c) pupa, dorsal, ventral e lateral, respectivamente. Barras: 0,5 mm.

Fig. 3. Larva *sap feeding* caracterizada em microscopia eletrônica de varredura: (a,b,d) cabeça, vistas dorsal, ventral e anterior, respectivamente; (c) lábio, ventral (asterisco indica a hipofaringe); (e) labro, dorsal; (f) antena, anterior; (g) tórax, ventral; (h) espiráculo mesotorácico (indicado por ponta de flecha), latero-dorsal; (i) segmentos abdominais A1-3, ventral; (j) detalhe do lobo lateral (indicado pelo retângulo vermelho em i), ventral; (k) corrugações do mesotórax em detalhe (indicado pelo asterisco em g), ventral; (l) último segmento abdominal, ventral. Escala das barras: 100 (a, b, g, l), 20 (c, e, k), 50 (d, h, j), 10 (f), 200µm (i).

Fig. 4. Larva *spinning* caracterizada em microscopia eletrônica de varredura: (a,b) cabeça, vistas dorsal e ventral, respectivamente; (c) palpo maxilar, lateral; (d) antena, ventral; (e) labro, dorso-lateral; (f) lábio, postero-ventral; (g) perna torácica, lateral; (h) detalhe do terceiro segmento abdominal, dorsal; (i) pseudopódio, ventral; (j) detalhe dos crochês, ventral; (k-l) último segmento abdominal, dorsal e lateral, respectivamente. Escala das barras: 100 (a, b), 10 (c,d), 20 (e, f, h, k), 50 (g), 25 (i, l), 5µm (j).

Fig. 5. Pupa caracterizada em microscopia eletrônica de varredura: (a) cabeça, vista ventral; (b-c) *cocoon-cutter*, dorsal e lateral, respectivamente; (d-e) ápice de cerda cefálica em detalhe, lateral; (f) clipeo, ventral; (g) metatórax, dorsal; (h) cavidade do metatórax em detalhe, dorsal; (i) espiráculo do sexto segmento abdominal, lateral; (j) segmentos abdominais A6-8, lateral; (k, m) último segmento abdominal, dorsal e ventral, respectivamente; (l) espinho dorsal do cremaster em detalhe, lateral. Escala das barras: 200 (a, g), 50 (b, c, f, m), 20 (h), 10 (d, i), 100(j, k), 5µm (e, l).

Fig. 6. História de vida: (a) planta hospedeira, *Psychotria suterella* na localidade tipo; (b) folha com uma única mina na face adaxial; (c) larva *sap-feeding*, vista dorsal; (d) larva *spinning*, latero-dorsal; (e) pupa, dorsal; (f) casulo pupal, dorsal; (g) exúvia pupal protraída do casulo. Escala das barras: 1cm (b), 500µm (c-g).

Fig. 7. Cortes histológicos transversais da mina foliar em *Psychotria suterella*. (a) porção intermediária (indicada por linha tracejada na fig. 6b); (b) detalhe da porção intermediária (indicada por seta em a; pontas de flechas indicam fragmentos celulares do parênquima paliçádico); (c) porção final (indicada por linha contínua em 6b). Asterisco indica mina

foliar. **Ab**, epiderme abaxial; **Ad**, epiderme adaxial; **Pp**, parênquima paliçádico; **Sp**, parênquima esponjoso. Barras das escalas = 100 (a, c), 25 μ m (b).

Fig. 8. Árvore Bayesiana consenso de máxima credibilidade para Oecophyllembiinae reconstruída com base em 610 pares de base do gene citocromo oxidase c subunidade I (COI). Os números acima dos ramos indicam a probabilidade posterior (BPP) para o respectivo nó. A linhagem marcada em azul representa os espécimes coletados em *Psychotria suterella*. *Marmara* spp. (Marmarinae) foram utilizadas para enraizar a árvore (ver Tabela 1).

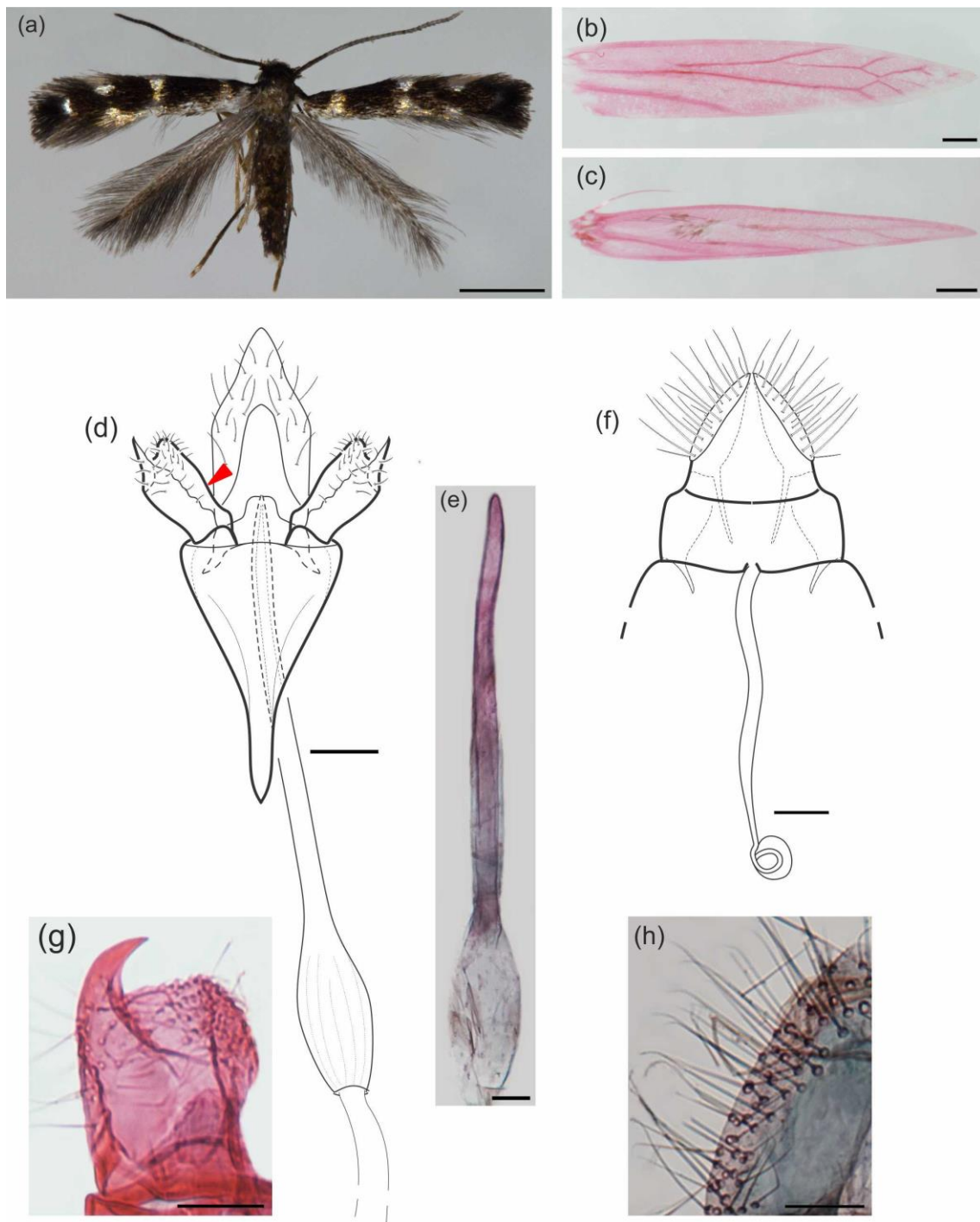
Tabela 1. Espécimes utilizados para inferir as relações da linhagem de Gracillariidae ocorrente em *Psychotria suterella* dentro da subfamília Oecophyllembinae.

Grupo	Espécie	Planta hospedeira	Região de Ocorrência	Voucher	Acesso Genbank*
Interno					
	<i>Angelabella tecomae</i>	<i>Tecoma fulva</i> (Bignoniaceae)	Neotropical		KM983605
	<i>Corythoestis sunosei</i>	<i>Adina pilulifera</i> , <i>Mussaenda</i> spp. e <i>Uncaria rhynchophylla</i> (Rubiaceae)	Paleártica	LMCI 280-5	ASD
	<i>Eumetriochoa hiranoi</i>	<i>Styrax japonicus</i> (Styracaceae)	Paleártica	LMCI 280-2	ASD
	<i>Eumetriochoa hederæ</i>	<i>Hedera</i> spp. (Araliaceae)	Paleártica	LMCI 280-7	ASD
	<i>Guttigera schefflerella</i>	<i>Schefflera octophylla</i> (Araliaceae)	Paleártica	LMCI 280-13	ASD
	<i>Metriochoa fraxinella</i>	<i>Fraxinus</i> spp. e <i>Ligustrum</i> spp. (Oleaceae)	Paleártica	LMCI 280-11	ASD
	Oecophyllembiinae sp.1	<i>Psychotria suterella</i> (Rubiaceae)	Neotropical	LMCI 292-30	ASD
				LMCI 292-31A	ASD
	Oecophyllembiinae sp.2	<i>Ilex paraguariensis</i> (Aquifoliaceae)	Neotropical	LMCI 283-33A	ASD
				LMCI 283-33E	ASD
				LMCI 283-51A	ASD
	Oecophyllembiinae sp.3	<i>Drimys angustifolia</i> (Winteraceae)	Neotropical	LMCI 194-5-1	ASD
				LMCI 194-5-4	ASD
	Oecophyllembiinae sp.4	<i>Fuchsia regia</i> (Onagraceae)	Neotropical	LMCI 283-77A	ASD
				LMCI 283-77B	ASD
	<i>Prophylocnistis epidrimys</i>	<i>Drimys winteri</i> (Winteraceae)	Neotropical	LMCI 286-9	ASD
Externo					
	<i>Marmara arbutiella</i>	-	Neártica	-	FJ412783
	<i>Marmara serotinella</i>	-	Neártica	-	KR450137

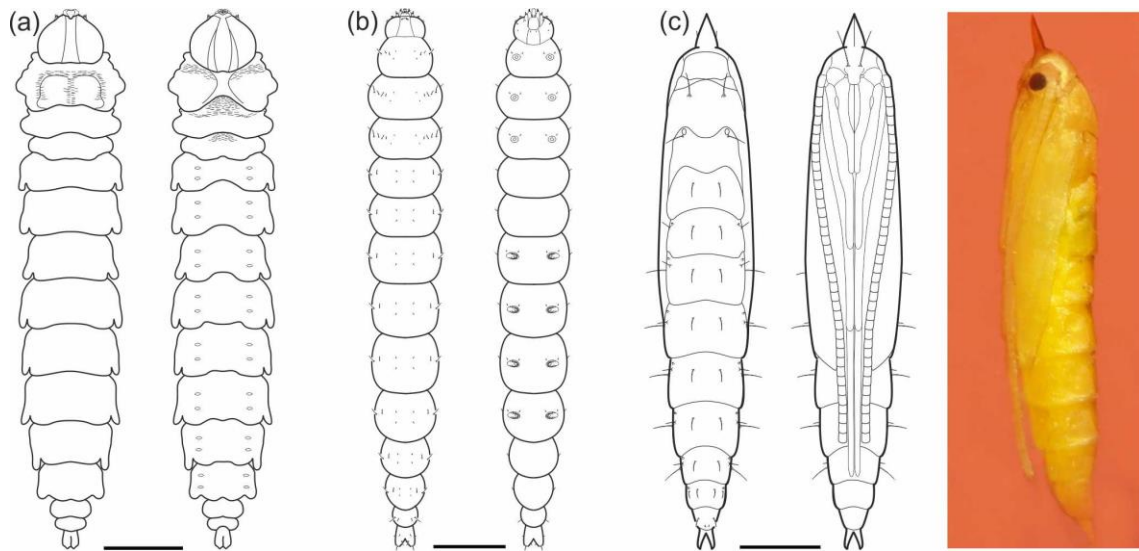
*ASD: a ser depositado

Tabela 2. Estimativa da distância genética (em porcentagem) entre pares de sequências (610 pb do gene Citocromo oxidase I) de linhagens de Oecophyllembiinae (Lepidoptera: Gracillariidae) utilizando o modelo Kimura 2P. As comparações que incluem a linhagem de *Psychotria suterella* é destacada em negrito.

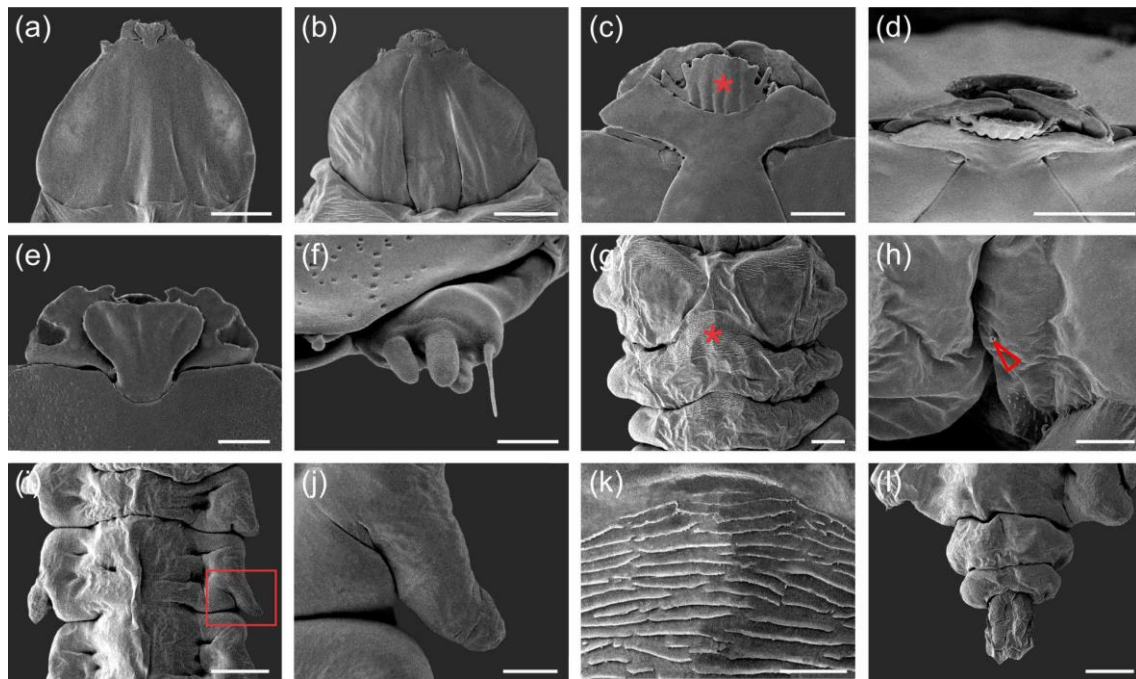
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
1.	<i>Angelabella tecomae</i>	-										
2.	<i>Corythroxestis sunosei</i>	18%	-									
3.	<i>Eumetriochoa hederæ</i>	17%	20%	-								
4.	<i>Eumetriochoa hiranoi</i>	17%	19%	14%	-							
5.	Oecophyllembiinae sp.3	17%	18%	17%	16%	-						
6.	Oecophyllembiinae sp.4	18%	17%	20%	17%	18%	-					
7.	Oecophyllembiinae sp.2	19%	17%	16%	13%	15%	18%	-				
8.	Oecophyllembiinae sp.1	27%	30%	27%	23%	26%	27%	28%	-			
9.	<i>Guttigera schefflerella</i>	25%	22%	25%	23%	25%	23%	21%	27%	-		
10.	<i>Metriochoa fraxinella</i>	17%	14%	16%	14%	16%	16%	16%	24%	20%	-	
11.	<i>Prophylocnistis epidrimys</i>	17%	23%	18%	17%	20%	18%	19%	28%	30%	19%	-



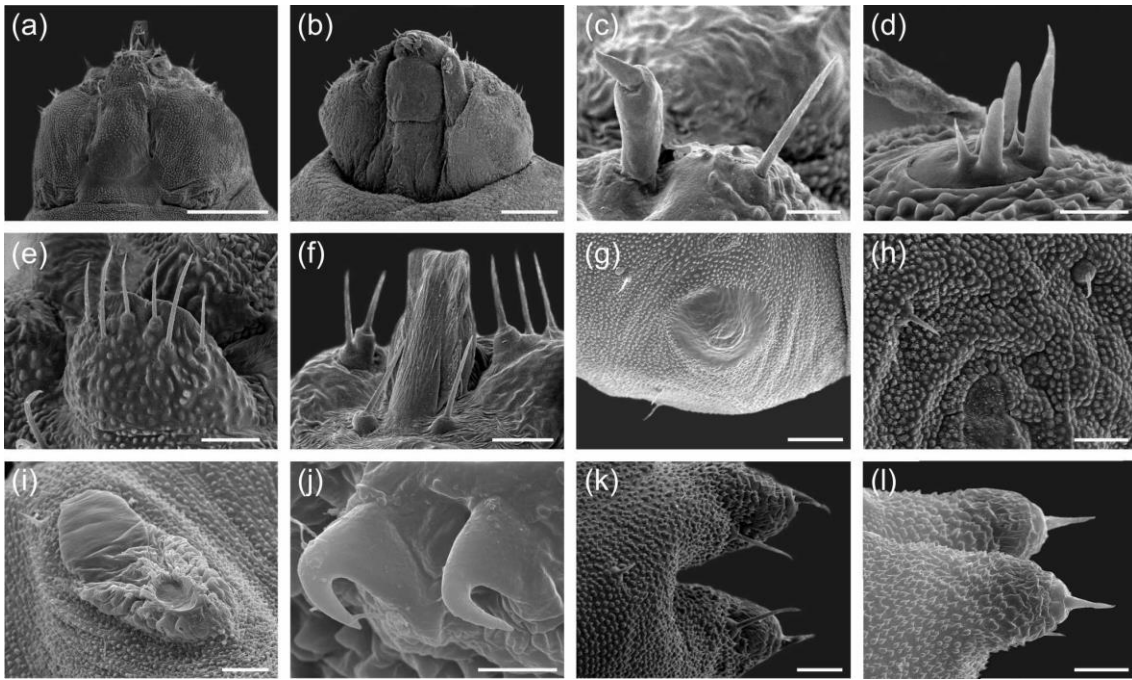
Fochezato et al. – Figura 01.



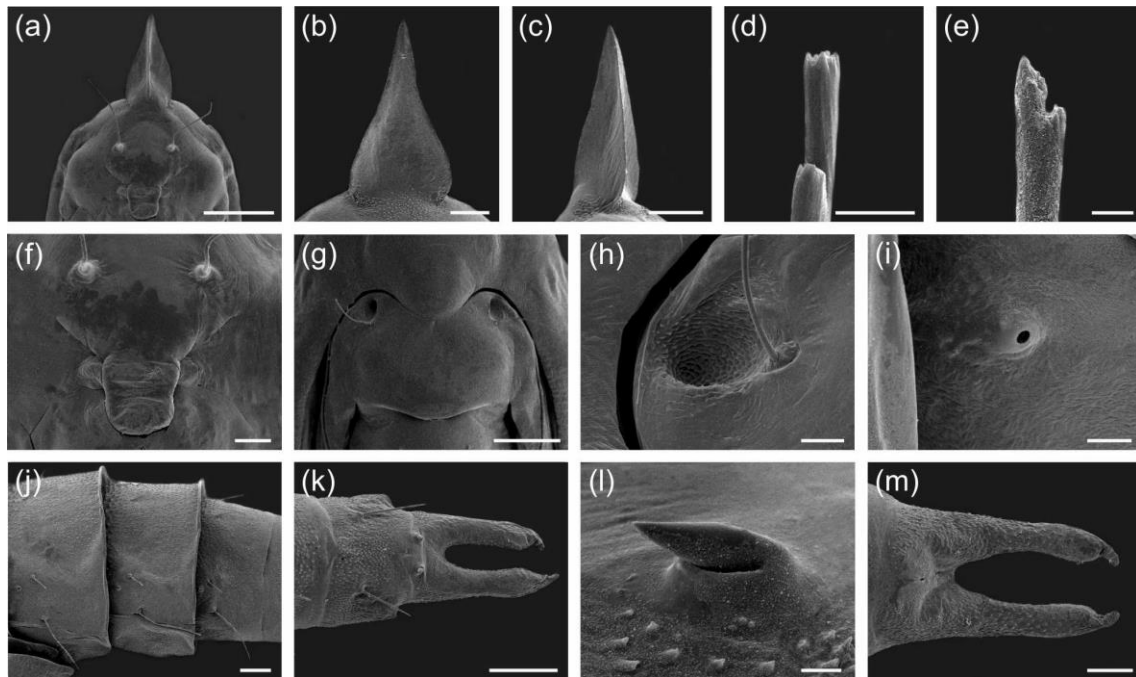
Fochezato et al. – Figura 02.



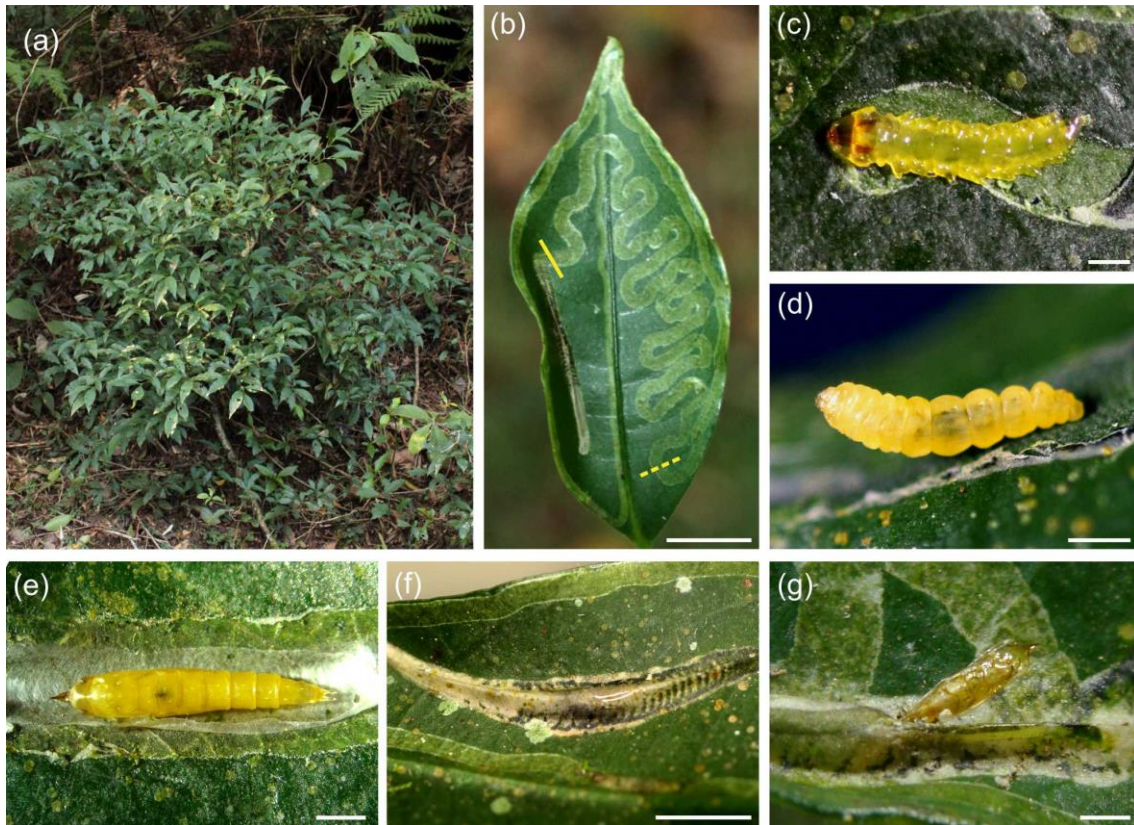
Fochezato et al. – Figura 03.



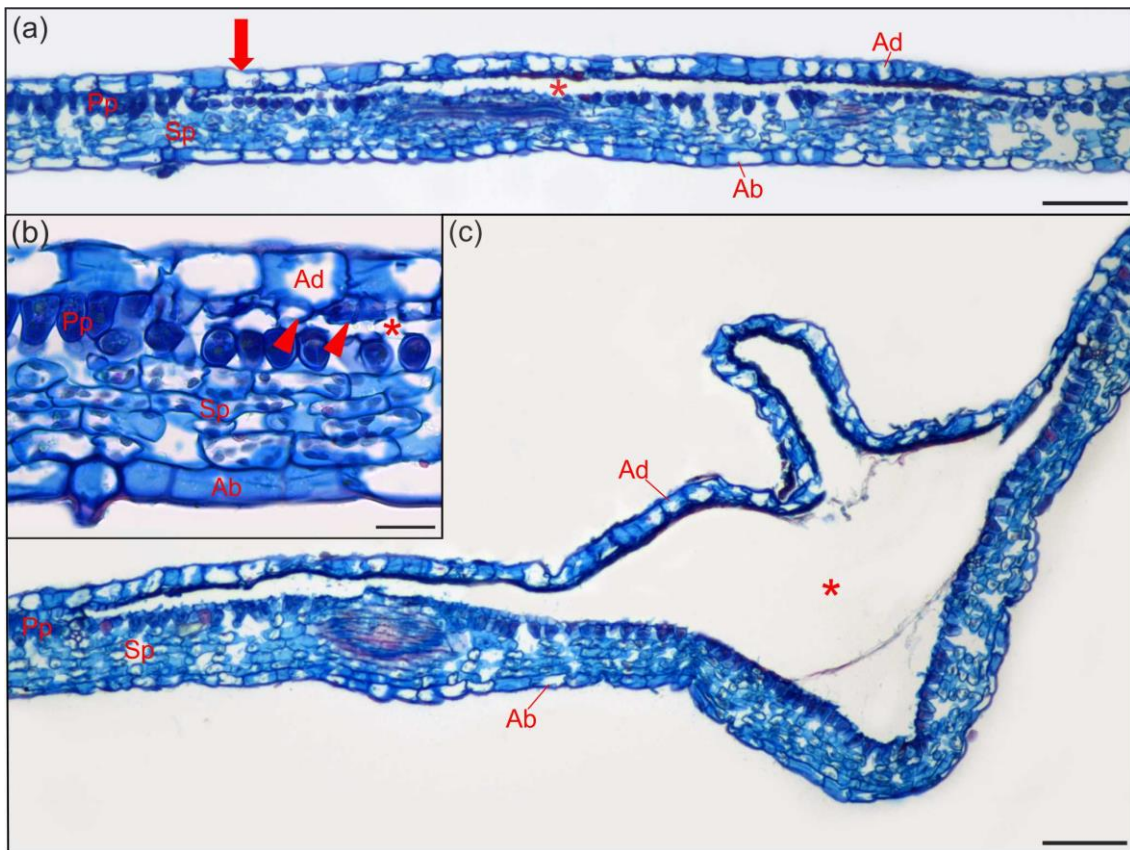
Fochezato et al. – Figura 04.



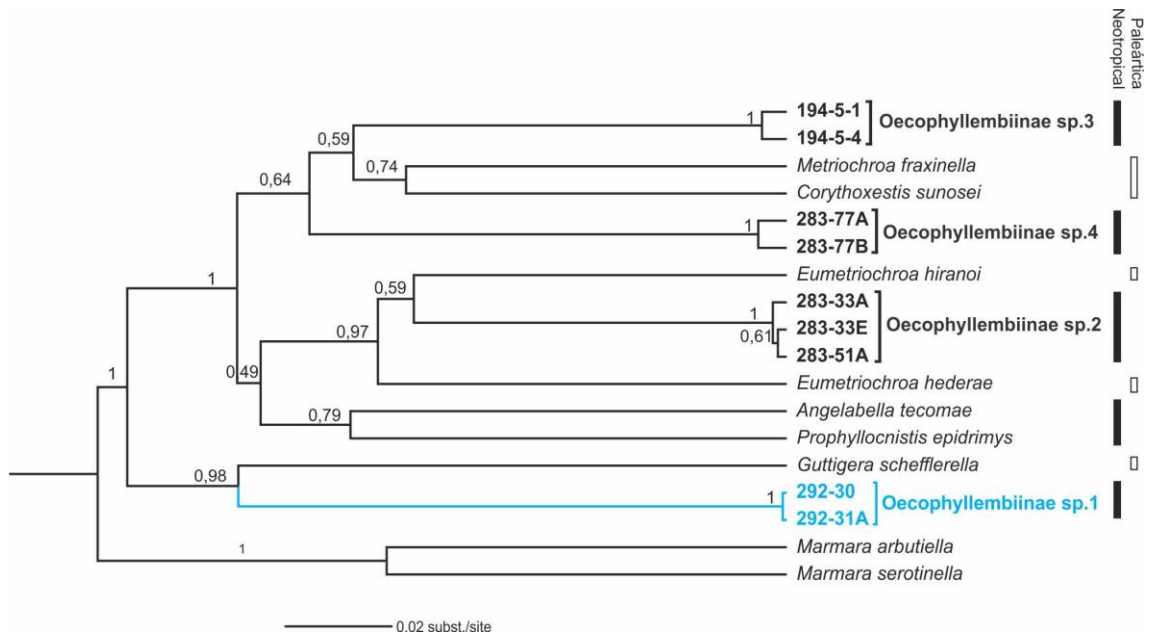
Fochezato et al. – Figura 05.



Fochezato et al. – Figura 06.



Fochezato et al. – Figura 07.



Fochezato et al. – Figura 08.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram descritas, de forma inédita, os estágios imaturos de duas novas espécies de microlepidópteros minadores foliares de Gracillariidae encontradas no sul do Brasil, os quais tem como hospedeiras plantas das famílias Thymeleaceae e Rubiaceae. A descrição dos estágios adultos de ambas bem como a caracterização taxonômica correspondentes constam de trabalho em colaboração, sendo em relação a primeira já publicado (*Phyllocnistis hemera* Brito & Fochezato), e da segunda, em andamento. A primeira espécie pertence a Phyllocnistinae e ao gênero *Phyllocnistis* e foi encontrada se alimentando em folhas *Daphnopsis fasciculata* (Meisn.) Nevling. Já a segunda, pertencente provavelmente a um novo gênero de Oecophyllembiinae, foi encontrada se alimentando em folhas de *Psychotria suturella*, ambas no sul do Brasil.

Phyllocnistis hemera é uma das nove espécies do gênero descritas para o Brasil e o primeiro gracilarídeo associado a uma planta da família Thymeleaceae. Ela compartilha com as demais espécies do grupo o padrão de coloração como as fâscias e estrígulas nas asas anteriores. Além disso, destacam-se na genitália, a forma das valvas nos machos. Outra exclusividade desta espécie é a presença de uma única estema seguida por uma microcerda nas larvas do tipo *sap-feeding*. Em relação a mina foliar, pode-se verificar que a mesma se encontra na face adaxial, com formato serpenteante, característica comum do grupo, extensivo ao casulo que é construído na porção final da mina, causando um dobramento na folha. Foi demonstrado através da análise de cortes histológicos que a alimentação inicia no tecido subepidérmico da folha, ficando restrita posteriormente ao parênquima paliçádico ao longo do desenvolvimento da larva.

O terceiro capítulo contemplou a descrição dos imaturos de uma espécie de Oecophyllembiinae, a primeira a ser assinalada para a subfamília no Brasil, sendo o segundo representante dessa associado a *Psychotria*. O padrão de coloração correspondente é escuro com manchas prateadas, considerado comum para os representantes dessa subfamília. Quanto a mina foliar, é adaxial e serpenteante não sendo formado rastros de fezes, que são depositadas de forma desordenada ao longo do desenvolvimento. O casulo pupal é construído no final da mina e também causa um dobramento na folha, porém no sentido dorsal. Já a alimentação dessa espécie se restringe

ao parênquima paliçádico durante todos os estágios larvais. De forma atípica para a família, foi verificada na larva sap-feeding desta espécie uma hipofaringe modificada, do tipo escavadora/raspadora, o que deve ser melhor explorado.

As espécies ora descritas para o estado do Rio Grande do Sul quanto aos estágios imaturos, dentro do bioma Mata Atlântica, evidenciam a grande diversidade gracilarídeos, de plantas hospedeiras usadas e respectivos hábitos alimentares nesse bioma, porém até então desconhecidos, cuja exploração deve ser continuada.

CAPÍTULO V

ANEXOS

- 1) Normas para publicação na Revista Brasileira de Entomologia:

Form and preparation of manuscripts

Manuscripts should be in English, preferably proofread by a native English speaker. Manuscript length should not exceed 80 pages, including figures. In the case of longer manuscripts, authors should consult the Editorial Board previous to submission.

Manuscripts should be edited in Microsoft Word®, on A4 size paper, double spaced, and using Times New Roman font size 12; the right margin should not be justified and the pages should be numbered consecutively. The font Times New Roman should also be used for labeling figures and graphs. Only graphs and tables should be incorporated to the text file, at the end.

The main document should have a title page containing the title and name(s) of author(s) followed by number(s) for remission to the footnote. The footnote should contain the complete address(es) of the author(s), including e-mail, and other pertinent information, if necessary. Words entirely in upper case should not be employed, except as indicated below. Author affiliations should be presented in decreasing hierarchical order (e.g. Harvard University, Harvard Business School, Boston, USA) and should be written as established in its own language (e.g. Université Paris-Sorbonne; Harvard University, Universidade de São Paulo). The ABSTRACT should have a maximum of 250 words, presented as one paragraph; KEYWORDS must be organized alphabetically and at most five keywords. Words already included in the title should not be used as keywords.

Scientific names should be followed by author and date of publication at the first mention of these taxa in the manuscript. Genus- and species-group names must be written using italics. Any other markings or signs as to emphasize or call attention should not be used.

The Editorial Board will decide on how to proceed for particular cases in manuscripts of subject areas other than Systematics, Morphology and Biogeography.

Text: All citations in the text should refer to: 1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication; 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown". The ACKNOWLEDGMENTS should be placed at the end of the text, immediately preceding the REFERENCES. Authors are encouraged to be succinct.

– Illustrations: photographs, drawings, graphs and maps are called figures and should be numbered consecutively (using Arabic numerals) and, preferably, in the same sequence in which they are referred to in the text. Scale-bars should be positioned either vertically or horizontally. Tables (numbered with Roman numerals) should be presented in separate pages at the end of the manuscript. If necessary, graphs may also be included in the main document at the end. Illustrations files must be uploaded separately from the main document, with at least 300 dpi for color images and 600 dpi for bitmap and black and white images, in tiff or low compression jpeg format. Figure numbers should be in Times New Roman font size 11 and positioned at the lower right corner. Labeling applied to figures (numbers, letters and words) should also be in Times New Roman and in an appropriate size in order that, after reduction, they remain clearly visible without becoming more prominent than the illustrations themselves. The Editorial Board can make small modifications or ask the author(s) for a new plate. Figure legends should be included in the main document.

Data references: This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article. [dataset]

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

Use the following examples when preparing the REFERENCES section. They should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters “a”, “b”, “c”, etc., placed after the year of publication. Examples:

1. Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.
2. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.
3. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.
4. Internet sites. Gilligan, T.M., Baixeras, J., Brown J.W., Tuck, K.R., 2012. T@RTS: Online World Catalogue of the Tortricidae (Ver. 2.0). Available at: <http://www.tortricid.net/catalogue.asp>. (accessed 25 Nov 2014).

Citations of meeting abstracts and unpublished theses and dissertations should be avoided.

Short Communications: Short notes must report elaborated work that incorporates the same aspects required for full articles (biology, ecology, behavior, systematics, pest management, etc.). Manuscripts of anecdotal nature will not be accepted. Papers that merely report new geographic occurrences, records of species or host associations to new localities in geographical regions that they are already known will not be considered. Short Communications should be prepared as a single text and references, including also an Abstract and Keywords. Do not include subtitles (Introduction, Material and Methods, and Results and Discussion). Figures and tables will be limited to a maximum of 3 objects per manuscript. Important: RBE will consider the limited number of two Short Communications per issue.

Voucher policy: RBE encourages authors to deposit voucher and type specimens in public museums or permanent University collections. It is advisable that authors, at time of submission, clearly state in the manuscript where their material is expected to be deposited. Labeling and proper indication of voucher specimens are the author's responsibility.

Author's responsibility: Page proofs are sent to the corresponding author and should be returned, with the necessary corrections, at the indicated deadline. Authors are entirely responsible for the scientific content of the paper, as well as for proper use of grammar. Authors are encouraged to look at the latest issues of the RBE to check current format and layout. When submitting the manuscript, the author may suggest potential reviewers. Please, include the complete name, mailing and electronic addresses of suggested reviewers. The choice of reviewers, however, remains with the Editors.

2) Normas para publicação na Revista Austral Entomology:

4. PREPARING YOUR MANUSCRIPT

Style and Formatting

For submission, the manuscript should preferably be submitted as a single file, with the figures embedded as low resolution files. Tables and figures should be inserted at the end of the manuscript. Name the manuscript file as: **authorname.doc**.

- Submissions should be typed in 12 pt Times New Roman and have 1.5 line spacing.
- All margins should be set to 2.5 cm.
- The first paragraph under each heading is not indented; indent following paragraphs, with no blank line between paragraphs.
- Ensure that all mark-up ('Track Changes') done during manuscript preparation is removed ('Accept All Changes' on Reviewing Toolbar) so that reviewers have a clean copy on which to insert suggested changes and comments.

Abbreviations and Units

SI units (metre, kilogram etc.), as outlined in the latest edition of *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors* (Royal Society of Medicine Press, London), should be used wherever possible. Give statistics and measurements in figures; that is, 10 mm, except where the number begins the sentence. When the number does not refer to a unit measurement, it is spelt out, except where the number is greater than nine. Use only standard abbreviations. Shorten the word 'Figure' to Fig. unless starting a sentence.

The journal uses Australian spelling and authors should therefore set the Language in MS Word to English (Australia) (accessible under the Tools menu in MS Word) and follow the latest edition of the Macquarie Dictionary. Manuscripts that do not conform to this requirement and the following format will be returned to the author prior to review for correction.

Parts of the Manuscript

Title page

The title page should contain:

- (i) an informative title that contains the major key words. The title should contain the scientific name of the insect, with the order and family placed in parentheses;
- (ii) the full names of the authors;
- (iii) the author's institutional affiliations at which the work was carried out;
- (iv) a short running title of less than 50 characters including spaces.
- (iv) the email address of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent.

Abstract

All manuscripts must include a brief but informative abstract intelligible without reference to the main text. It should not exceed 350 words and should describe the scope of the work and the main findings. Both common and scientific names of the insect should be included. Authorities to species names are not required except for taxonomic papers. References to the literature should not be included. Use the passive voice in the Abstract. DO NOT use the uninformative phrase 'Results are discussed.'

Key Words

Up to 10 additional key words should be provided below the Abstract.

Main Text Sections

- *Introduction:* This section should include sufficient background information to set the work in context. The aims and goals of the manuscript should be clearly stated. The introduction should not contain findings or conclusions.
- *Materials and Methods:* This should be concise but provide sufficient detail to allow the work to be repeated by others.
- *Results:* This should be presented in a logical sequence in the text, tables and figures; repetitive presentation of the same data in different forms is not permissible. The results should not contain material appropriate to the Discussion.

- *Discussion*: This should consider the results in relation to any hypotheses advanced in the Introduction and place the study in the context of other work.

Details of sections required in taxonomic papers are set out here: [Template for Taxonomic Papers](#).

Acknowledgements

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the author's industrial links and affiliations. Financial and technical assistance may be acknowledged here. If tables or figures have been reproduced from another source, or copyright is not held by any of the authors, then written permission from the copyright holder must be mentioned in the Acknowledgements. Do not acknowledge anonymous reviewers.

References

The Harvard (author, date) system of referencing is used.

- In the text give the author's name followed by the year in parentheses: Sago (2000).
- When reference is made to a work by three or more authors, the first name followed by *et al.* should be used: Powles *et al.* (1998).
- Within parentheses, groups of references should be cited in chronological order.
- Personal communication, unpublished data and publications from informal meetings are not to be listed in the reference list but should be listed in full in the text (e.g. Smith A, 2000, unpublished data).
- Titles of journals should be given in full.
- If several manuscripts by the same author(s) and from the same year are cited, a, b, c etc. should be put after the year of publication.
- 'In press' should only be used to cite manuscripts actually accepted for publication in a journal. Citations such as 'manuscript in preparation' or 'manuscript submitted' are not permitted. Data from such manuscripts can only be mentioned in the text as 'unpublished data'.
- References should be listed in alphabetical order at the end of the manuscript.
- Cite the names of all authors when there are six or fewer; when seven or more cite the

first three plus *et al.*

- Authors are responsible for the accuracy of the references.

References should be listed in the following form:

Journal articles

North RC & Shelton AM. 1996. Ecology of Thysanoptera within cabbage fields. *Environmental Entomology* **15**, 520–526.

Books

Eberhard WG. 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press, Harvard.

Chapters in books

Bray RA. 1994. The leucaena psyllid. In: *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture* (eds RC Gutteridge & HM Shelton) pp. 283–291. CAB International, Oxford.

Website

Bureau of Meteorology. 2014. Southern Oscillation Index Archives – 1876 to present. Available from URL: <http://www.bom.gov.au/climate/current/soihtm1.shtml> [Accessed 5 March 2014]

Tables

Tables must be constructed using the ‘Table’ function of your word processor and must not have the Enter key used in any cell. Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals. Each table should be presented on a separate page at the end of the text with a comprehensive but concise legend above the table. Tables should be double-spaced and vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations should be defined in footnotes. Use superscript letters (not numbers) for footnotes and keep footnotes to a minimum. *, **, *** should be reserved for *P*-values. The table and its legend/footnotes should be understandable without reference to the text.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Only scientifically necessary illustrations should be included. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration. Figures should be cited in consecutive order in the text.

Preparing Figures: Although we encourage authors to send us the highest-quality figures possible, for peer-review purposes we are happy to accept a wide variety of formats, sizes, and resolutions.

Click [here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Colour figures: Figures submitted in colour may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If you wish to have figures printed in colour in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher. A charge of AUD\$150 for the first colour figure and AUD\$50 for each extra colour figure thereafter will be charged to the author (quoted prices include GST).