

VINICIUS DA SILVA VALADÃO

Taxonomia integrativa de *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae) da Mata Atlântica brasileira e novo registro de *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962)

Integrative taxonomy of *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae) from the Brazilian Atlantic Rainforest and new records for *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962)

v. único

SÃO PAULO

2023

VINICIUS DA SILVA VALADÃO

Taxonomia integrativa de *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthocladiinae) da Mata Atlântica brasileira e novo registro de *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962)

Integrative taxonomy of *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthocladiinae) from the Brazilian Atlantic Rainforest and new records for *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962)

v. único

Versão corrigida

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade).

Orientador (a): Prof. Dr. Carlos José Einicker Lamas

Coorientador (a): Prof. Dr. Humberto Fonseca Mendes

SÃO PAULO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

Valadão, Vinicius da Silva

Taxonomia integrativa de *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthocladiinae) da Mata Atlântica brasileira e novo registro de *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962). = Integrative taxonomy of *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthocladiinae) from the Brazilian Atlantic Rainforest and new records for *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962). / Vinicius da Silva Valadão; orientador Carlos Einicker Lamas; coorientador Humberto Fonseca Mendes. São Paulo, 2023.
93p.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Museu de Zoologia Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade).

Versão corrigida

Volume único

1. Diptera - Chironomidae – Mata Atlântica - Brasil. 2. *Bryophaenocladus carus* - Diptera. 3. Chironomidae, Orthocladiinae. I. Lamas, Carlos José Einicker. orient.; Mendes Humberto Fonseca, coorient. I. Título.

CDU 595.771(81)

[VALADÃO, Vinicius da Silva]

Integrative taxonomy of *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae) from the Brazilian Atlantic Rainforest and new records for *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962)

Taxonomia integrativa de *Antillocladius* Sæther, 1981 (Insecta: Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae) da Mata Atlântica brasileira e novo registro de *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade).

Data de aprovação: ____/____/____

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Decisão: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Engelberto e Rosana e minha irmã Jéssica, que sempre apoiaram a minha decisão de me tornar cientista, por além do amparo e aporte, pelas vezes que também contribuíram diretamente com a minha pesquisa. Obrigado por tudo, amo vocês!

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos José Einicker Lamas e Prof. Dr. Humberto Fonseca Mendes, por todo suporte e ensinamento que me proporcionaram para a execução desse trabalho, pela amizade e confiança.

Ao programa de pós-graduação “Sistemática, Taxonomia Animal e Biodiversidade – STBio” do Museu de Zoologia da USP que possibilitou toda infraestrutura necessária. A coordenação da pós, hoje representada pelo Prof. Dr. Marcelo Fukuda. A secretaria, Selma, Marta e Sônia, a biblioteca, Dione e Viviane. A Camila Conti, técnica do Laboratório de Diptera que me auxiliou de diversas maneiras durante o mestrado. E a todos os funcionários do Museu de Zoologia que me ajudaram de alguma forma.

A Dra. Jaqueline Battilana técnica do laboratório de Biologia Molecular do MZUSP, que além de me ensinar todos os procedimentos de biologia molecular executados nesse estudo, desde a extração até a purificação das amostras é colaboradora do presente trabalho. A Dra. Jessica Colavite, colega do Laboratório de Carcinologia que incansavelmente contribuiu com análises filogenéticas apresentadas aqui, um muito obrigado!

Ao Dr. Leo Ferrington (*in memoriam*), ao Dr. Trond Andersen e ao Dr. Xuankun Li, que prontamente me auxiliaram com alguns trabalhos necessários para compor a bibliografia contida nesse estudo.

Aos amigos e colegas de laboratório e do Museu de Zoologia Lívia, Lucas, Luanna, Carol Garcia, Neto, Mayara, Rodrigo (Primo), Jonatas e Manu, Isa e Rafa Fernandes (PY2RCF) que me ajudaram bastante com as pranchas, pela troca de vivências e dicas nas várias fases do mestrado e a todos os outros cujo nome não está aqui, mas que direta ou indiretamente participaram comigo dessa jornada, valeu galera!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa com a chamada CNPq/MCTI/CONFAP-FAPS – Programa de Apoio a Projetos de Pesquisas para a Capacitação e Formação de Recursos Humanos em Taxonomia Biológica – PROTAX N.º 22/2020 (Processo 441410/2020-0) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2021/08741-6).

RESUMO

O gênero *Antillocladius* Sæther, 1981 compreende hoje 32 espécies descritas, sendo que 24 ocorrem na região Neotropical. Destas, além dos machos adultos, somente quatro possuem as pupas descritas em literatura (*A. antecalvus* Sæther, 1981, *A. folius* Mendes, Andersen & Sæther, 2004, *A. musci* Mendes, Andersen & Sæther, 2004 e *A. pluspilalus* Sæther, 1982), três as larvas (*A. folius*, *A. musci* e *A. pluspilalus*) e apenas duas têm as fêmeas conhecidas (*A. antecalvus* e *A. musci*). Tal cenário evidencia a necessidade de conhecer mais profundamente o ciclo de vida das espécies e estabelecer associações entre os semaforontes. Pelo fato de que poucos trabalhos descrevem todos os estágios de vida dos quironomídeos, nosso intuito foi associar os diferentes semaforontes, descrevendo imaturos e fêmeas de espécies já conhecidas apenas pelos machos adultos. A partir da criação isolada de larvas e pupas em laboratório até a emergência dos adultos, descrevemos também, novas espécies com todos os semaforontes associados. Assim como, com a técnica de DNA Barcoding, foi possível extrair, amplificar e sequenciar a subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI) a fim de montar uma biblioteca com dados moleculares para auxiliar em futuros estudos filogenéticos, no reconhecimento das espécies e nas associações específicas de diferentes semaforontes. O material analisado foi coletado em musgos e líquens sobre árvores, acondicionado em placas de Petri e mantido em temperatura ambiente em laboratório onde várias larvas foram isoladas e observadas diariamente até emergirem. Descrevemos os imaturos e fêmea de *A. brazuca* e três novas espécies com base no macho adulto associados aos seus imaturos, incluímos também as sequências do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) dessas três novas espécies e de algumas espécies já conhecidas de *Antillocladius* Sæther. Uma nova ocorrência para *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962), no Brasil, foi assinalada e suas sequências de COI foram obtidas e apresentadas. Análises filogenéticas foram implementadas a partir desses dados moleculares a fim de relacionar o parentesco entre as espécies aqui estudadas. Os resultados obtidos a partir das análises de Poisson Tree Processes” (PTP) indicam que os limites das espécies, como atualmente estão definidos a partir de caracteres morfológicos, precisam ser reavaliados: *A. musci*, por exemplo, apareceu como um conglomerado de três linhagens distintas, o que deve resultar na sua fragmentação em três espécies diferentes; situação semelhante foi observada em *A. brazuca*, que deverá ser dividida em duas espécies; e a própria *A. sp. n. 1*, pode ser considerada de uma a três espécies a depender da análise aplicada.

Palavras-chave: Chironomidae, *Antillocladius* Sæther, *Bryophaenocladus carus* (Roback)
Taxonomia, Semaforontes.

ABSTRACT

The genus *Antillocladius* Sæther, 1981 now comprises 32 described species, 24 of which occur in the Neotropics. Of these, apart from adult males, only four have pupae described in the literature (*A. antecalvus* Sæther, 1981, *A. folius* Mendes, Andersen & Sæther, 2004, *A. musci* Mendes, Andersen & Sæther, 2004 and *A. pluspilalus* Sæther, 1982), three have larvae (*A. folius*, *A. musci* and *A. pluspilalus*) and only two have known females (*A. antecalvus* and *A. musci*). This scenario highlights the need to learn more about the life cycle of the species and to establish associations between semaphorons. As few studies have described all life stages of chironomids, our aim was to associate the different semaphores and to describe immatures and females of species previously known only from adult males. From the isolated rearing of larvae and pupae in the laboratory to the emergence of adults, we also described new species with all their associated semaphorons. Using the DNA barcoding technique, it was also possible to extract, amplify and sequence subunit I of the mitochondrial cytochrome oxidase gene (COI) to build up a library of molecular data to aid future phylogenetic studies, species recognition and the specific associations of different semaphorons. The material analysed was collected from mosses and lichens on trees, placed in petri dishes and kept at room temperature in the laboratory, where several larvae were isolated and observed daily until they emerged. We describe the immatures and the female of *A. brazuca* and three new species based on the adult male associated with its immatures. We also include the sequences of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene of these three new species and of some already known species of *Antillocladius* Sæther. A new occurrence of *Bryophaenocladus carus* (Roback, 1962) in Brazil was noted and its COI sequences were obtained and presented. Phylogenetic analyses were performed on the basis of these molecular data in order to establish the relationship between the species studied here. The results of the Poisson Tree Processes (PTP) analyses indicate that species boundaries, currently defined on the basis of morphological characters, need to be re-evaluated: *A. musci*, for example, appeared as a conglomerate of three different lineages, which should lead to its fragmentation into three different species; a similar situation was observed for *A. brazuca*, which should be split into two species; and *A. sp. n. 1* itself can be considered as one to three species, depending on the analysis applied.

Keywords: Chironomidae, *Antillocladius* Sæther, *Bryophaenocladus carus* (Roback), Taxonomy, Semaphorons.

1. INTRODUÇÃO

Diptera é uma das quatro maiores ordens de Insecta (Grimaldi & Engel, 2005) e é composta por insetos popularmente conhecidos no Brasil como: moscas, mutucas, maruins, pernilongos, carapanãs, borrachudos, mosquitos e afins. Também é um dos grupos mais diversos tanto ecologicamente quanto na riqueza de espécies (Pinho, 2008). A infraordem Culicomorpha dentro de Diptera compreende as famílias, Ceratopogonidae, Chaoboridae, Chironomidae, Culicidae, Corethrellidae, Dixidae, Nymphomyiidae, Simuliidae e Thaumaleidae (*sensu* Sæther 2000a). Dentre essas famílias, Chironomidae será objeto de nossos estudos.

Os quironomídeos fazem parte da maior e mais frequente família de insetos aquáticos (Pinder, 1986; Cranston, 1995). É composta por onze (11) subfamílias, sendo elas Telmatogetoninae Wirth, 1949, Aphroteniinae Brundin, 1966, Podonominae Thienemann, 1937, Usambaromyiinae Andersen & Sæther, 1994, Tanypodinae Thienemann & Zavřel, 1916, Chilenomyiinae Brundin, 1983, Buchonomyiinae Brundin & Sæther, 1978, Diamesinae Kieffer, 1921, Prodiamesinae Sæther, 1976, Orthocleriinae Edwards, 1929 e Chironominae Newman, 1834 (Sæther, 2000b). A região neotropical apresenta registro de 10 subfamílias, sendo, portanto, aquela de maior diversidade taxonômica dentre as demais do mundo. Nesta região, apenas representantes da subfamília Usambaromyiinae ainda não foram registrados, já que sua distribuição, até o momento, segue sendo restrita a região afrotropical (Spies & Reiss, 1996). As demais regiões apresentam, no máximo, oito subfamílias registradas (Ashe & O'Connor, 2009). No Brasil, há registro de cinco delas: Chironominae, Orthocleriinae e Tanypodinae são amplamente distribuídas pelo continente; Telmatogetoninae aparece representada por dois gêneros, *Telmatogeton* Schiner, 1866 e *Thalassomyia* Schiner, 1856, ambos restritos a região litorânea nas zonas entre marés (Trivinho-Strixino, 2011; de Oliveira *et al.*, 2013); e Podonominae também representada por dois gêneros, *Podonomus* Philippi, 1865 e *Parochlus* Enderlein, 1912, que ocorrem em elevadas altitudes (Roque & Trivinho-Strixino, 2004; Trivinho-Strixino, 2011; Pinho & Shimabukuro, 2018; Shimabukuro & Trivinho-Strixino, 2018; Shimabukuro *et al.*, 2022). Contudo, apesar da região neotropical ser a mais diversa no âmbito do número de subfamílias de Chironomidae, o número de gêneros e espécies conhecidas ainda é bem menor que o registrado para as regiões Neártica e Paleártica (Ashe & O'Connor, 2009).

Os mosquitos da família Chironomidae são insetos holometábolos que possuem quatro estágios em seu ciclo de vida: ovo, larva (com quatro ínstars), pupa e adulto (imago), sendo a

fase larval, a mais longa do seu ciclo de vida (Oliver, 1971), variando entre dias a anos de desenvolvimento, conforme espécie e condições ambientais (Coffman & Ferrington, 1996). As larvas vivem em água doce, ambiente marinho e ambientes terrestres, podendo ser de vida livre, parasitas ou mesmo simbiontes (Pinder, 1995; Tokeshi, 1995; Roque *et al.*, 2004). Essas larvas de vida-livre se encontram em madeira submersa ou macrófitas e em tubos formados por secreção salivar, associados à rocha, plantas e detritos (Courtney & Merritt, 2008). Há espécies registradas para as mais variadas condições de temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido e profundidade, o que evidencia o sucesso evolutivo do grupo e, conseqüentemente, viabiliza sua utilização em estudos de biomonitoramento da qualidade de água (Spies *et al.*, 2009).

As larvas são apnêusticas, exceto algumas espécies da subfamília Podonominae que apresentam dois espiráculos no oitavo segmento (Brundin, 1966; Oliver, 1971; Cranston, 1995); possuem a cápsula cefálica bem desenvolvida, não retrátil; são prognatas, peças bucais dirigidas anteriormente; e suas mandíbulas operam no plano oblíquo a horizontal. Apresentam um corpo alongado e segmentado que não possui articulações torácicas, com dois pares de pseudópodes ventrais, um no primeiro segmento torácico e um no último segmento abdominal. Em algumas espécies terrestres pode ocorrer fusão e/ou redução desses pseudópodes. O último segmento abdominal, além dos pseudópodes, apresenta dorsalmente túbulos anais e um par de procercos, cada um com um tufo de cerdas apicais (Cranston, 1995).

A fase de pupa dos quironomídeos é bastante curta, principalmente quando contraposto ao tempo de desenvolvimento dos estágios larvais, podendo durar de horas até alguns dias (Brock, 1960; Darby, 1962; Oliver, 1971; Cranston, 1995). Embora efêmero, o estágio pupal envolve grandes mudanças na morfologia, uma vez que, durante este estágio, a larva se transforma em adulto (Cranston, 1995). As pupas possuem formato de vírgula com cefalotórax mais robusto que o abdômen, não apresentam divisões nos lobos anais e possuem o tergito e o esternito IX modificados em um lobo nadador, características que podem ser utilizadas para distinguir as pupas de Chironomidae da maioria das pupas de outras famílias de dípteros “nematóceros”. Apesar das características morfológicas serem visíveis em uma pupa com o adulto em desenvolvimento (ou totalmente desenvolvido), elas podem ser mais facilmente visualizadas em uma exúvia pupal (Cranston, 1995).

O estágio de imago, dura de vários dias a algumas semanas, os adultos possuem as peças bucais reduzidas e não se alimentam, voltando seus esforços para a reprodução (Oliver, 1971). Os adultos de Chironomidae apresentam dimorfismo sexual nas antenas, sendo as dos

machos geralmente mais plumosas, maiores e com mais flagelômeros que as das fêmeas, no abdômen, sendo que este tagma nas fêmeas é mais robusto e nas asas, que nas fêmeas são mais largas, enquanto os machos apresentam as nervuras Costal (C) e Radial (R) mais esclerosadas que as demais (Cranston, 1995). Características morfológicas das asas (como por exemplo a presença de cerdas, pigmentação e relações entre nervuras) são informações importantes para a identidade taxonômica do grupo (Cranston, 1995).

O histórico baixo número de taxonomistas treinados para reconhecer e identificar indivíduos da família Chironomidae, atuando na região neotropical, reflete o que se conhece como impedimento taxonômico e representa um dos principais gargalos no desenvolvimento de estudos que visem aumentar o conhecimento sobre a diversidade desta família na região neotropical. Diante deste cenário, muitas espécies seguem sendo descritas baseadas apenas no exame de machos adultos (Andersen & Mendes, 2007; Mendes & Andersen, 2008; 2009; Pinho *et al.*, 2009a; 2009b; Andersen *et al.*, 2010; Hagenlund *et al.*, 2010a; 2010b; Mendes *et al.*, 2011). Alguns gêneros (*e.g.* *Oleia* Andersen *et* Mendes, 2007, *Saetherocryptus* Andersen *et* Mendes, 2007; *Saetherolabis* Andersen *et* Mendes, 2007; *Iporangomberus* Mendes *et* Andersen, 2011 e *Pebapomberus* Mendes *et* Andersen, 2012) só são conhecidos dos adultos e suas larvas podem estar sendo identificadas erroneamente como pertencentes a outros gêneros.

A subfamília Orthocladiinae ocorre em todas as regiões biogeográficas do mundo, incluindo as regiões polares (Spies *et al.*, 2009; Ashe & O'Connor, 2012) e é a mais diversa em número de gêneros, embora seja a segunda mais diversa em número de espécies, ficando atrás apenas de Chironominae (Ashe & O'Connor, 2012). Orthocladiinae é a subfamília com mais representantes terrestres, com gêneros totalmente ou parcialmente terrestres, por exemplo, *Molleriella* Sæther & Ekrem, 1999 (Sæther & Ekrem, 1999; Andersen, 2014), *Gymnometriocnemus* Goetghebuer, 1932, *Limnophyes* Eaton, 1875, *Paraphaenocladus* Thienemann, 1924, *Parasmittia* Strenzke, 1950, *Pseudosmittia* Edwards, 1932 e *Smittia* Holmgren, 1869 e os gêneros estudados nesse trabalho, *Antillocladius* Sæther, 1981 e *Bryophaenocladus* Thienemann, 1934 (Pinder, 1995). De acordo com Cranston & Epler (2013), Tanypodinae também possui alguns gêneros em que os imaturos permeiam o ambiente terrestre.

O gênero *Antillocladius* Sæther (1981) foi erigido (com a espécie-tipo *A. antecalvus* Sæther) a partir de exemplares provenientes de São Vicente e Granadinas, Antilhas, o que deu o nome ao gênero (Orthocladiinae que ocorre nas Antilhas). No ano seguinte, Sæther (1982) descreveu duas espécies adicionais, *A. arcuatus* e *A. pluspilalus*, provenientes do sudeste dos

EUA. Na década seguinte, Wang & Sæther (1993) descreveram duas espécies da China, *A. scalpellatus* e *A. zhengi* e Andersen & Contreras-Ramos (1999) descreveram a primeira espécie da América do Sul: *A. skartveiti*. Cinco anos mais tarde, Mendes *et al.* (2004) descreveram nove espécies da região Neotropical: *A. biota*, *A. calakmulensis*, *A. folius*, *A. herradurus*, *A. musci*, *A. sooretama*, *A. ubatuba*, *A. venequatoriensis* e *A. zempoalensis*. Ainda no mesmo ano, Yamamoto (2004) transferiu duas espécies japonesas para este gênero: *A. tokarameneus* (Sasa & Suzuki) e *A. yakyijeu*s (Sasa & Suzuki). Tang & Wang (2006) descreveram mais uma espécie para a China *A. longivirgius*. Mendes & Andersen (2008) transferiram uma espécie da Índia para este gênero: *A. subnubilus* (Sinharay & Chaudhuri) e descreveram sete espécies novas: *A. atalaia*, *A. axitiosus*, *A. brazuca*, *A. campususp*, *A. gephyrus*, *A. plicatus* e *A. ultimus*. Mendes *et al.* (2011) descreveram mais duas novas espécies para a região Neotropical: *A. anandae* e *A. itatiaia*. Alguns anos depois, Makarchenko *et al.* (2016), descreveram *A. koreanus* Makarchenko & Makarchenko para a Coreia do Norte e, no ano seguinte, Andersen & Hagenlund (2017) descreveram duas espécies para a Amazônia, *A. bulbosus* e *A. simplex*. Por último, Ospina-Torres, Mey & Jaime-Murcia (2018) descreveram *A. laviejae* para a Colômbia.

Nas duas últimas revisões do gênero, Mendes *et al.* (2004) e Mendes & Andersen (2008) registraram a ocorrência de *Antillocladius folius* em quase toda extensão da Mata Atlântica, desde o estado de Sergipe até Santa Catarina. Todas as outras espécies de *Antillocladius* que foram registradas para o Brasil, exceto *A. folius*, ocorrem em apenas uma das regiões de endemismo de Mata Atlântica propostas por Silva & Casteleti (2003).

Até a presente data, são conhecidas 32 espécies, 24 ocorrem na região Neotropical e 18 no Brasil, das quais, 15 são endêmicas do país (Pinho, 2023), porém a taxonomia está integralmente baseada em machos adultos, muitas vezes descritos por apenas um exemplar (*e.g.* *A. anandae*, *A. axitiosus*, *A. calakmulensis*, *A. gephyrus*, *A. herradurus*, *A. itatiaia*, *A. koreanus*, *A. longivirgius*, *A. zempoalensis*, *A. zhengi*.) O conhecimento dos estágios imaturos ainda é incipiente e das 32 espécies nominais, somente quatro tiveram seus imaturos descritos, *A. antecalvus*, *A. folius*, *A. musci* e *A. pluspilalus* e, destas, somente duas, *A. antecalvus* e *A. musci*, possuem as fêmeas adultas conhecidas pela ciência.

Bryophaenocladus Thienemann, 1934 é um gênero complexo e diverso com representantes distribuídos por quase todo o globo (Wang *et al.*, 2006; Donato, 2011). No catálogo de Ashe & O'Connor (2012) foram listadas 115 espécies para o gênero, mas, nos anos seguintes, esse número continuou crescendo e 11 novas espécies, recentes ou fósseis, foram acrescentadas (Baranov *et al.*, 2015; Makarchenko *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2021;

Moubayed & Lods-Crozet, 2022; Namayandeh & Beresford, 2022; Som *et al.*, 2023).

Taxonomia integrativa é um termo que vem sendo empregado para abordar o uso de diferentes abordagens (marcadores moleculares, caracteres morfológicos e/ou ecológicos, etc.) a fim de auxiliar no reconhecimento e identificação de espécies. A utilização desta combinação de dados se faz necessária, principalmente, quando há elevado grau de similaridade morfológica entre um ou mais semáforos de espécies de um mesmo táxon, suscitando a utilização de diferentes metodologias com perspectivas complementares, além da tradicional taxonomia alfa (Dayrat, 2005; Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Nessa dissertação, lançarei mão desse tipo de abordagem, combinando a taxonomia alfa, que usa a morfologia como base, com a técnica de DNA Barcoding, que utiliza marcadores moleculares para identificar e delimitar espécies (Hebert *et al.*, 2003), para associar espécimes críticos as espécies já conhecidas e, de forma bem mais polêmica, na descrição de novas espécies.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo sugerem uma reflexão em relação ao que se conhece sobre a diversidade das espécies mais amplamente distribuídas, como *A. antecalvus*, *A. arcuatus* e *A. pluspilalus*, já que estas ocorrem desde o norte da região Neotropical até o Brasil e *A. folius* que possui ocorrência assinalada em quase toda a extensão da Mata Atlântica. Será que todas são espécies com ampla distribuição ou constituem grupos de espécies crípticas, assim como observado neste estudo para *A. musci*, em duas populações localizadas em distâncias inferiores a 200 quilômetros da localidade-tipo.

Algumas abordagens alternativas podem ajudar a confirmar essas potenciais novas espécies identificadas nesse trabalho, como aumentar a amostra de dados moleculares, usando mais de uma subunidade do gene citocromo oxidase e não somente a subunidade I, além do uso de fragmentos de outros genes mitocondriais que possam apresentar um maior grau de especificidade. É possível também lançar mão da morfometria geométrica e/ou estudos como a filogeografia.

Nossos resultados reforçam a importância dos estudos taxonômicos integrativos na busca pelo conhecimento da diversidade de alguns grupos de Diptera, demonstrando que apenas a morfologia não seria suficiente para identificar e reconhecer espécies crípticas e as novas espécies que estamos descrevendo.

REFERÊNCIAS

- Andersen, T. (2014). *Mollerietta kaputu* n. sp. from the West Usambara Mountains, NE Tanzania (Diptera: Chironomidae) *CHIRONOMUS Newsletter on Chironomidae Research*, 27: 8-15.
- Andersen, T. & Contreras-Ramos, A. (1999). First record of *Antillocladius* Sæther from Continental South America (Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 45, 149–154.
- Andersen, T. & Hagenlund, L. K. (2017). Two new species of *Antillocladius* Sæther, 1981 from the Amazon rainforest, Brazil (Diptera, Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Norwegian Journal of Entomology*, 64: 65–71.
- Andersen, T. & Mendes, H. F. (2007). Five enigmatic new orthoclad genera from Brazil (Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae). In: Andersen, T. *Contributions to the Systematics and Ecology of Aquatic Diptera*. The Caddis Press, 358p.
- Andersen, T., Sæther, O. A., Cranston, P. S., & Epler, J. H. (2013). 9. The larvae of Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region — Keys and diagnoses. In: Andersen, T., Cranston, P. S. & Epler, J. H. (Sci. eds): *The larvae of Chironomidae (Diptera) of the Holarctic Region — Keys and diagnoses. Insect Systematics & Evolution, Supplement. 66: 189-385.*
- Andersen, T., Sæther, O.A & Mendes, H.F. (2010). Neotropical *Allocladius* Kieffer, 1913 and *Pseudosmittia* Edwards, 1932 (Diptera: Chironomidae). *Zootaxa* 2472: 1–77.
- Ashe, P. & O'Connor, J. P. (2009). *A world catalogue of Chironomidae (Diptera). Part 1. Buchonomyiinae, Chilenomyiinae, Podonominae, Aphroteniinae, Tanypodinae, Usambaromyiinae, Diamesinae, Prodiamesinae and Telmatogetoninae.* Irish Biogeographical Society and National Museum of Ireland, Dublin, 445 p.
- Ashe, P. & O'Connor, J.P. (2012). *A World Catalogue of Chironomidae (Diptera) Part 2. Orthoclaadiinae.* Irish Biogeographical Society and National Museum of Ireland, Dublin, 968 p.
- Baranov, V., Andersen, T., & Hagenlund, L. K. (2015). A new species of *Bryophaenocladus* Thienemann, 1934 (Diptera, Chironomidae, Orthoclaadiinae) from Baltic amber.

Norwegian Journal of Entomology, 62(1), 53-56.

- Brock, E. M. (1960). Mutualism between the midge *Cricotopus* and the alga *Nostoc*. *Ecology* 41: 474–83 pp.
- Brundin, L. (1966). Transantarctic relationships and their significance as evidenced by Chironomid Midges. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar Fjarde 4 ser. Bd. II. nr. I. Series*, 4(11), 1–472.
- Chaudhuri, P.K. & Guha, D.K. (1987). A conspectus of chironomid midges (Diptera: Chironomidae) of India and Bhutan. *Entomologica scandinavica, Supplement*, 29, 23–33.
- Chaudhuri, P.K., Hazra, N. & Alfred, J.R.B. (2001). A checklist of chironomid midges (Diptera: Chironomidae) of the Indian subcontinent. *Oriental Insects*, 35, 335–372.
- Coffman, W.P., Cranston, P.S., Oliver, D.R. & Sæther, O.A. (1986). The pupae of Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region. Keys and diagnoses. *In: Wiederholm, T. (Ed) Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Part 2. Pupae. Entomologica scandinavica, Supplement*, 28, 147–298.
- Coffman, W.P. & Ferrington JR., L.C. (1996). Chironomidae. *In: Merritt, R.W., Cummins K.W. (eds) An introduction to the aquatic insects of North America. 3^a ed. Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque, Iowa, 635–754 pp.*
- Courtney, G.W. & Merritt, R.W. (2008). 22. Aquatic Diptera. Part one. Larvae of aquatic Diptera, pp. 687-722. *In: Merritt R.W., Cummins K.W. & Berg M.B. (eds.). An Introduction to the Aquatic Insects of North America. 4^a ed. Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque, Iowa. 1158 p.*
- Cranston, P.S. (1995). 2. Morphology. *In: Armitage, P.D., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V. (eds), The Chironomidae. The Biology and Ecology of non-biting Midges. Chapman & Hall, London, 11–30 pp.*
- Cranston, P. S. & Epler, J. H. (2013). 5. The larvae of Tanypodinae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic Region — Keys and diagnoses. *In: Andersen, T., Cranston, P. S. & Epler, J. H. (Sci. eds): The larvae of Chironomidae (Diptera) of the Holarctic Region — Keys and diagnoses. Insect Systematics & Evolution Supplement. 66:39–136.*
- Cranston, P.S., Oliver, D.R. & Sæther, O.A. (1983). The larvae of Orthoclaadiinae (Diptera:

- Chironomidae) of the Holarctic region. Keys and diagnoses. *In*: Wiederholm, T. (Ed) Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Part 1. Larvae. *Entomologica scandinavica, Supplement*, 19, 149–291.
- Cranston, P.S., Oliver, D.R. & Sæther, O.A. (1989). The adult males of Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region. Keys and diagnoses. *In*: Wiederholm, T. (Ed) Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Part 3. Adult males. *Entomologica scandinavica, Supplement*, 34, 165–352.
- Darby, R. E. (1962). Midges associated with California rice fields, with special reference to their ecology. *Hilgardia* 32: 1–206.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85(3), 407-417.
- De Oliveira, C. S. N., Da Silva, F. L., & Trivinho-Strixino, S. (2013). *Thalassomya gutae* sp. n., a new marine chironomid (Diptera: Chironomidae: Telmatogetoninae) from the Brazilian coast. *Zootaxa*, 3701(5), 589-595.
- Donato, M. (2011). Una nueva especie de *Bryophaenocladus* (Diptera: Chironomidae) de Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 70(3-4), 207-212.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Epler, J. (1988). Biosystematics of the genus *Dicrotendipes* Kieffer, 1913 (Diptera: Chironomidae) of the world.
- 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.
- Fu, Y., Fang, X., & Wang, X. (2019). Taxonomy of *Corynoneura* Winnertz (Diptera: Chironomidae). *Academic Press*.
- Grimaldi, D. & Engel, M.S. (2005). Evolution of the insects. *Cambridge: University Press*. 755 p.
- Hagenlund, L. K., Andersen T. & Mendes, H. F. (2010a). A new species of *Djalmabatista* Fittkau (Chironomidae, Tanypodinae) from Mato Grosso, Brazil. *Biota Neotropica*. 9

(3) 257–261.

- Hagenlund, L. K., Andersen T. & Mendes, H. F. (2010b). New species of *Lopescladius* (*Cordiella*) Coffman *et* Roback (Chironomidae: Orthoclaadiinae) from Brazil. *Zootaxa* 2728: 39–49.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22, 160-174.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8): 754-755.
- Ivanova, N. V., & Grainger, C. M. (2007). CCDB protocols, COI amplification. *Canadian Centre for DNA Barcoding*. Disponível em <https://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_Amplification.pdf>. Atualizado em 10 de setembro de 2023.
- Kang, H. J., Orel, O. V., Makarchenko, E. A., & Bae, Y. J. (2017). Checklist of the Chironomidae (Diptera) recorded from the Korean indigenous species survey of the National Institute of Biological Resources (2014–2016). *Entomological Research Bulletin*, 33, 118-123.
- Kong, F. Q., Wang, X. H., & Lin, X. L. (2021). *Bryophaenocladus huadingensis* (Diptera: Orthoclaadiinae), a new species from China. In *Annales Zoologici Fennici* (Vol. 58, No. 1-3, pp. 65-68). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Lin, X. L., Stur, E., & Ekrem, T. (2018a). Exploring species boundaries with multiple genetic loci using empirical data from non-biting midges. *Zoologica Scripta*, 47(3), 325-341.
- Lin, X. L., Stur, E., & Ekrem, T. (2018b). Molecular phylogeny and temporal diversification of *Tanytarsus* van der Wulp (Diptera: Chironomidae) support generic synonymies, a new classification and centre of origin. *Systematic Entomology*, 43(4), 659-677.

- Makarchenko, E. A., Makarchenko, M. A., & Niitsuma, H. (2016). Chironomids of subfamilies Tanypodinae, Diamesinae and Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) from North Korea. *Far Eastern Entomologist*, 325: 1–12.
- Mendes, H.F. (2002). Rearing Tanypodinae, Telmatogetoninae and Orthoclaadiinae in Brazil, an empirical approach. *Chironomus Newsletter*, 15, 29–32.
- Mendes, H.F. & Andersen, T. (2008). A review of *Antillocladius* Sæther and *Litocladius* Mendes, Andersen *et* Sæther, with the description of two new Neotropical genera (Diptera, Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Zootaxa* 1887: 1–75.
- Mendes, H.F. & Andersen, T. (2009). Neotropical *Nilothauma* Kieffer, 1921, with the description of thirteen new species (Diptera: Chironomidae). *Zootaxa* 2063: 1–45.
- Mendes, H. F., Andersen, T. & Hagenlund, L. K. (2011). New species and records of *Antillocladius* Sæther and *Litocladius* Mendes, Andersen *et* Sæther from Brazil and Costa Rica (Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Zootaxa* 2915: 39–51.
- Mendes, H.F., Andersen, T. & Sæther, O.A. (2004). A review of *Antillocladius* Sæther, 1981; *Comptosmittia* Sæther, 1981 and *Litocladius* new genus (Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Zootaxa* 594: 1-82.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In, *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, 1-8 pp.
- Mittermeier, R. A., Gil, P.G., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T.M., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., Da Fonseca, G. A. B. (2004). Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered ecoregions. CEMEX and Agrupación Sierra Madre, Mexico.
- Moubayed, J., Lods-Crozet, B. (2022). On the genus *Bryophaenocladus* Thienemann, 1934. I. Taxonomic notes with description of new species (Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Euroasian Entomological Journal*. 21(4): 212–224.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853–845.
- Namayandeh, A., & Beresford, D. V. (2022). New knowledge on the family Chironomidae (Diptera) from Far Northern Ontario, Canada, with a description of new species and

new faunistic records. *Aquatic Insects*, 43(3), 213-235.

Oliver, D.R. (1971). Life history of the Chironomidae. *Annual Review of Entomology*, 16: 211–230.

Ospina-Torres, R., Mey, W., & Jaime-Murcia, P. (2018). Two new orthoclad species from Colombian Andes (Diptera: Chironomidae). *Zootaxa*, 4472(2): 385-392.

Pinder, L.C.V. (1986). Biology of freshwater Chironomidae. *Annales de la Revue de Entomologie* 31: 1–23.

Pinder, L.C.V. (1995). 6. The habitats of chironomid larvae. In: Armitage, P.D., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V. (Eds), *The Chironomidae. The Biology and Ecology of non-biting Midges*. Chapman & Hall, London, p. 107–135.

Pinho, L.C. (2008). Diptera. In: Guia *on-line*: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online/Guia_Diptera.pdf. Atualizado em 24 de setembro de 2023.

Pinho L.C. (2023). Chironomidae. In: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/11375>>. Acesso em: 11 dez. 2023

Pinho, L.C., Mendes, H.F. & Andersen, T. (2009a). New species and records of *Beardius* Reiss & Sublette from Brazil (Diptera, Chironomidae). *Spixiana* 32: 255-264.

Pinho, L.C., Mendes, H.F. & Andersen, T. (2009b). A review of *Skutzia* Reiss, 1985, with the description of three new species (Diptera: Chironomidae: Chironominae). *Journal of the North American Benthological Society* 28: 196-206.

Pinho, L. C., & Shimabukuro, E. M. (2018). *Podonomus amarali* n. sp., a new species of the albinervis group (Diptera: Chironomidae: Podonominae) from Atlantic Forest, southern Brazil. *Zootaxa*, 4402(3), 542-550.

Rambaut A. (2012). FigTree (version 1.4.0). Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Atualizado em 24 de setembro de 2023.

Roback S.S. (1962). Some new Tendipedidae from the Canal Zone. *Notul Nat* 355:1 – 10.

Roque, F. D. O., & Trivinho-Strixino, S. (2004). *Podonomus pepinellii* n. sp., first record of

- the genus and subfamily from Brazil (Diptera: Chironomidae: Podonominae). *Zootaxa*, 689(1), 1-7.
- Roque, F.O.; Trivinho-Strixino, S. Jancso, M. & Fragoso, E.N. (2004). Records of Chironomidae larvae living on other aquatic animals in Brazil. *Biota Neotropica* 4(2): 1-9.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sasa, M. & Suzuki, H. (1995). The chironomid species collected on the Tokara Islands, Kagoshima (Diptera). *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 46, 255–288.
- Sasa, M. & Suzuki, H. (2000). Studies on the chironomid midges collected on Yakushima Island, Southwestern Japan. *Tropical Medicine*, 42, 53–134.
- Sæther, O.A. (1969). Some Nearctic Podonominae, Diamesinae, and Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae). *Fisheries Research Board of Canada*. Bulletin 170. 154p.
- Sæther, O.A. (1976). Revision of *Hydrobaenus*, *Trissocladius*, *Zalutschia*, *Paratrissocladius*, and some related genera (Diptera: Chironomidae). *Fisheries Research Board of Canada*. Bulletin 195:1 – 287.
- Sæther, O.A. (1980). Glossary of chironomid morphology terminology (Chironomidae: Diptera). *Entomologica scandinavica, Supplement*, 14, 1–51.
- Sæther, O.A. (1981). Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) from the British West Indies, with descriptions of *Antillocladius* n.gen., *Lipurometriocnemus* n.gen., *Compterosmittia* n.gen. and *Diplosmittia* n.gen. *Entomologica scandinavica, Supplement*, 16, 1–46.
- Sæther, O.A. (1982). Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) from SE U.S.A., with descriptions of *Plhudsonia*, *Unniella* and *Platysmittia* n. genera and *Atelopodella* n. subgen. *Entomologica scandinavica*, 13, 465–510.
- Sæther, O.A. (1984). The immatures of *Antillocladius* Sæther, 1981 (Diptera: Chironomidae). *Aquatic Insects*, 6, 1–6.
- Sæther, O.A. (1990). A review of the genus *Limnophyes* Eaton from the Holarctic and Afrotropical regions (Diptera: Chironomidae, Orthoclaadiinae). *Entomologica scandinavica, Supplement*, 35, 1–139.

- Sæther, O.A. (2000a). Phylogeny of Culicomorpha (Diptera). *Systematics Entomology* 25: 223–234.
- Sæther, O.A. (2000b). Phylogeny of the subfamilies of Chironomidae. *Systematics Entomology* 25: 393–403.
- Sæther, O.A. & Ekrem, T. (1999). *Mollerella*, a new terrestrial orthoclad genus from the Netherlands (Diptera: Chironomidae). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 45 (2): 161- 168.
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., & Crozier, R. H. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual review of entomology*, 55, 421-438.
- Shimabukuro, E. M., & Trivinho-Strixino, S. (2018). Madicolous Chironomidae from the Brazilian Atlantic Forest: a checklist with notes on altitudinal distributions (Diptera, Insecta). *ZooKeys*, (751), 41.
- Shimabukuro, E. M., Laurindo da Silva, F., Pepinelli, M., Trivinho-Strixino, S., & Lamas, C. J. E. (2022). A new species of *Parochlus* (Diptera: Chironomidae) reveals intriguing features of larva at the oldest South American highlands. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 1-9.
- Silva, J.M.C. & Casteleti, C.H.M. (2003). Status of the Biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. Pp.43-59. In: Galindo-Leal, C & Câmara, I.G. (eds) *State of Hotspots: The Atlantic Forest of South America – Biodiversity Status, Threats. and Outlook*. Island Press, Washington, 448p.
- Sinharay, D.C. & Chaudhuri, P.K. (1979). A study of Orthoclaadiinae. Genus *Parametricnemus* Goetghebuer from India (Diptera: Chironomidae). *Entomologica scandinavica, Supplement*, 10, 119–123.
- Som, D. K., Mukherjee, T., Das, T., & Chakraborty, R. (2023). Two new species of *Bryophaenocladus* Thienemann (Diptera: Chironomidae: Orthoclaadiinae) from Darjeeling and Kolkata, West Bengal, India with a note on biology of montane species. *Records of the Zoological Survey of India*, 645-656.
- Spies, M. & Reiss, F. (1996). Catalog and bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera). *Spixiana, Supplement*, 22, 61–119.

- Spies, M.; Andersen, T.; Epler, J.H. & Watson Jr., C.N. (2009). Chironomidae (non biting-midges). Pp. 437-480. *In*: Brown, B.V.; Borkent, A.; Cumming, J.M.; Wood, D.M.; Woodley, N.E. & 18 Zumbado, M.A. (eds) *Manual of Central American Diptera. Volume 1*. National Research Council of Canada, Ottawa, 714 p.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30: 1312-1313.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tang, H. Q. & Wang, X. H. (2006). A New Species of *Antillocladius* from China (Diptera: Chironomidae). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 39(2): 67–70.
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequence. *Lecture of Mathematics for Life Science*, 17, 57.
- Tokeshi, M. (1995). 12. Species interaction and community structure. *In*: Armitage, P.D., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V. (Eds), *The Chironomidae. The Biology and Ecology of non-biting Midges*. Chapman & Hall, London, p. 297–335.
- Trivinho-Strixino, S. (2011). Larvas de Chironomidae. Guia de identificação. Departamento Hidrobiologia/Lab. Entomologia Aquática/UFSCar, São Carlos.
- Tiunova, T.M., Teslenko, V.A., Arefina, T.I., Makarchenko, M.A. & Zorina, O.V. (2003). Fauna of aquatic insects in Barabashevka River basin (Southern Primorye). *In*: Vladimir Ya. Levanidov's Biennial Memorial Meetings, vol. 2. Dalnauka, Vladivostok, pp. 61-69.
- Wang, X. (2000). A revised checklist of chironomids from China (Diptera). *In*: Hoffrichter, O. (Ed) *Late 20th Century Research on Chironomide: An Anthology from the 13th International Symposium on Chironomidae. Freiburg, 5-9 September 1997*. Shaker Verlag, Aachen, pp. 629–652.
- Wang, X., Andersen, T., & Sæther, O. A. (2006). Neotropical *Bryophaenocladus* Thienemann, 1934 (Diptera: Chironomidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 41(1), 19-32.
- Wang, X. & Sæther, O.A. (1993). First Palaearctic and Oriental records of the orthoclad genus *Antillocladius* Sæther (Diptera: Chironomidae). *Entomologica scandinavica*, 24, 227–230.

- Yamamoto, M. (2004). A catalog of Japanese Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae). *Makunagi / Acta Dipterologica*, 21, 1–121.
- Zhang, J, Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013). A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. *Bioinformatics* (Oxford, England), 29 (22): 2869-2876.