



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais



**FRAGMENTOS DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR NOS ESTUDOS DE
TAXONOMIA E FILOGENIA DE CEROPLASTINAE ATKINSON
(HEMIPTERA: COCCIDAE)**

KEILA DE CÁSSIA COELHO ROSA

São Carlos – SP
2016



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais



**FRAGMENTOS DE DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR NOS ESTUDOS DE
TAXONOMIA E FILOGENIA DE CEROPLASTINAE ATKINSON
(HEMIPTERA: COCCIDAE)**

KEILA DE CASSIA COELHO ROSA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva

Coorientadora: Dra. Ana Lúcia B. G. Peronti

São Carlos – SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R788f Rosa, Keila de Cassia Coelho
Fragmentos de DNA mitocondrial e nuclear nos
estudos de taxonomia e filogenia de Ceroplastinae
Atkinson (Hemiptera: Coccidae) / Keila de Cassia
Coelho Rosa. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
116 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. DNA barcoding. 2. 28S. 3. COI. 4. Ceroplastes.
5. Cochonilhas cerosas. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do(a) candidato(a) Keila de Cássia Coelho Rosa, realizada em 29/08/2016:

Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva
UFSCar

Profa. Dra. Odete Rocha
(UFSCar)

Profa. Dra. Alaide Ap. Fonseca Gessner
UFSCar

Profa. Dra. Vera Regina dos Santos Wolff
FEPAGRO

Profa. Dra. Nilza Maria Martinelli
UNESP

Certifico que a sessão de defesa foi realizada com a participação à distância do membro Profa. Dra. Vera Regina dos Santos Wolff e, depois das arguições e deliberações realizadas, o participante à distância está de acordo com o conteúdo do parecer da comissão examinadora redigido no relatório de defesa da aluna Keila de Cássia Coelho Rosa.

Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva
Presidente da Comissão Examinadora
UFSCar

*“Mesmo desacreditado e ignorado por todos,
não posso desistir, pois pra mim,
vencer é nunca desistir.”*
(Albert Einstein)

*“Nunca te é concedido um desejo sem que te seja concedida
também a faculdade de torná-lo realidade”.*
(Richard Bach)

*Dedico à memória de minha amada avó Olga
Mencucini Coelho, que partiu deixando muita
saudade...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que todos os dias de minha vida me deu forças para nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva, meu orientador, por ter me dado a oportunidade de continuar os estudos com as cochonilhas, por toda sua dedicação, paciência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e por ter sido um grande exemplo profissional e pessoal.

À minha coorientadora Dra. Ana Lúcia Benfatti Gonzalez Peronti por ter me “contagiado” com seu amor pelas cochonilhas, pela ajuda e tempo dedicado a este trabalho, por toda confiança, incentivo, conselhos e amizade, que foram fundamentais para meu desenvolvimento profissional, científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cònsoli da Escola Superior de Agronomia (ESALQ – USP) pela parceria, por gentilmente ter disponibilizado seu laboratório, seus equipamentos e materiais para realização dos experimentos moleculares e auxílio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) da Universidade Federal de São Carlos e a todos os seus professores e funcionários pela contribuição à minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual a conclusão deste trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. João Juarez Soares, pela identificação de algumas espécies de plantas.

Ao Airton Masci e à Edna Petroneri Balbino por toda ajuda e amizade durante todos esses anos.

À Dra. Alaíde Aparecida Fonseca Gessner, Dra. Angélica Maria Penteadó Martins Dias, Dra. Helena Carolina Onody pelas valiosas contribuições para o trabalho submetido ao exame de qualificação.

Aos amigos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Suzan, Carol, Mariana, Helena, Luiza, Mayra, Paula, Wanessa, Ana Carolina, Anderson e Iemma, pelos momentos descontraídos.

Ao técnico Luís, à Suzan e ao Jorge Cunha que ajudaram com coletas de cochonilhas.

Aos alunos do laboratório de Interações dos insetos Aline, Fabio, Felipe, Bruna, Wanessa por toda ajuda durante minha permanência no laboratório e principalmente à Nathalia pelos conselhos e amizade.

À Nadir, Marcela, D. Alexandrina e Erenice (*in memoriam*) que me ajudaram muito no período em que estive em Piracicaba.

A todos os professores que passaram pela minha vida acrescentando dia a dia um tijolinho novo, pois sem eles, nada disso teria sido possível.

Ao meu namorado Clóvis pela compreensão, apoio, carinho e paciência demonstrados em todos esses anos e, principalmente, nos últimos meses.

À minha família, meu porto seguro, especialmente aos meus pais, Antonio Carlos e Leila, por todo amor, carinho e confiança, à minha avó Olga (*in memoriam*) por ter sido um grande exemplo na minha vida e à minha sobrinha Alice por alegrar meus finais de semana.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	8
Abstract	9
Introdução geral	10
Referências Bibliográficas	21
Capítulo I – Descrição de quatro novas espécies de <i>Ceroplastes</i> Gray (Hemiptera: Coccidae) do Brasil com confirmação de status através de DNA <i>barcoding</i> *.....	27
Introdução	29
Materiais e métodos	32
Resultados e discussão	35
Agradecimentos.....	48
Referências Bibliográficas	48
Capítulo II – Polifenismo sazonal e variações no comportamento de <i>Ceroplastes glomeratus</i> Peronti 2008 (Hemiptera: Coccidae) [♦]	61
Introdução	64
Materiais e Métodos.....	65
Resultados	68
Discussão.....	77
Referências Bibliográficas	79
Capítulo III – Análise filogenética da subfamília Ceroplastinae, baseada em segmentos de DNA mitocondrial e nuclear [‡]	88
Introdução	91
Materiais e métodos	93
Resultados e discussão	96
Agradecimentos.....	103
Referências Bibliográficas	103
Considerações finais.....	116

Resumo

Técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento do DNA para verificar polimorfismos genéticos, vem sendo cada vez mais empregadas em estudos de taxonomia e sistemática filogenética. O gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI), escolhido para ser o marcador universal do código de barras da vida (DNA barcoding), vem sendo usado na identificação de inúmeros organismos vivos, bem como para estudos de variabilidade intra-específica, descobrimento de espécies crípticas, entre outros usos. Estudos de filogenia geralmente combinam dois ou mais marcadores para aumentar a resolução em diferentes níveis taxonômicos. Portanto, neste trabalho, estas técnicas foram empregadas para auxiliar os estudos de taxonomia e filogenia de espécies de cochonilhas pertencentes à Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera: Coccidae). No primeiro capítulo, sequências de DNA barcoding foram geradas para quatro novas espécies do gênero *Ceroplastes* Gray que foram descritas morfológicamente. O uso integrado dos dados genéticos e morfológicos facilitou o estabelecimento das espécies, apesar das variabilidades fenotípicas de algumas espécies. No segundo capítulo, fragmentos dos genes COI e 28S foram utilizados para confirmar que a espécie *Ceroplastes glomeratus* Peronti apresenta duas formas diferentes, variando o comportamento e os caracteres morfológicos nas diferentes gerações. No terceiro capítulo, os dados moleculares obtidos pelo sequenciamento de pequenos fragmentos dos genes COI e 28S agrupados, foram utilizados para elaborar hipótese filogenética entre as espécies de Ceroplastinae aqui estudadas, testando-se os agrupamentos propostos anteriormente para espécies com distribuição no estado de São Paulo, através dos métodos de máxima verossimilhança e inferência Bayesina.

Palavras-chave: DNA barcoding, 28S, COI, *Ceroplastes*, cochonilhas cerosas.

Abstract

Molecular biology techniques, such as DNA sequencing to verify genetic polymorphisms, have been increasingly used in taxonomy studies and phylogenetic systematics. The mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI), chosen to be a universal marker of barcode of life (DNA barcoding), has been used in the identification of many living organisms, as well as for intraspecific variability studies, find cryptic species, among other uses. Phylogenetic studies generally combine two or more markers to increase the resolution at different taxonomic levels. Therefore, in this study, these techniques were employed to help taxonomy and phylogeny studies of scale insect species belonging to the Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera: Coccidae). In the first chapter, DNA barcoding sequences were generated for four new species of the genus *Ceroplastes* Gray that were described morphologically. The integrated use of genetic and morphological data facilitated the establishment of the species, despite the phenotypic variability presented by some of the species. In the second chapter, fragments of COI and 28S genes were used to confirm that the *Ceroplastes glomeratus* Peronti species has two different forms, changing the behavior and morphological characters in different generations. In the third chapter, the molecular data obtained by sequencing of small fragments of COI and 28S genes grouped were used to construct phylogenetic hypothesis among the Ceroplastinae species studied here, testing groups that have been proposed previously for some species with distribution in the state of São Paulo, applying the methods of maximum likelihood and Bayesian inference.

Key-words: DNA barcoding, 28S, COI, *Ceroplastes*, wax scales

Introdução geral

Por muitos anos, estudos de taxonomia e sistemática foram baseados principalmente em caracteres morfológicos ou até mesmo comportamentais. Entretanto, visto que fatores bióticos e abióticos possam influenciar a relação do genótipo com o fenótipo, muitas espécies podem ter sido erroneamente identificadas. Nos últimos anos, a identificação molecular, ou taxonomia molecular, como é denominada muitas vezes, tem sido eficiente para solucionar os problemas enfrentados pela taxonomia tradicional, como: separação de espécies crípticas, identificação de espécies com grande plasticidade fenotípica, identificação de estágios do desenvolvimento (Hebert *et al.* 2003).

Por volta de 1966, o uso da eletroforese de isozimas (formas de enzimas diferentes que catalisam a mesma reação), representou uma revolução para a genética de populações e foi amplamente utilizada para descrever polimorfismos em populações dos mais diversos organismos (Solferini & Selivon 2012). Essa técnica permite a quantificação de níveis de variabilidade genética, estimativas de fluxo gênico, elucidação de limites interespecíficos e estabelecimento de relações evolutivas entre diferentes táxons (Solferini & Selivon 2012).

Posteriormente, com a popularização de técnicas de análise de DNA, como o método de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), e o advento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), o emprego da eletroforese de isozimas deixou de ser atrativo e entrou em declínio (Solferini & Selivon 2012). O RFLP tem sido empregado em estudos de DNA para análise da variabilidade genética intra e interespecífica, utilizando enzimas de restrição que digerem determinados fragmentos de DNA. Esses são posteriormente separados por um gel de eletroforese de acordo com

o peso molecular de cada um, e, com isso, cada indivíduo analisado apresenta seu próprio padrão de fragmentos (Arias & Infante-Malachias 2012).

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) ampliou a eficiência de detecção de polimorfismos no nível do DNA ou do RNA, pois este método possibilita a obtenção de quantidades muito maiores de fragmentos específicos de DNA através de amplificação em ciclos, com cada ciclo, teoricamente, duplicando a quantidade do DNA desejado (Matioli & Passos-Bueno 2012). Esse método, portanto, é utilizado como ferramenta em várias outras análises, entre elas: RFLP (ocorre primeiro a amplificação e depois a digestão), AFLP (amplificação de fragmentos do genoma após terem sido originados pela digestão do genoma por enzimas de restrição), RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e sequenciamentos diretos (Matioli & Passos-Bueno 2012).

O sequenciamento de DNA permite avaliar diretamente os polimorfismos, fornecendo informações para análises das relações entre indivíduos de uma mesma espécie e indivíduos de espécies diferentes, caracterizando-os geneticamente. Por ser um método bastante eficiente, grandes quantidades de sequências têm sido geradas por pesquisadores em todo o mundo, o que influenciou a criação de bancos de dados genéticos, como o Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov), que tem a função de armazenar e disponibilizar gratuitamente essas sequências para estudos em diversas áreas da biologia.

Embora as sequências possam ser utilizadas visando solucionar diferentes problemas, a escolha do gene apropriado a ser sequenciado é fundamental para alcançar o objetivo do estudo. Apesar de várias partes do genoma de um organismo possuir informações importantes, alguns genes são mais úteis do que outros, pois as taxas de

evolução são diferentes em cada um. Regiões gênicas com rápida mutação são mais apropriadas para o estudo de organismos mais próximos, enquanto que aquelas mais conservadas são apropriadas para táxons divergentes (Abad-Franch & Monteiro 2005).

O gene mitocondrial, citocromo oxidase subunidade I (COI), por exemplo, possui uma evolução mais rápida do que os nucleares, apresentando uma elevada incidência de substituição do nucleotídeo na terceira posição, o que leva a uma taxa de evolução molecular mais alta, o que permite a discriminação de espécies intimamente associadas (Knowlton & Weigt 1998; Hebert *et al.* 2003).

Diante das características apresentadas pelo COI, Hebert *et al.* (2003) propuseram a utilização desse gene para ser utilizado como um código de barras genético, denominado DNA *barcoding*, com a finalidade de se conseguir identificar as espécies com um pequeno fragmento de DNA e único para cada espécie, gerando um sistema universal de identificação. Esse tipo de identificação molecular proporciona maior facilidade na identificação, pois a técnica pode ser reproduzida sempre que necessário, por qualquer pesquisador e em qualquer idioma, o que diminui as chances de identificações incorretas, visto que as informações fornecidas pelas sequências não são influenciadas por avaliações subjetivas (como muitas vezes ocorrem com as descrições de espécies) (Tautz *et al.* 2003).

Todavia, o gene mitocondrial COI não é um gene muito recomendado para resolver problemas no entendimento das relações filogenéticas, por ter uma taxa de mutação muito alta. Nesses casos, genes mais conservados são indicados, como os genes nucleares do DNA ribossomal.

O DNA ribossomal (rDNA) é o responsável pela síntese dos RNAs ribossômicos (rRNA). Nos eucariotos, os genes ribossomais estão organizados *in tandem* (de forma repetitiva, em sequência) e agrupados em uma ou mais regiões cromossômicas denominadas regiões organizadoras do nucléolo (Gorab 2012). Cada unidade de repetição possui uma organização conservada, formada por: um espaçador externo (ETS) que é transcrito, uma região que codifica para rRNA 18S, um espaçador interno que é transcrito (ITS), uma região que codifica para rRNA 25-28S e um espaçador externo (NTS) que não é transcrito; sendo que vários desses componentes, principalmente as regiões que codificam para rRNA 18S e 28S, têm sido utilizados para análises evolutivas (Campbell *et al.* 1993; Mallatt *et al.* 2004). Entretanto, a maioria das análises filogenéticas incluem informações de diferentes compartimentos genômicos, como núcleo, mitocôndrias (inclusive o COI) e cloroplastos, para aumentar a resolução em diferentes níveis taxonômicos (Mardulyn & Whitfield 1999; Whitfield *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003; Jördens *et al.* 2004; Lang *et al.* 2015).

Essas técnicas moleculares têm sido utilizadas entre os coccóideos com grande sucesso. Ben-Dov *et al.* (2000) usaram marcadores moleculares de RAPD, na diferenciação de duas espécies de *Ceroplastes* Gray muito semelhantes, *Ceroplastes rubens* Maskell e *Ceroplastes reunionensis* Ben-Dov & Matile-Ferrero. Rung *et al.* (2008) utilizaram dois marcadores moleculares, o gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) e o gene nuclear, fator de alongação (EF-1 α) para verificar a identidade de *Planococcus citri* (Risso) e *Planococcus minor* (Maskell). Cook *et al.* (2002) fizeram uma análise filogenética preliminar dos Coccoidea utilizando a pequena subunidade do DNA ribossomal. Downie & Gullan (2004) utilizaram três genes nucleares (fragmentos do EF-1 α , fragmentos das regiões de expansão D2 e D10 do gene da grande subunidade

do DNA ribossomal 28S, e uma região do gene da pequena subunidade do DNA ribossomal 18S) para análise filogenética de Pseudococcidae. Morse & Normark (2006) fizeram um estudo filogenético de Diaspididae utilizando o EF-1 α e o 28S. Gullan *et al.* (2010) usaram um gene mitochondrial (COI) e dois genes nucleares (EF-1 α e D2 e D3 do 28S) visando reconstruir a filogenia do gênero *Ferrisia* Fullaway da família Pseudococcidae.

Trabalhos com DNA barcoding realizados por Deng *et al.* (2012) e Wang *et al.* (2015) para diferentes espécies de Coccidae que são comuns na China, incluindo oito espécies de *Ceroplastes*, revelaram que essa é uma ferramenta rápida e eficaz não apenas para a identificação das cochonilhas testadas, mas também eficiente para revelar rapidamente espécies difíceis de serem identificadas devido à variação fenotípica exibida pela fêmea adulta, assim como, podem ser usada para descobrir espécies crípticas de cochonilhas.

Subfamília Ceroplastinae

Ceroplastinae é a segunda maior subfamília de Coccidae, com 155 espécies descritas (García *et al.* 2016). Caracterizadas por secretarem uma espessa carapaça de cera que recobre toda a região dorsal da fêmea adulta, esses coccídeos são conhecidos popularmente como cochonilhas cerosas (Gimpel *et al.* 1974).

Os membros desta subfamília estão amplamente distribuídos por quase todas as regiões zoogeográficas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, mas podem ocorrer também entre 45°N e 45°S de latitude (Hodgson & Peronti 2012). A maioria das espécies é registrada para as regiões Neotropical e Afrotropical com 77 e 58 espécies,

respectivamente, sendo muitas nativas ou endêmicas dessas regiões (García *et al.* 2016; Qin *et al.* 1998).

Morfologia, ciclo de vida e reprodução

Assim como todos os membros da superfamília Coccoidea, são insetos que possuem grande dimorfismo sexual na fase adulta. As fêmeas são neotênicas, (parecem ninfas, mas são maduras reprodutivamente), ápteras, com cabeça, tórax e abdômen fundidos, aparelho bucal picador-sugador e um par de olhos (Gimpel *et al.* 1974). Os machos são alados (o segundo par de asas é ausente), apresentam cabeça, tórax e abdômen distintos, dois pares de olhos simples e um par de ocelos, antenas geralmente com 10 segmentos e aparelho bucal ausente (Giliomee 1967; Gimpel *et al.* 1974; Rainato & Pellizzari 2008, 2010).

Como representado na Figura 1, as fêmeas adultas possuem, na região dorsal do exoesqueleto, setas, as quais variam em número e forma; microdutos simples, que podem estar presentes ou não; e microdutos loculados, com 0–6 lóculos satélites dependendo da espécie. Apresentam também áreas claras, que são regiões onde microdutos e setas dorsais estão ausentes, sendo geralmente observadas 9 áreas claras, mas esse número pode variar, de acordo com a espécie (Hodgson & Peronti 2012). Ainda na região dorsal, normalmente confinada à porção posterior dos segmentos abdominais, existe uma esclerotização em torno das placas anais que aumenta em área com a idade do inseto, denominada de processo caudal. Essa esclerotização pode se estender sobre a superfície dorsal do corpo ou crescer em direção oposta, ultrapassando o corpo do inseto (Peronti 2004). Setas estigmáticas na região marginal dos canais estigmáticos, podem ser restritas a estes ou se estender além dessa região (Peronti 2004). No lado ventral encontram-se antenas, pernas, aparelho bucal, bem como

microdutos tubulares, poros estigmáticos e dutos ventrais, que podem ser observados tanto na região abdominal quanto na região cefálica, em algumas espécies (Peronti 2004, Hodgson & Peronti 2012).

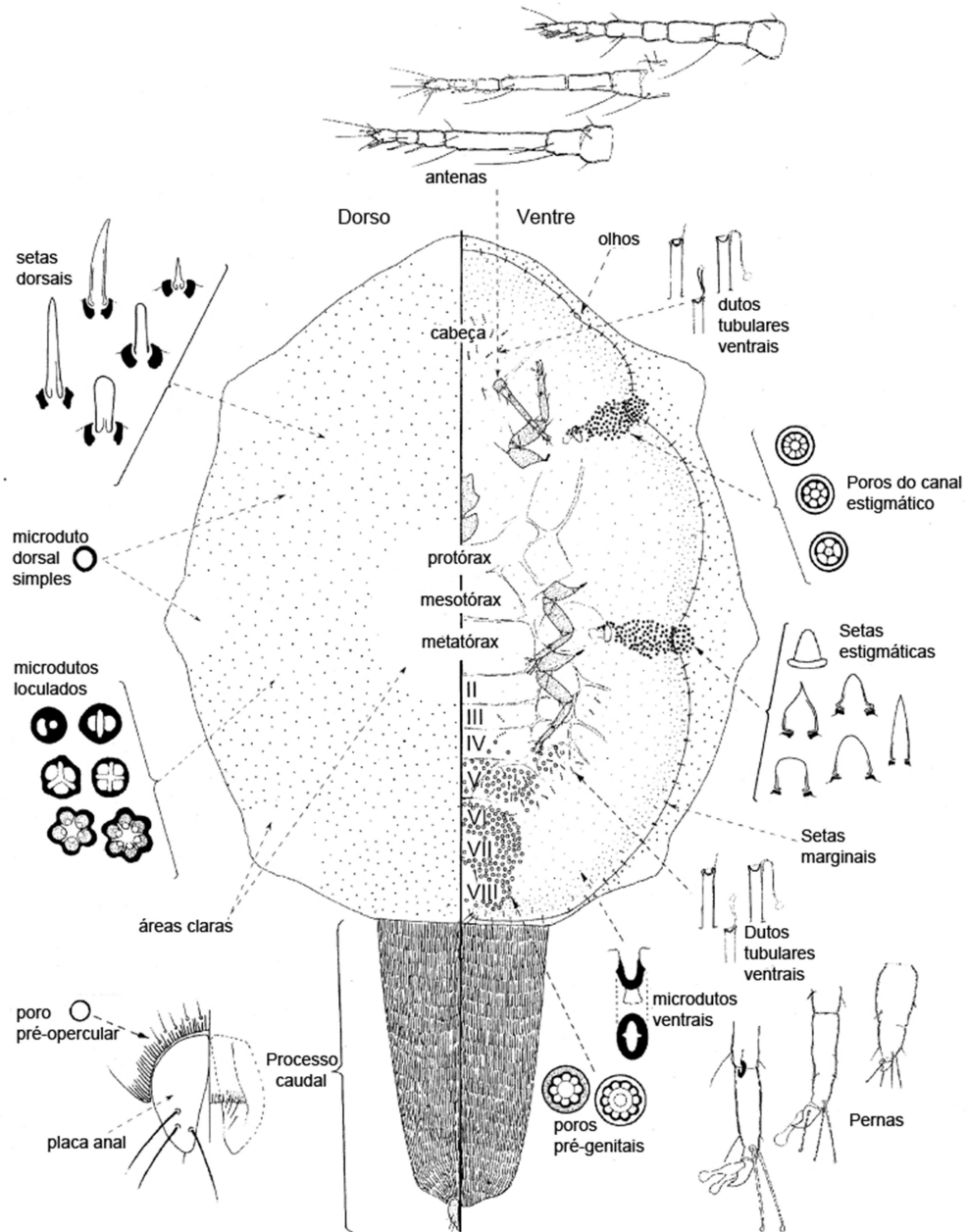


Figura 1. Morfologia geral da fêmea adulta montada em lâmina permanente. Figura central mostrando a região dorsal do lado esquerdo e a região ventral do lado direito (Figura adaptada de Hodgson & Peronti 2012)

As fêmeas passam por três estádios ninfais antes de chegar à fase adulta (Gimpel *et al.* 1974, Rosa *et al.* 2016) e possuem metamorfose incompleta, denominada pseudoametabolia (Granara de Willink 1989). Os machos geralmente passam por dois instares ninfais, exceto *Ceroplastes sinensis* Del Guercio que apresenta um terceiro instar, seguidos pelos estágios de pré-pupa e pupa, ocorrendo a neometabolia (Qin & Gullan 1994, Marotta 1997). Machos e fêmeas podem ser diferenciados somente a partir do segundo estágio ninfal (Gimpel *et al.* 1974).

A reprodução pode ser sexuada ou partenogenética. Apesar de não serem encontrados muitos estudos sobre a reprodução de Ceroplastinae, sete tipos diferentes de partenogênese são conhecidos para os Coccoidea, sendo eles: arrenotoquia haploide, arrenotoquia diploide, deuterotoquia facultativa, deuterotoquia obrigatória, telitoquia facultativa, telitoquia automítica obrigatória e teletoquia apomítica obrigatória (Nur 1971). De acordo com Kosztarab (1987), essa capacidade de se reproduzir sem a participação de machos é uma das explicações, normalmente mais aceita, para a alta incidência de partenogênese nos coccóideos, pois os machos adultos, frágeis e com um curto período de vida, muitas vezes estão indisponíveis.

Relações filogenéticas e variações morfológicas intraespecíficas

Estudos de relações filogenéticas indicam que os Ceroplastinae formam um grupo monofilético, entretanto, o “status” de alguns gêneros previamente estabelecidos, assim como agrupamentos observados em estudos recentes, ainda precisam ser elucidados.

Desde 1828, 10 gêneros foram formalmente propostos para os Ceroplastinae: *Baccacoccus* Brain, *Ceroplastes*, *Ceroplastidia* Cockerell, *Cerosplastina* Cockerell, *Cerostegia* De Lotto, *Columnnea* Targioni Tozzetti, *Gascardia* Targioni Tozzetti, *Paracerostegia* Tang, *Vinsonia* Signoret e *Waxiella* De Lotto, dos quais, todos, exceto *Waxiella* são atualmente aceitos como sinônimos de *Ceroplastes* (Hodgson & Peronti 2012).

Entretanto, a validade do gênero *Waxiella* é questionável. Qin & Gullan (1995), através de um estudo filogenético baseado na morfologia de 83 fêmeas adultas representantes dos gêneros inicialmente propostos, *Ceroplastes*, *Ceroplastidia*, *Cerostegia*, *Gascardia*, *Paracerostegia*, *Vinsonia* e *Waxiella*, obtiveram como resultado que a maioria das espécies de Ceroplastinae constitui um grupo monofilético, apenas *Waxiella* formou um clado distinto, mas suportado por apenas uma sinapomorfia, e por isso, não foi considerado pelos autores como um gênero distinto, mas sim, como um grupo dentro de *Ceroplastes*.

Na revisão das espécies de Ceroplastinae do Estado de São Paulo, Brasil, Peronti *et al.* (2008) também agruparam as 26 espécies estudadas no gênero *Ceroplastes*, mas perceberam que as espécies formavam distintos grupos dependendo da estrutura, frequência e distribuição dos poros dorsais secretores de cera da fêmea adulta. Da mesma forma, Hodgson & Peronti (2012) revisando os Ceroplastinae da região Afrotropical, observaram a formação de 19 grupos distintos, além do gênero *Waxiella* que foi considerado válido pelos autores.

No Brasil, outros agrupamentos foram observados por Rosa *et al.* (2016). Esses autores observaram três diferentes padrões de cera secretados pelos imaturos das espécies estudadas, que eram facilmente diferenciados, principalmente, nas ninfas de

primeiro ínstar. O primeiro grupo incluía as espécies que produziam uma cobertura de cera vítrea e filamentos de cera seca submarginais e dorsais; as espécies do segundo grupo produziam somente uma carapaça de cera vítrea (filamentos ou qualquer prolongamento de cera eram ausentes); e o último grupo incluía as espécies produtoras de uma carapaça de cera vítrea e prolongamentos do mesmo tipo de cera, e esses prolongamentos eram localizados nas regiões submarginais e dorsais, assim como os filamentos de cera seca nas espécies do primeiro grupo (Fig. 2). De acordo com os autores, o segundo grupo, representado pelas espécies produtores de cera vítrea e ausência de qualquer tipo de filamento ou extensão, parece ser restrito à região Neotropical.



Figura 2. Representantes dos agrupamentos propostos por Rosa *et al.* (2012) para espécies da subfamília Ceroplastinae, baseados no tipo e formato da cera secretada pelas ninfas de primeiro instar. A) *Ceroplastes cirripediformis* Comstock, membro do grupo I (filamentos dorsais e submarginais de cera seca presentes); B) *Ceroplastes lucidus* Hempel, membro do Grupo II (cobertura de cera vítrea e ausência de qualquer filamento ou prolongamento de cera; C) *Ceroplastes flosculoides* Matile Ferrero, membro do grupo III (cobertura de cera vítrea e prolongamentos submarginais do mesmo tipo de cera (Figura adaptada de Rosa *et al.* 2016).

Além dos problemas das relações entre as espécies, os Ceroplastinae exibem muitas variações morfológicas intraespecíficas, assim como semelhanças entre espécies consideradas distintas, devendo esconder muitas espécies crípticas.

A revisão realizada por Peronti *et al.* (2008) para as espécies do estado de São Paulo indicou que algumas espécies possuem variações no tamanho e formato da cera das fêmeas adultas coletadas sobre diferentes hospedeiros, como *Ceroplastes cirripediformis* Comstock que apresentou cera mais arredondada sobre caule de *Duranta repens* e cera mais cônica sobre caule de *Jacaranda* sp. Ferrari *et al.* (2008) observaram variações morfológicas entre diferentes populações de *C. cirripediformis*, que exibiam 3 padrões de cera diferentes. Esses autores observaram através do estudo morfométrico, que as populações de um dos padrões estudados se sobrepunham aos outros dois e, que os caracteres microscópicos nas diferentes populações eram muito semelhantes, não permitindo separar os exemplares em grupos distintos apenas pela morfologia.

Essas variações também foram observadas no estudo de Hodgson & Peronti (2012) para as espécies da região Afrotropical. Os autores tiveram dificuldades em delimitar as espécies pertencentes ao grupo *Ceroplastes rusci* (Linnaeus) devido à estreita semelhança entre elas e à grande variabilidade morfológica, encontrando muitos indivíduos que pareciam situar-se entre as espécies que foram reconhecidas por eles. Diante dessas dificuldades, esses autores sugeriram a utilização de métodos moleculares visando resolver esses problemas que os métodos convencionais enfrentam, como: estabelecer limites de espécies, desvendar espécies crípticas e explicar as relações entre as espécies da subfamília.

Durante o estudo da morfologia das formas imaturas de Ceroplastinae no estado de São Paulo, observou-se que *Ceroplastes glomeratus* Peronti apresentava duas formas distintas na fase adulta (observação pessoal), sendo essa espécie excluída do estudo que culminou com a publicação “Morphology of the immature female stages and the wax

test of ten species of Ceroplastes (Hemiptera: Coccoomorpha: Coccidae: Ceroplastinae) from Brazil” por Rosa *et al.* (2016). As duas formas apresentavam grande variação morfológica e comportamental, as quais se alternavam entre as gerações (observação pessoal), sendo nesse caso, portanto, a análise molecular fundamental para verificar se as duas formas tratavam-se da mesma espécie.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo a utilização de análise molecular de fragmentos de DNA visando elucidar desde a identificação e o “status” de algumas espécies até a hipótese das relações filogenéticas de Ceroplastinae, com ênfase nas espécies de ocorrência no estado de São Paulo, Brasil, assim como, ampliar o conhecimento de sequências de DNA para a referida subfamília.

Referências Bibliográficas

- Abad-Franch, F. & Monteiro, F.A. (2005) Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **77(3)**: 437–454.
- Arias, M.C. & Infante-Malachias, M.E. (2012) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. *In*: Matioli, S.R. & Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 171–179.
- Ben-Dov, Y.; Matile-Ferrero, D.; Gafny, R. (2000) Taxonomy of *Ceroplastes rubens* Maskell with description of a related new species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from Reunion, including DNA polymorphism analysis. **Annales de la Société Entomologique de France**, **36(4)**: 423–433.
- Campbell, B.C.; Steffen-Campbell, J.D. & Werren, J.H. (1993) Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal

- transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. **Insect Molecular Biology**, **2(4)**: 225–237.
- Chen, Y.; Xiao, H.; Fu, J. & Huang, D.W. (2003) A molecular phylogeny of eurytomid wasps inferred from DNA sequence data of 28S, 18S 16S, and COI genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **31**: 300–307.
- Cook L.G.; Gullan, P.J. & Trueman, H.E. (2002) A preliminary phylogeny of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **25**: 43–52.
- Deng, J. U. N., Yu, F., Zhang, T. X., Hu, H. Y., Zhu, C. D., Wu, S. A., & Zhang, Y. Z. (2012). DNA barcoding of six *Ceroplastes* species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. **Molecular ecology resources**, **12(5)**: 791–796.
- Downie, D.A. & Gullan P.J. (2004) Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the higher classification. **Systematic Entomology**, **29**: 238–259.
- Ferrari, J.T.; Martins-Dias, A.M.P. & Peronti, A.L.B.G. (2008) Estudo preliminar das variações morfológicas de *Ceroplastes cirripediformis* Comstock, 1881 (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae). *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia*. (Resumos).
- García M.M., Denno B.D., Miller D.R., Miller G.L., Ben-Dov Y. & Hardy N.B. (2016). **ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics**. Database. doi: 10.1093/database/bav118. <http://scalenet.info>. (Acessado em 22 de maio de 2016).
- Gilomee, J.H. (1967) Morphology and taxonomy of adult males of the family Coccidae (Homoptera: Coccidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Supplement**, **7**: 168p.

- Gimpel Jr., W.F.; Miller, D.R. & Davidson, J.A. (1974) A systematic revision of the wax scale, genus *Ceroplastes*, in the United States (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). **University of Maryland Agricultural Experiment Station Miscellaneous Publications, 841**: 1–85.
- Gorab, E. (2012) Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. *In*: Matioli, S.R. & Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 75–78.
- Gullan, P. J., Kaydan, M., & Hardy, N. B. (2010). Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). **Systematic Entomology, 35(2)**: 329–339.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512)**: 313–321
- Hodgson, C.J. & Peronti, A.L.B.G. (2012) A revision of the wax scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Ceroplastinae) of the Afrotropical Region. **Zootaxa, 3372**: 1–265.
- Jördens, J.; Struck, T.; Purschke, G. (2004) Phylogenetic inference regarding Parergodrilidae and *Hrabeiella periglandulata* ('Polychaeta', Annelida) based on 18S rDNA, 28S rDNA and COI sequences. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 42**: 270–280.
- Knowlton, N. & Weigt, L.A. (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society of London B, 265**: 2257–2263.
- Kosztarab, M. (1987) Everything unique or unusual about scale insects (Homoptera: Coccoidea). **Bulletin of the Entomological Society of America, 215–220**.

- Lang, A.S.; Bocksberger, G. & Stech, M. (2015) Phylogeny and species delimitations in European *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta) inferred from nuclear and plastid DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **92**: 217–225.
- Mallatt, J.M.; Garey, J.R. & Shultz, J.W. (2004) Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **31**: 178–191.
- Mardulyn, P. & Whitfield, J.B. Phylogenetic Signal in the COI, 16S, and 28S Genes for Inferring Relationships among Genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): Evidence of a High Diversification Rate in This Group of Parasitoids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **12(3)**: 282–294.
- Marotta, S. (1997) Biology: General life history. In: Ben-Dov, Y. & Hodgson, C.J. **Soft Scale Insects – Their Biology, Natural Enemies and Control**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., p. 251–255.
- Matioli, S.R. & Passos-Bueno, M.R.S. (2012) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: Matioli, S.R. & Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 181–190.
- Morse G.E. & Normark B.B. (2006) A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **57**: 992–1003.
- Nur, U. (1971) Parthenogenesis in Coccids (Homoptera). **American Zoologist**, **11**: 301–308.
- Peronti, A.L.B.G. (2004) **Sistemática das espécies de Ceroplastinae Atkinson, 1886 (Hemíptera: Coccoidea: Coccidae) que ocorrem no Estado de São Paulo, Brasil e inventariação de seus parasitóides**. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de

Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 125p.

- Peronti, A.L.B.G.; Sousa-Silva, C.R. & Granara de Willink, M.C. (2008) Revisão das espécies de Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera, Coccoidea, Coccidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, **52(2)**: 139–181.
- Qin, T.K. & Gullan, P.J. (1994) Taxonomy of the wax scales (Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae) in Australia. **Invertebrate Taxonomy**, **8**: 923–959.
- Qin, T.K. & Gullan, P.J. (1995) A cladistics analysis of wax scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae: Ceroplastinae). **Systematic Entomology**, **20**: 289–308.
- Qin, T.K.; Gullan, P.J. & Beattie, G.A.C. (1998) Biogeography of the wax scales (Insecta: Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae). **Journal of Biogeography**, **25**: 37–45.
- Rainato, A. & Pellizzari, G. (2008) Redescription of the adult male and description of second-instar male, prepupa and pupa of *Ceroplastes japonicus* Green (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae). **Zootaxa**, **1895**: 25–38.
- Rainato, A. & Pellizzari, G. (2010) The adult male and male nymphal instars of *Ceroplastes rusci* (Linnaeus) (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae). **Zootaxa**, **2357**: 50–62.
- Rosa KCC, Peronti ALBG, Hodgson CJ & Sousa-Silva CR (2016) Morphology of the immature female stages and the wax test of ten species of *Ceroplastes* (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae: Ceroplastinae) from Brazil. **Zootaxa**, **4136(2)**: 247–308.
- Rung, A.; Scheffer, S.J.; Evans, G. & Miller, D. (2008) Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the genus *Planococcus* (Pseudococcidae). **Annals of the Entomological Society of America**, **101**: 525-532.

- Solferini, V.N. & Selivon, D. (2012) Polimorfismos de isozimas. *In*: Matioli, S.R. & Fernandes, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 165–170.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH & Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, **18(2)**: 70–74.
- Wang, X.B.; Deng, J.; Zhang, J.T.; Zhou, Q.S.; Zhang, Y. Z. & Wu, S.A. (2015). DNA barcoding of common soft scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) in China. **Bulletin of Entomological Research**, **105**: 545–554.
- Whitfield, J.B.; Mardulyn, P.; Austin, A.D. & Dowton, M. (2002) Phylogenetic relationships among microgastrine braconid wasp genera based on data from the 16S, COI and 28S genes and morphology. **Systematic Entomology**, **27**: 337–359.

**Capítulo I – Descrição de quatro novas espécies de *Ceroplastes* Gray
(Hemiptera: Coccidae) do Brasil com confirmação de status através de
DNA *barcoding* ***

*Formatado nas normas da revista Neotropical Entomology

Correspondência para: Keila de Cássia Coelho Rosa, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235 – SP-310, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil, tel/faz: (16) 3351-8322, keilacoelho@yahoo.com.br

Sistemática, Morfologia e Fisiologia

Descrição de Quatro Novas Espécies de *Ceroplastes* Gray (Hemiptera: Coccidae) do Brasil com Confirmação de Status Através de DNA *Barcoding*

KCC Rosa¹, ALBG Peronti², CR Sousa-Silva³

¹Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Depto de Ecologia e Biologia Evolutiva, Univ Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

²Depto de Fitossanidade, Fac de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

³Depto de Ecologia e Biologia Evolutiva, Univ Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

Running title: Descrição e DNA barcoding de novas espécies de *Ceroplastes* Gray

Resumo. Quatro novas espécies de *Ceroplastes* Gray são descritas a partir de material coletado nas cidades de São Carlos e Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil. Ilustrações e fotos da cera são incluídas. Sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI), relativas às novas espécies, foram geradas e adicionadas ao banco de dados GenBank. O Brasil, que possuía 43 espécies conhecidas deste gênero, passa a ter 47 espécies descritas.

Palavras-chave: Ceroplastinae, cochonilhas cerosas, COI, identificação molecular

Abstract. Four new species of *Ceroplastes* Gray are described from material collected in São Carlos and Rio Claro, São Paulo state, Brazil. Illustrations and photos about wax are included. Sequences of mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI), relating to the new species were produced and added to the GenBank database. The Brazil, which had 43 known species of this genus, will increase to 47 species.

Keywords: Ceroplastinae, wax scale, COI, molecular identification

Introdução

Ceroplastes Gray pertence à subfamília Ceroplastinae Atkinson, esse gênero tem como característica uma carapaça de cera espessa que recobre o corpo das fêmeas adultas. É um dos gêneros mais especiosos da família Coccidae com 145 espécies descritas (García *et al* 2016), distribuídas por praticamente todas as regiões zoogeográficas. Esse gênero é o mais diverso na região Neotropical com registro de 77 espécies (García *et al* 2016).

Algumas espécies de *Ceroplastes* são consideradas pragas de diversas culturas, principalmente de frutíferas e plantas ornamentais (Peronti *et al* 2008), sendo essas

espécies polífagas em sua maioria. Entretanto, Qin *et al* (1998), associaram a especificidade da planta hospedeira com endemismo e concluíram que a maioria das espécies conhecidas para a região Neotropical é endêmica ou nativa desta região, das quais aproximadamente 68% das espécies são monófagas e apenas 19% polífagas.

No Brasil, das 43 espécies de *Ceroplastes* conhecidas, somente cinco, *Ceroplastes actiniformis* Green, *Ceroplastes ceriferus* (Fabricius), *Ceroplastes floridensis* Comstock, *Ceroplastes rusci* (Linnaeus) e *Ceroplastes stellifer* (Signoret), são exóticas; 27 são registradas apenas para o Brasil e 16 restritas ao estado de São Paulo (Peronti *et al* 2008, García *et al* 2016).

As descrições de espécies de *Ceroplastes* originalmente descritas para o Brasil datam principalmente entre 1828 e 1940, quando foram descritas 23 espécies (Gray 1828, Chavannes 1848, Targioni Tozzetti 1866, Cockerell 1895, Hempel 1900, Hempel 1901, Hempel 1912, Hempel 1932, Green 1935, Hempel 1937, Hempel 1938, Costa Lima 1940). Após esse período, Peronti *et al* (2008), revisando as espécies desse gênero do estado de São Paulo, descreveram oito espécies. Portanto, o número de espécies de *Ceroplastes* provavelmente poderá ser ampliado se novos levantamentos taxonômicos e revisões forem realizados no país.

O sucesso no registro de maior diversidade de espécies de Coccoidea em ambientes naturais exige conhecimento do grupo e um grande esforço amostral, em particular com relação ao tempo gasto durante as coletas e o tamanho das áreas amostradas.

Além disso, os estudos de Coccoidea se baseiam principalmente na descrição morfológica das fêmeas adultas, as quais apresentam grande variação intra-específica, como observado por Peronti *et al* (2008) para algumas espécies de Ceroplastinae do estado de São Paulo, como formato da cera cônico e arredondado de *Ceroplastes*

cirripediformis Comstock e coloração variando de branco a branco com manchas róseas em *Ceroplastes grandis* Hempel.

Devido à grande dificuldade no estabelecimento de limites entre algumas espécies de Coccoidea, que decorre da semelhança entre os caracteres morfológicos, estudos moleculares tem se tornado mais frequentes como ferramenta complementar para separar variabilidade intra e inter-específica.

Hebert *et al* (2003a) propuseram o uso de uma curta sequência padronizada de DNA que fosse capaz de distinguir indivíduos de uma espécie em vários grupos de organismos, denominada DNA *barcoding*. Para isso, os autores padronizaram que o marcador utilizado para essa técnica seria uma curta sequência do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), pois possui uma maior variação genética entre as espécies do que dentro das espécies, o que permite a separação de espécies crípticas, além de proporcionar uma identificação rápida das espécies já conhecidas.

Entretanto, o que vem acontecendo após o estabelecimento do DNA *barcoding* é que grandes quantidades dessas sequências têm sido depositadas em bancos de dados sem a identificação em nível específico. Kwong *et al* (2012) apontaram que em janeiro de 2012, 74% das sequências depositadas no GenBank foram identificadas em categorias mais abrangentes, sendo muitas identificadas apenas até nível taxonômico de “Ordem” do grupo correspondente. Consequentemente, o depósito de sequências, sem a respectiva descrição ou análise mais detalhada dos exemplares sequenciados, pode incorrer em identificações errôneas.

Até o momento, as sequências de *Ceroplastes* depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), identificadas em nível de espécie, foram *C. ceriferus*, *C. floridensis*, *Ceroplastes japonicus* Green, *Ceroplastes kunmingensis* (Tang

& Xie), *Ceroplastes pseudoceriferus* Green, *Ceroplastes rubens* Maskell, *C. rusci* e *C. stellifer*.

Diante disto, este trabalho teve como objetivos descrever e ilustrar novas espécies de *Ceroplastes* com base nas análises morfológicas das fêmeas adultas, contribuindo com o conhecimento da diversidade desse grupo, bem como amplificar e sequenciar o gene citocromo oxidase subunidade I (COI), aumentando as informações de DNA *barcoding* devidamente identificado.

Materiais e métodos

Os exemplares estudados foram coletados em áreas urbanas e de vegetação nativa nos municípios de São Carlos-SP e Rio Claro-SP. As amostras de cochonilhas foram coletadas diretamente sobre suas plantas hospedeiras (Tabela 1), e cada uma identificada com um número específico. Posteriormente, as cochonilhas foram fixadas, parte em etanol a 75% para posterior montagem de lâminas e identificação com base nos caracteres morfológicos, e a outra parte em etanol a 100% para o estudo molecular.

Para a análise morfológica, as fêmeas adultas foram montadas em lâminas permanentes seguindo a metodologia de Granara de Willink (1989) e examinados sob microscópio óptico Olympus CBA. Os espécimes coletados foram comparados com as espécies de Ceroplastinae revisadas por Gimpel *et al* (1974) para a região Neártica, Qin & Gullan (1994) para a Austrália, Granara de Willink (1999) para a Argentina, Peronti *et al* (2008) para o estado de São Paulo, Brasil, Hodgson & Peronti (2012) para a região Afrotropical.

As descrições seguiram a terminologia empregada por Hodgson & Peronti (2012). As medidas foram feitas, com auxílio de uma ocular micrométrica e os valores máximos e mínimos foram obtidos para cada caractere mensurável. As ilustrações a

traço foram realizadas com o auxílio de uma câmara clara acoplada ao microscópio óptico e posteriormente tratadas no programa Adobe Photoshop CS5, sendo representada a superfície dorsal do corpo do lado esquerdo, e a superfície ventral do lado direito. As fotografias digitais coloridas foram feitas utilizando uma câmera Nikon D3200 acoplada ao estereomicroscópio Olympus SZ40.

Para a análise molecular das amostras coletadas, foi extraído DNA de dois exemplares de cada amostra, seguindo o método de Gilbert *et al* (2007) com adaptações sugeridas por Dossi *et al* (2014), preservando-se o exoesqueleto. Para amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foram utilizados os “primers” C1-1554F (5’-CAGGAATAATAGGAACATCAATAAG-3’) e C1-2342R (5’- ATCAATGTCTAATCCGATAGTAAATA-3’) (Deng *et al* 2012). A composição da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o volume final foram 1 µL de DNA total, 5 µL 5x Green Reaction Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM de cada “primer”, 1 unidade de *Taq*-DNApolimerase em um volume final de 25 µL. O ciclo da amplificação foi uma fase inicial de 3 min a 95 °C (1x), seguida por 35 ciclos de 30s a 94 °C, 50s a 52 °C e 1 min a 72 °C, seguidos de um turno final de extensão de 10 min a 72 °C. Para visualização dos “amplicons” foi utilizado eletroforese em gel, com gel de agarose 1%, TAE “buffer” com Brometo de etídio e voltagem constante (100V). Os “amplicons” foram visualizados usando um transiluminador.

A purificação foi realizada utilizando precipitação com etanol a 80% (Davis *et al* 1994) e os produtos resultantes foram sequenciados bidirecionalmente pelo “Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP)” ([http:// genoma.ib.usp.br/](http://genoma.ib.usp.br/)). As sequências foram editadas através do programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

Foram obtidas do GenBank (ncbi.nlm.nih.gov) e adicionadas às análises, as sequências das espécies com seus respectivos números de acesso no GenBank: *Ceroplastes ceriferus* (JQ795622.1), *C. japonicus* (JQ795649.1), *C. floridensis* (JQ795652.1), *C. rubens* (JQ795663.1), *C. pseudoceriferus* (JQ795693.1), *C. kunmingensis* (JQ795701.1), depositadas por Deng *et al* (2012) e *C. rusci* (KP189761.1), *C. stellifer* (KP189766.1) e *Coccus longulus* (Douglas) (KP189796.1) depositadas por Wang *et al* (2015), sendo a última utilizada como grupo externo, devido à proximidade do gênero *Coccus* com *Ceroplastes*.

O alinhamento múltiplo de todas as sequências foi realizado pelo programa Mafft version 7 (Kato & Standley 2013), e cortadas do mesmo tamanho utilizando o BioEdit. A distância entre as espécies foi calculada pelo modelo de distância Kimura 2 Parâmetros (K2P) (Kimura 1980) com o programa Mega 6.0 (Tamura *et al* 2013).

Análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi aplicada para estimar a árvore de afinidade filogenética entre as espécies. A árvore foi reconstruída utilizando o programa RaxML v. 8.1.24 (Stamatakis 2006), com os dados particionados para cada posição do códon. O modelo evolutivo GTR+CAT foi aplicado na análise de “bootstrap” que utilizou 1000 réplicas. A árvore de consenso foi visualizada e formatada utilizando o software FigTree v1.4.2 (Rambaut 2008).

O exoesqueleto de cada espécime utilizado na extração do DNA (voucher) foi montado em lâmina permanente seguindo a metodologia de Granara de Willink (1989). As lâminas contendo os “vouchers”, bem como aquelas preparadas para o estudo morfológico, foram depositadas na Coleção Entomológica do Laboratório de Entomologia Econômica do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da

Universidade Federal de São Carlos. Todas as sequências obtidas foram depositadas no GenBank (NCBI database).

Resultados e discussão

A análise morfológica dos espécimes apontou a existência de quatro novas espécies de *Ceroplastes*.

***Ceroplastes* sp. 1** (Figs 1A–D; 2)

Material tipo examinado: Holótipo (primeira fileira à esquerda): fêmea adulta, BRASIL, São Paulo, São Carlos, 22°02'24.2"S 47°44'50.3"W, sobre Meliaceae, 08-viii-2012, KCC Rosa col. Parátipos: 2 exemplares na mesma preparação do holótipo.

Outros exemplares examinados: BRASIL, São Paulo, São Carlos, 21°58'58.3"S 47°56'11.5"W, sobre Meliaceae, 05-x-2012, KCC Rosa col.; BRASIL, São Paulo, São Carlos, 22°02'24.2"S 47°44'50.3"W, sobre *Trichilia* sp. (Meliaceae), 01-ii-2013, KCC Rosa col.; BRASIL, São Paulo, São Carlos, 22°02'24.2"S 47°44'50.3"W, sobre *Miconia chamissois* Naudin (Melastomataceae), 20-ii-2014, KCC Rosa col.

Material não montado

Cera: úmida, coloração variada: inteiramente rosa (Fig 1A), amarela (Fig 1B–C) e branca com manchas róseas (Fig 1D); formato oval, circular ou irregular em vista dorsal e, cônica, semicircular ou irregular em vista lateral; sem placas distintas e núcleos inconspícuos, bandas estigmáticas espessas.

Material montado (n=6)

Corpo. Comprimento: 1,3–1,9 mm. Largura: 0,8–1,2 mm.

Região dorsal. Derme inteiramente membranosa, exceto forte esclerotização do processo caudal. Processo caudal estende-se posteriormente, em direção oposta ao corpo, 0,25–0,48 mm comprimento e 0,35–0,6 mm largura. Derme com 9 áreas claras: 1 cefálica, 1 médio-dorsal, 3 pares laterais e 1 ao redor da placa anal, com ausência de poros e setas. Setas dorsais cônicas, comprimento 1,6–2,6x a largura da base e cilíndricas com ápice irregularmente dilatado, comprimento 0,8–0,9x a largura da base. Poros dorsais: (i) microdutos loculados, com 1–3 (principalmente 2–3) lóculos satélites, aproximadamente 4–5 μm largura cada; e (ii) microdutos simples, 1 μm largura. Poros pré-operculares: 4–6 presentes ao longo da margem anterior das placas anais; cada poro 3–4 μm de diâmetro e um par de setas localizadas logo acima dos poros pré-operculares, 5 μm de comprimento. Placas anais mais longas do que largas, formato triangular, margem anterior externa arredondada e região posterior pontiaguda; comprimento de cada placa 120–130 μm , largura das duas placas combinadas 110–115 μm , cada placa com 4 setas dorsais. Dobra anogenital com 4 pares de setas na margem anterior. Tubo anal longo, 1,2–1,6x o comprimento da placa anal.

Margem. Setas marginais flageladas, 21–31 μm comprimento; 8–11 anteriormente entre os olhos, 6–9 entre os olhos e as aberturas estigmáticas anteriores, e, em cada lado, 9–11 entre as áreas estigmáticas anterior e posterior, e 13–14 entre a área estigmática posterior e o lobo anal. Lobo anal com quatro setas mais espessas, 21–41 μm comprimento. Abertura estigmática distinta, com 22–31 setas estigmáticas; cada grupo mais longo do que largo, apresentando 2–4 fileiras irregulares de setas, estendendo-se dorsalmente; setas estigmáticas com formato cônico; 10–15 μm de comprimento e 6–9 μm de largura na base, apresentando uma seta mais evidente do que as outras com 20

µm de comprimento e 11 µm de largura na base, localizada no centro da fileira mais deslocada para o dorso. Olhos 25–30 µm de diâmetro.

Região Ventral. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais abundantes nos seguimentos abdominais V–VIII. Poros do canal estigmático com 5 lóculos, distribuídos como uma estreita banda, mais concentrados próximos ao ápice do canal 37–42 poros. Microdutos ventrais (poros cruciformes) mais abundantes na região submarginal, 2 µm de largura. Dutos tubulares ventrais com glândula terminal evidente, esparsamente presentes nas regiões mediana e submediana dos seguimentos abdominais IV–VII e na região cefálica. Setas ventrais presentes nas regiões submarginal e submediana, 8–15 µm de comprimento.

Antenas com 7 segmentos, 265–275 µm de comprimento. Escudo clipeo-labral 200–210 µm de comprimento. Espiráculos: largura do peritrema 50–60 µm. Pernas bem desenvolvidas, com esclerotização tíbio-tarsal; denticulo da garra ausente; digítulos da garra iguais, ambos dilatados; dimensões das pernas metatorácicas (µm): coxa 115–135; trocânter + fêmur 160–190; tíbia 105–120; tarso 70–72, e garra 20–22.

Discussão: assemelham-se a *Ceroplastes* sp. 1 as espécies: *Ceroplastes mosquera* (Mosquera) e *Ceroplastes cundinamarcensis* Mosquera que foram registradas para a Colômbia, *C. grandis* conhecida para a Argentina e o Brasil e *Ceroplastes sinensis* Del Guercio amplamente distribuída, principalmente por apresentarem esclerotização tíbio-tarsal, digítulos da garra ambos dilatados, setas estigmáticas restritas às aberturas estigmáticas (exceto *C. sinensis* que possui setas estigmáticas além das aberturas estigmáticas), e maioria das setas estigmáticas cônica (exceto *C. mosquera* que apresenta também setas com formato de ponta de lança, bala com ápice agudo e, algumas vezes, ápice arredondado). *Ceroplastes mosquera* difere por apresentar

microdutos loculados dorsais de 1–4 lóculos satélites. *Ceroplastes cundinamarcensis* difere porque possui número de setas estigmáticas muito maior, variando de 70–85 setas em cada abertura estigmática, com setas dorsais cilíndricas e ápice truncado lateralmente, microdutos loculados dorsais de 1–5 lóculos satélites e sem dutos tubulares ventrais na região cefálica. *Ceroplastes grandis* difere pois possui de 46–80 setas estigmáticas em cada abertura estigmática, antenas com 8 segmentos, setas dorsais cilíndricas com ápice truncado, com ponta ou truncado lateralmente, microdutos loculados dorsais de 1–5 lóculos satélites, com dutos filamentosos ventrais na região submarginal e denticulo na garra. *Ceroplastes sinensis* difere pelas setas dorsais cilíndricas com ápice arredondado, denticulo da garra presente e dutos filamentosos ventrais em toda a região submarginal.

A coloração da cera de *Ceroplastes* sp. 1 variou muito entre as amostras coletadas (Fig 1A–D), parecendo tratar-se inicialmente de três espécies distintas quando avaliada apenas esta característica. A amostra 94 (Fig 1D), em especial, apresentou cera de coloração branca com manchas róseas, muito semelhante à cera produzida por *C. grandis* podendo ser facilmente confundida com essa espécie quando analisada apenas a morfologia da cera.

***Ceroplastes* sp. 2 (Figs 1E–F, 3)**

Material tipo examinado: Holótipo (único exemplar adulto): fêmea adulta, BRASIL, São Paulo, São Carlos, 22°02'24.2"S 47°44'50.3"W, sobre *Tabebuia* sp. (Bignoniaceae), 01-ii-2013, KCC Rosa col.

Outros exemplares examinados: BRASIL, São Paulo, São Carlos, 21°58'58.3"S 47°56'11.5"W, sobre *Myrciaria* sp. (Myrtaceae), 04-ii-2013, SBZ Cunha col.; BRASIL,

São Paulo, São Carlos, 21°58'58.3"S 47°56'11.5"W, sobre hospedeiro Myrtaceae, 04-ii-2013, SBZ Cunha col.; BRASIL, São Paulo, São Carlos, -21°58'58.3"S 47°56'11.5"W, sobre *Eugenia* sp. (Myrtaceae), 05-x-2012, KCC Rosa col.

Material não montado

Cera: cor e textura variadas: amarelo claro e cera mais úmida (Fig 1E) e amarelo ocre e cera rija (Fig 1F), formato irregular, bandas estigmática limitadas à região dos canais estigmáticos.

Material Montado (n=6)

Corpo. Comprimento: 1,3–1,6 mm. Largura: 1,0–1,2 mm.

Região dorsal. Derme interamente membranosa, exceto forte esclerotização do processo caudal. Processo caudal 0,39–0,46 mm comprimento e 0,32–0,4 mm largura, estende-se sobre o dorso. Derme com 8 áreas claras destituídas de poros ou setas: 1 cefálica, 1 médio-dorsal e 3 pares laterais. Setas dorsais cilíndricas e ápice arredondado ou levemente dilatado, comprimento 1,2–1,7x a largura da base. Microduto loculados, 1–6 lóculos satélites, aproximadamente 3–6 µm largura cada; aqueles com 1–2 lóculos satélites mais abundantes nas regiões próximas às áreas claras. Poros pré-operculares: 21–24 presentes ao longo da margem anterior das placas anais; cada poro 3–5 µm de diâmetro. Placas anais mais longas do que largas, triangulares, margem anterior externa arredondada e região posterior pontiaguda; comprimento de cada placa 125–140 µm, largura das duas placas combinadas 105–125 µm, cada placa com 3 setas dorsais 40–70 µm, mais 1 seta próxima ao ápice 15 µm de comprimento. Dobra anogenital com 4 pares de setas na margem anterior. Tubo anal mais curto do que o comprimento da placa anal.

Margem. Setas marginais flageladas, 14–20 μm comprimento; 10 anteriormente entre as aberturas estigmáticas anteriores, a cada lado, 3 entre as áreas estigmáticas anterior e posterior, e 8 entre a área estigmática posterior e o lobo anal. Região posterior da placa anal com três setas, 22–50 μm comprimento. Abertura estigmática distinta, com 11–13 setas; cada grupo de setas mais largo do que longo, com 2 fileiras irregulares de setas; setas estigmáticas com formatos irregulares; 13–18 μm de comprimento e 8–13 μm de largura na base. Olhos não detectados.

Região Ventral. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais abundantes ao redor da vulva e no seguimento VI; mais raros no seguimento V e ausentes nos seguimentos anteriores. Poros do canal estigmático com 5 lóculos, distribuídos como uma banda de mais de 80–100 poros, cada banda mais estreita do que o peritreme. Microdutos ventrais (poros cruciformes) em toda região ventral, 2,5 μm de largura. Dutos tubulares ventrais esparsos na região submediana dos seguimentos abdominais VI–VII. Setas ventrais, 7–10 μm de comprimento, nas regiões submarginal e submediana.

Antenas com 6 segmentos, 200–225 μm de comprimento. Escudo clipeo-labral 250–275 μm de comprimento. Espiráculos: largura do peritreme 75 μm . Pernas desenvolvidas, sem esclerotização tíbio-tarsal; garra com um pequeno denticulo; digítulos da garra diferentes, um dilatado e outro delgado; dimensões das pernas metatorácicas (μm): coxa 70–75; trocânter + fêmur 105–115; tíbia 53–61; tarso 41–43, e garra 12–15.

Discussão: *Ceroplastes* sp.2 assemelha-se às espécies: *Ceroplastes jordanensis* Peronti conhecida do Brasil e *Ceroplastes nakaharai* Gimpel registrada para Cuba e EUA pelas setas estigmáticas de formatos irregulares, poros do canal estigmático com 5 lóculos,

digítulos da garra diferentes e o processo caudal estendendo-se sobre o dorso. Difere de *C. jordanensis* que possui setas estigmáticas variando de 19–25 em cada abertura estigmática, setas dorsais cilíndricas com ápice pontiagudo ou truncado lateralmente, microduto loculado com 1–3 lóculos satélites e dutos tubulares na região cefálica. Difere de *C. nakaharai* pelos microduto loculado de 1–4 lóculos satélites, setas dorsais cilíndricas com ápice pontiagudo ou truncado lateralmente e dutos tubulares ventrais presentes também na região cefálica.

Ceroplastes sp. 2 também variou em coloração e textura da cera, parecendo duas espécies diferentes quando analisada apenas a morfologia da cera.

***Ceroplastes* sp. 3** (Figs 1G, 4)

Material tipo examinado: Holótipo (à esquerda): fêmea adulta, BRASIL, São Paulo, São Carlos, 21°59'00.4"S 47°52'42.9"W, sobre *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), 30-vii-2012. Parátipo: 1 exemplar na mesma preparação do holótipo.

Outros exemplares examinados: BRASIL, São Paulo, São Carlos, 21°59'00.4"S 47°52'42.9"W, sobre *S. molle*, 26-vii-2012, KCC Rosa col; BRASIL, São Paulo, São Carlos, 21°59'00.4"S 47°52'42.9"W, sobre *S. molle*, 20-v-2013, KCC Rosa col.

Material não montado

Cera: rija, coloração amarela ocre, circular em vista dorsal, sem divisão de placas e núcleos inconspícuos, bandas estigmáticas espessas (Fig 1G).

Material Montado (n=10)

Corpo. Comprimento: 3,9–5,0 mm. Largura: 3,0–3,37 mm.

Região dorsal. Derme inteiramente membranosa, exceto forte esclerotização do processo caudal. Processo caudal 2,0–2,6 mm comprimento e 1,4–1,8 mm largura, estende-se sobre o dorso. Derme com 8 áreas claras: 1 cefálica, 1 médio-dorsal e 3 pares laterais, destituídas de poros ou setas, exceto área clara médio dorsal com presença de setas. Setas dorsais de diferentes formatos e tamanhos: (i) cilíndrica com ápice truncado na superfície ou em uma lateral, comprimento 0,9–1,5x a largura da base; (ii) cônica com ápice arredondado ou pontiagudo, comprimento 1,5–1,8x a largura da base. Poros dorsais: (i) microdutos loculados, 1–4 lóculos satélites, aproximadamente 2–5 μm largura cada; e (ii) microdutos simples, 1 μm de diâmetro. Poros pré-operculares: 22–35 ao longo da margem anterior das placas anais; cada poro 3–6 μm de diâmetro. Placas anais mais longas do que largas, formato triangular, margem anterior externa arredondada e região posterior pontiaguda; comprimento de cada placa 157–167 μm , largura das duas placas combinadas 162–175 μm , cada placa com setas dorsais aparentemente quebradas, 4 locais de inserção de setas. Dobra anogenital com 4 pares de setas na margem anterior. Tubo anal curto, menor do que o comprimento da placa anal.

Margem. Setas marginais flageladas, 13–25 μm comprimento; 12 anteriores entre as aberturas estigmáticas anteriores, e, a cada lado, 2 entre as áreas estigmáticas anterior e posterior, 8–10 entre a área estigmática posterior e o lobo anal. Abertura estigmática distinta, com 48–65 setas estigmáticas; cada grupo mais largo do que longo, 8–10 fileiras irregulares de setas, estende-se dorsalmente; setas estigmáticas cilíndricas e ápice irregular, como, presença de tubérculos e depressões; 15–22 μm de comprimento e 10–15 μm de largura na base. Olhos não detectados.

Região Ventral. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais abundantes ao redor da vulva e nos seguimentos abdominais anteriores, raros nos seguimentos II–V; nos seguimentos torácicos, 0–6 próximos de cada coxa. Poros do canal estigmático com 5–8 lóculos, distribuídos como uma larga banda de mais de 150 poros, cada banda tão ou mais larga que o peritreme, poucas se estendendo além do peritreme. Microdutos ventrais (poros cruciformes) em toda região ventral, mais abundantes próximos à margem (região submarginal) e à região do rostro, 3 µm de largura. Dutos tubulares ventrais, glândula terminal não evidente, esparsos nas regiões mediana e submediana dos seguimentos abdominais II–VII. Setas submarginais mais abundantes que as setas marginais, 10–15 µm de comprimento.

Antenas com 7 segmentos, 260–300 µm de comprimento. Escudo cípeo-labral 350–370 µm de comprimento. Espiráculos: largura do peritreme 95–100 µm. Pernas desenvolvidas, sem esclerotização tíbio-tarsal; cada garra com um pequeno denticulo; digítulos da garra diferentes, um dilatado e outro delgado; dimensões das pernas metatorácicas (µm): coxa 85–95; trocânter + fêmur 105–125; tibia 70–87; tarso 40–50, e garra 17–22.

Discussão: *Ceroplastes* sp.3 assemelha-se às espécies: *Ceroplastes* sp.4 e *Ceroplastes diospyros* Hempel conhecidas para o Brasil, e *Ceroplastes macgregori* Sampedro & Butze registrada para o México, pois apresentam setas estigmáticas em formato de cilindro com irregularidades na região apical, setas dorsais cilíndricas com ápice truncado lateralmente, processo caudal estende-se sobre o dorso e poros do canal estigmático com mais de 5 lóculos (exceto em *C. macgregori* que estão limitados a 5 lóculos). Diferenciam-se de *Ceroplastes* sp. 3, pois todas as espécies apresentam apenas seis segmentos antenais; *Ceroplastes* sp. 4 difere também por não ter denticulo na garra, os dutos tubulares ventrais presentes na região cefálica e as setas estigmáticas variam de

33–43 setas por abertura estigmática; *C. diospyros* difere por possuir microdutos loculados dorsais com 1–2 lóculos satélites, as setas estigmáticas variam de 30–70 em cada abertura e possuir apenas setas dorsais cilíndricas com ápice pontiagudo ou truncado lateralmente; e *C. macgregori* que não apresenta setas dorsais cônicas, possui microdutos loculados dorsais de 1–2 lóculos satélites, garra sem dentículo, os poros estigmáticos com 5 lóculos e dutos tubulares ventrais na região dorsal, próximo à margem.

***Ceroplastes* sp. 4** (Figs 1H, 5)

Material tipo examinado: Holótipo (à direita): fêmea adulta, BRASIL, São Paulo, Rio Claro, 22°25'18.4"S 47°34'34.6"W, sobre *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), 22-vii-2010, KCC Rosa col. Parátipo: 1 exemplar na mesma lâmina do holótipo

Outros exemplares examinados: BRASIL, São Paulo, Rio Claro, 22°25'18.4"S 47°34'34.6"W sobre *S. molle*, 27-v-2014, KCC Rosa col.

Material não montado

Cera: rija, branco-amarelada, forma piramidal, sem divisão de placas e núcleos inconspícuos, bandas estigmáticas espessas (Fig 1H).

Material Montado (n=3)

Corpo. Comprimento: 1,7–3,9 mm. Largura: 1,2–3,1 mm.

Região dorsal. Derme inteiramente membranosa, exceto forte esclerotização do processo caudal. Processo caudal 0,29–0,64 mm comprimento e 0,32–0,65 mm largura,

estende-se sobre o dorso. Derme com 9 áreas claras com poucas setas e ausência de poros: 1 cefálica, 1 médio-dorsal muito pequena, 3 pares laterais e 1 ao redor da placa anal. Setas dorsais cônicas e cilíndricas com ápice cônico ou truncado lateralmente, comprimento 1,0–1,4x a largura da base. Poros dorsais: (i) microdutos loculados, com 1–4 (raramente 3 ou 4) lóculos satélites, aproximadamente 3–6 µm largura cada; (ii) microdutos simples não detectados. Poros pré-operculares: 39–49 presentes ao longo da margem anterior das placas anais; cada poro 3–6 µm de diâmetro. Placas anais mais longas do que largas, triangulares, margem anterior externa arredondada e região posterior pontiaguda; comprimento de cada placa 170–180 µm, largura das duas placas combinadas 160–180 µm, cada placa com 4 setas dorsais. Dobra anogenital com 4 pares de setas na margem anterior. Tubo anal curto, 0,5–0,6x o comprimento da placa anal.

Margem. Setas marginais flageladas, 25–31 µm comprimento; 5–6 anteriores entre os olhos, 2–4 entre os olhos e as aberturas estigmáticas anteriores, a cada lado, 2–3 entre as áreas estigmáticas anterior e posterior, 5–6 entre a área estigmática posterior e o lobo anal. Lobo anal com três setas mais espessas, 25–40 µm comprimento. Abertura estigmática distinta, com 33–43 setas; cada grupo mais largo do que longo, distribuídas em 5–6 fileiras irregulares estendendo-se dorsalmente; setas estigmáticas cilíndricas com ápice arredondado ou com pequenas depressões; 10–13 µm de comprimento e 7–8 µm de largura na base. Olhos 20 µm de diâmetro.

Região Ventral. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais abundantes ao redor da vulva e nos seguimentos abdominais anteriores, raros nos seguimentos III–V e ausentes no segmento II. Poros do canal estigmático com 5–8 lóculos, distribuídos em larga banda de 120–150 poros. Microdutos ventrais (poros cruciformes) em toda região ventral, mais abundantes na região submarginal, 3–4 µm de largura. Dutos tubulares

ventrais, glândula terminal evidente, esparsas presentes nas regiões mediana e submediana dos segmentos abdominais V–VI e na região cefálica. Setas ventrais abundantes, 8–20 µm de comprimento.

Antenas com 6 segmentos, 240–270 µm de comprimento. Escudo clípeo-labral 300–350 µm de comprimento. Espiráculos: largura do peritreme 70–90 µm. Pernas bem desenvolvidas, sem esclerotização tíbio-tarsal; sem dentículo na garra; digítulos da garra diferentes, um dilatado e outro delgado; dimensões das pernas metatorácicas (µm): coxa 95–115; trocânter + fêmur 130–150; tibia 100–105; tarso 50–72, e garra 17–19.

Discussão: *Ceroplastes* sp.4 assemelha-se às espécies: *Ceroplastes* sp.3, *C. diospyros* e *C. macgregori*. *Ceroplastes* sp. 3 difere por apresentar 7 segmentos antenais, dentículo na garra, dutos tubulares ventrais ausentes na região cefálica; *C. diospyros* difere por possuir microdutos loculados dorsais com 1–2 lóculos satélites, as setas estigmáticas variam de 30–70 em cada abertura, dentículo na garra, dutos tubulares ventrais ausentes na região cefálica e possui apenas setas dorsais cilíndricas com ápice pontiagudo ou truncado lateralmente; *C. macgregori* não possui setas dorsais cônicas, os microdutos loculados dorsais variam de 1–2 lóculos satélites, os poros estigmáticos com 5 lóculos, dutos tubulares ventrais ausentes na região cefálica ventral, e presentes na região dorsal, próximo à margem.

Análise das sequências de DNA

As sequências geradas neste estudo foram obtidas de 20 exemplares, relativas a 10 amostras, representantes de quatro morfoespécies diferentes. Cada sequência continha inicialmente 690 pb e após alinhadas às sequências obtidas no GenBank e cortadas passaram a ter 489 pb cada, não sendo detectada nenhuma deleção ou inserção. Quando traduzidas em aminoácido, nenhum códon de parada foi encontrado.

O resultado da análise da divergência intraespecífica entre as amostras de *Ceroplastes* sp. 1 e sp. 2 variou de 0,0-0,6%, exceto para a amostra 94, que apesar de identificada como *Ceroplastes* sp 1 com base nas semelhanças das características microscópicas, a divergência variou de 2,8–3,3% quando comparada com as outras amostras dessa espécie (Fig 6). Para Hebert *et al* (2003a, 2003b) a variação de sequências intraespecífica deve ser inferior a 2% ou 3% de dissimilaridade, mas como observado por Avise (2000), a maioria das divergências intraespecíficas é menor que 1%, e raramente podem ser superiores a 2%. Isto pôde ser constatado para as espécies de Diaspididae e Pseudococcidae analisadas por Park *et al* (2001), que embora tenham encontrado divergências inferiores a 1% para a maioria das espécies, 25% delas apresentaram divergências superiores a 2% (2,5–4,6% entre os Diaspididae e 2,5%–5,8% entre os Pseudococcidae). Wang *et al* (2015) também encontraram divergências altas, variando de 0–4,2% entre as espécies de Coccidae provenientes da China. Portanto, a amostra 94 foi considerada como *Ceroplastes* sp. 1, mas provavelmente pode estar iniciando um processo de especiação, por apresentar maior dissimilaridade em relação às demais amostras.

A divergência interespecífica de todas as sequências de *Ceroplastes* analisadas variou de 4,9-26,7% com uma divergência média de 18,8% (Fig 6). A distância máxima foi obtida entre *Ceroplastes* sp. 1 e sp. 2, enquanto que a mínima de 4,9% foi encontrada entre *C. ceriferus* e *C. pseudoceriferus*, como já apontada anteriormente por Deng *et al* (2012) e Wang *et al* (2015), utilizando o COI. Entre as novas espécies, a menor divergência interespecífica foi encontrada entre *Ceroplastes* sp. 3 e sp. 4, corroborando com os dados morfológicos que indicaram a proximidade dessas duas espécies.

A análise de verossimilhança apontou que as 10 amostras examinadas neste trabalho formaram quatro grupos bem distintos com elevados valores de *bootstrap* entre eles (Fig 7). A amostra 94 de *Ceroplastes* sp.1 apresenta uma distância maior em relação às amostras 05, 16 e 36 (Fig 6), entretanto, comparando com a divergência interespecífica apresentada pelo grupo, essa distância não foi suficiente para considerá-la uma espécie distinta.

Corroborando com as observações morfológicas, *Ceroplastes* sp.3 e sp.4 mostraram-se como espécies próximas entre si e, juntas, são mais semelhantes à *Ceroplastes* sp.2 do que à *Ceroplastes* sp.1. Além disso, essas quatro espécies apresentaram-se mais próximas entre si do que as outras espécies em que as sequências foram comparadas e que possuem origem em outras regiões zoogeográficas.

Em conclusão, as informações moleculares corroboraram com os dados morfológicos, confirmando a existência de quatro novas espécies. As sequências obtidas neste estudo são os primeiros registros de DNA *barcoding* de espécies do gênero *Ceroplastes* nativas do Brasil, e essas sequências mostraram-se úteis para serem utilizadas com o propósito de identificação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

Avice JC (2000) *Phylogeography. The history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Chavannes A (1848) Notice sur deux *Coccus* cérifères du Brésil. Bull. Soc. Entomol. Fr. 6(2): 139–145.

- Cockerell TDA (1895) Three new species of Coccidae. *The Entomologist* 28: 100–101.
- Costa Lima A (1940) Um novo *Ceroplastes gigante* (Coccoidea: Coccidae). *Pap. Avulsos de Zool.* 1: 9–12.
- Davis LB, Kuehl WM, Battey JF (1994) *Basic methods in molecular biology*. 2nd Ed., Appleton and Lange, East Norwalk, CT., 777p.
- Deng JUN, Yu F, Zhang TX, Hu HY, Zhu CD, Wu SA, Zhang YZ (2012) DNA barcoding of six *Ceroplastes* species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. *Mol. Ecol. Resour.* 12(5): 791–796.
- Dossi FCA, Silva EP, Cônsoli FL (2014). Population dynamics and growth rates of endosymbionts during *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae) ontogeny. *Microbial Ecol.* 68: 881–889.
- García MM, Denno BD, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y, Hardy NB (2016). ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics. Database. doi: 10.1093/database/bav118. <http://scalenet.info>. (Acessado em 19 de junho de 2016).
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE* 2(3):e272.
- Gimpel J WF, Miller DR, Davidson JA (1974) A systematic revision of the wax scale, genus *Ceroplastes*, in the United States (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). University of Maryland Agricultural Experiment Station Miscellaneous Publications, 841: 1–85.

- Granara de Willink MC (1989) Conociendo nuestra fauna I. Superfamilia Coccoidea (Homoptera: Sternorhyncha). Serie Monográfica y Didáctica, n° 6. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, 43 pp.
- Granara de Willink MC (1999) Las cochinilhas blandas de la República Argentina (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Contributions on Entomology, International 3(1): 183p.
- Gray EJ (1828) Spicilegia Zoologica; or original figures and short systematic descriptions of new and unfigured animals. Part 1. Treuttel, Wurtz & Co. London, 12 pp.
- Green EE (1935) On three new species of *Ceroplastes*, from South America. Arb. morph. taxon. Ent. Berlin-Dahlem 2: 272–275.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003a) Biological identification through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. 270:313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR (2003b) Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. S B Biol. Sci. 270:S96-S99.
- Hempel A (1900) As coccidas Brasileiras. Ver. Mus. Paul. São Paulo 4: 365–537.
- Hempel A (1901) A preliminary report on some new Brazilian Hemiptera. Ann. Magaz. Nat. Hist. 8: 388–391.
- Hempel A (1912) Catalogos da fauna Brasileira editados pello Museu Paulista S. Paulo - Brasil. Diario Official Sao Paulo 77 pp.
- Hempel A (1932) Descrição de vinte a duas espécies novas de coccideos (Hemiptera - Homoptera). Rev. entomol. 2: 310–339.

- Hempel A (1937) Novas espécies de coccídeos (Homoptera) do Brasil. Arq. Inst. Biol. 8: 5–36.
- Hempel A (1938) Descrição de uma nova espécie de *Ceroplastes* (Hom. Coccidae). Rev. Entomol. 8: 263–264.
- Hodgson CJ, Peronti ALBG (2012) A revision of the wax scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Ceroplastinae) of the Afrotropical Region. Zootaxa 3372: 1–265.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Mol. Biol. Evol. 30: 772–780.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120.
- Kwong S, Srivathsan A, Meier R (2012) An update on DNA barcoding: low species coverage and numerous unidentified sequences. Cladistics 28: 639–644.
- Park DS, Suh SJ, Hebert PD, Oh HW, Hong KJ (2011) DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). Bull Entomol Res, 101(04): 429–434.
- Peronti ALBG, Sousa-Silva CR, Granara de Willink MC (2008) Revisão das espécies de Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera, Coccoidea, Coccidae) do Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. entomol. 52(2): 139–181.
- Qin TK, Gullan PJ (1994) Taxonomy of the wax scales (Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae) in Australia. Invertebr. Taxon. 8: 923–959.
- Qin TK, Gullan PJ, Beattie GAC (1998) Biogeography of the wax scales (Insecta: Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae). J. Biogeogr. 25: 37–45.

- Rambaut A (2008) Tree Figure Drawing Tool. Version 1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30(12): 2725–2729.
- Targioni Tozzetti A (1866) Come certe cocciniglie sieno cagione di alcune melate delle piante, e di alcune ruggini; e come la cocciniglia del fico dia in abbondanza una specie di cera. *Atti della R. Accademia dei Georgofili (N.S.)* 13: 115-137; App. 138-146.
- Wang XB, Deng J, Zhang JT, Zhou QS, Zhang YZ, Wu SA (2015) DNA barcoding of common soft scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) in China. *B. Entomol. Res.* 105: 545–554.

Tabela 1. Dados de coleta dos espécimes de *Ceroplastes* utilizados neste estudo.

Espécies	Amostras	Planta hospedeira	Data da coleta	Local de coleta	Coletor
<i>Ceroplastes</i> sp. 1	05	Meliaceae	05.x.2012	São Carlos-SP (21°58'58.3"S 47°56'11.5"W)	Rosa, K.C.C.
	16	Meliaceae	08.viii.2012	São Carlos-SP (22°02'24.2"S 47°44'50.3"W)	Rosa, K.C.C.
	36	<i>Trichilia</i> sp. (Meliaceae)	01.ii.2013	São Carlos-SP (22°02'24.2"S 47°44'50.3"W)	Rosa, K.C.C.
	94	<i>Miconia chamissois</i> (Melastomataceae)	20.ii.2014	São Carlos-SP (22°02'24.2"S 47°44'50.3"W)	Rosa, K.C.C.
<i>Ceroplastes</i> sp. 2	34	<i>Tabebuia</i> sp. (Bignoniaceae)	01.ii.2013	São Carlos-SP (22°02'24.2"S 47°44'50.3"W)	Rosa, K.C.C.
	45	<i>Myrciaria</i> sp. (Myrtaceae)	04.ii.2013	São Carlos-SP (21°58'58.3"S 47°56'11.5"W)	Cunha, S.B.Z.
	50	Myrtaceae	04.ii.2013	São Carlos-SP (21°58'58.3"S 47°56'11.5"W)	Cunha, S.B.Z.
	51	<i>Eugenia</i> sp. (Myrtaceae)	05.x.2012	São Carlos-SP (21°58'58.3"S 47°56'11.5"W)	Rosa, K.C.C.
<i>Ceroplastes</i> sp. 3	66	<i>Schinus molle</i> (Anacardiaceae)	20.v.2013	São Carlos-SP (21°59'00.4"S 47°52'42.9"W)	Rosa, K.C.C.
<i>Ceroplastes</i> sp. 4	106	<i>Schinus molle</i> (Anacardiaceae)	27.v.2014	Rio Claro-SP (22°25'18.4"S 47°34'34.6"W)	Rosa, K.C.C.

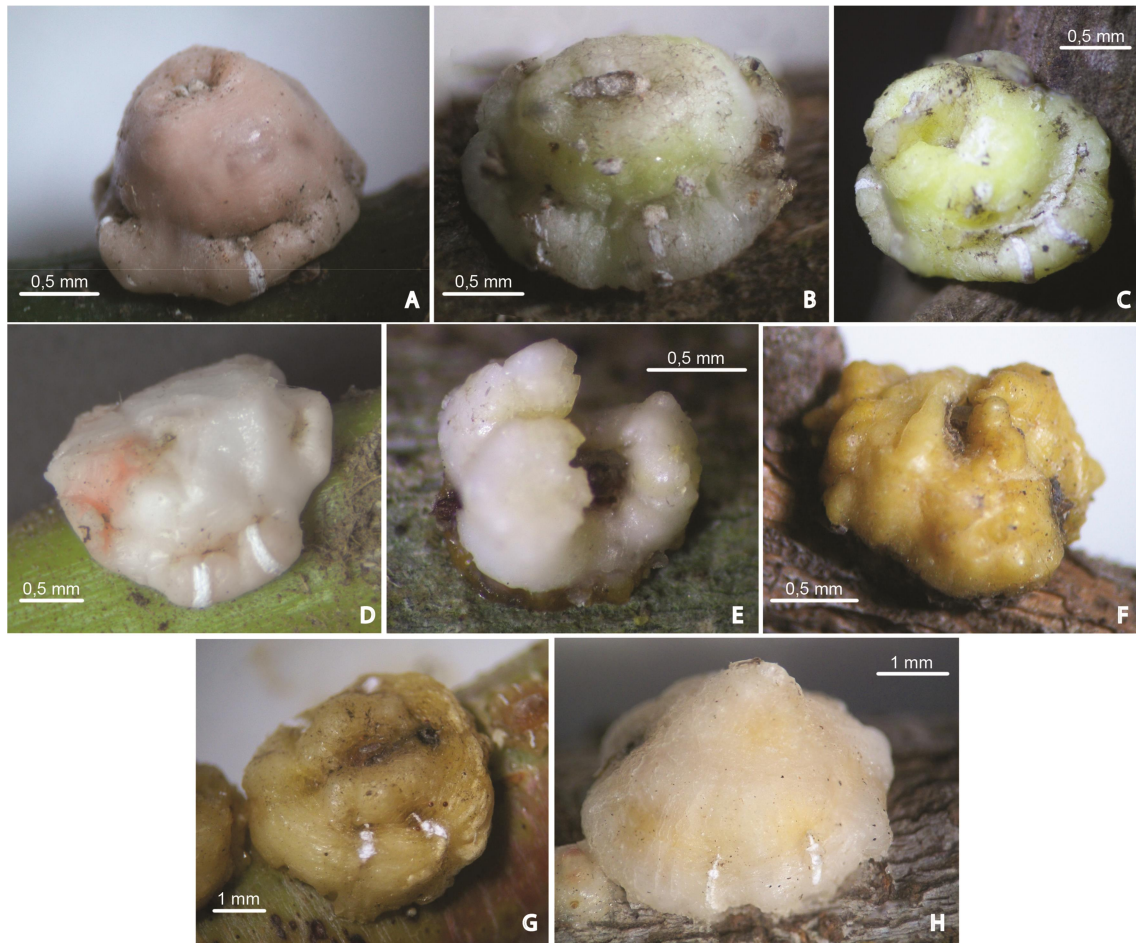


Fig 1 A-D, *Ceroplastes* sp.1: A, sobre Meliaceae; B, sobre Meliaceae; C, sobre *Trichilia* sp. (Meliaceae); D, sobre *Miconia* sp. (Melastomataceae); E-F, *Ceroplastes* sp.2: E, sobre *Tabebuia* sp. (Bignoniaceae); F, sobre *Eugenia* sp. (Myrtaceae); G, *Ceroplastes* sp.3 sobre *Schinus molle* L. (Anacardiaceae); H, *Ceroplastes* sp.4 sobre *S. molle*.

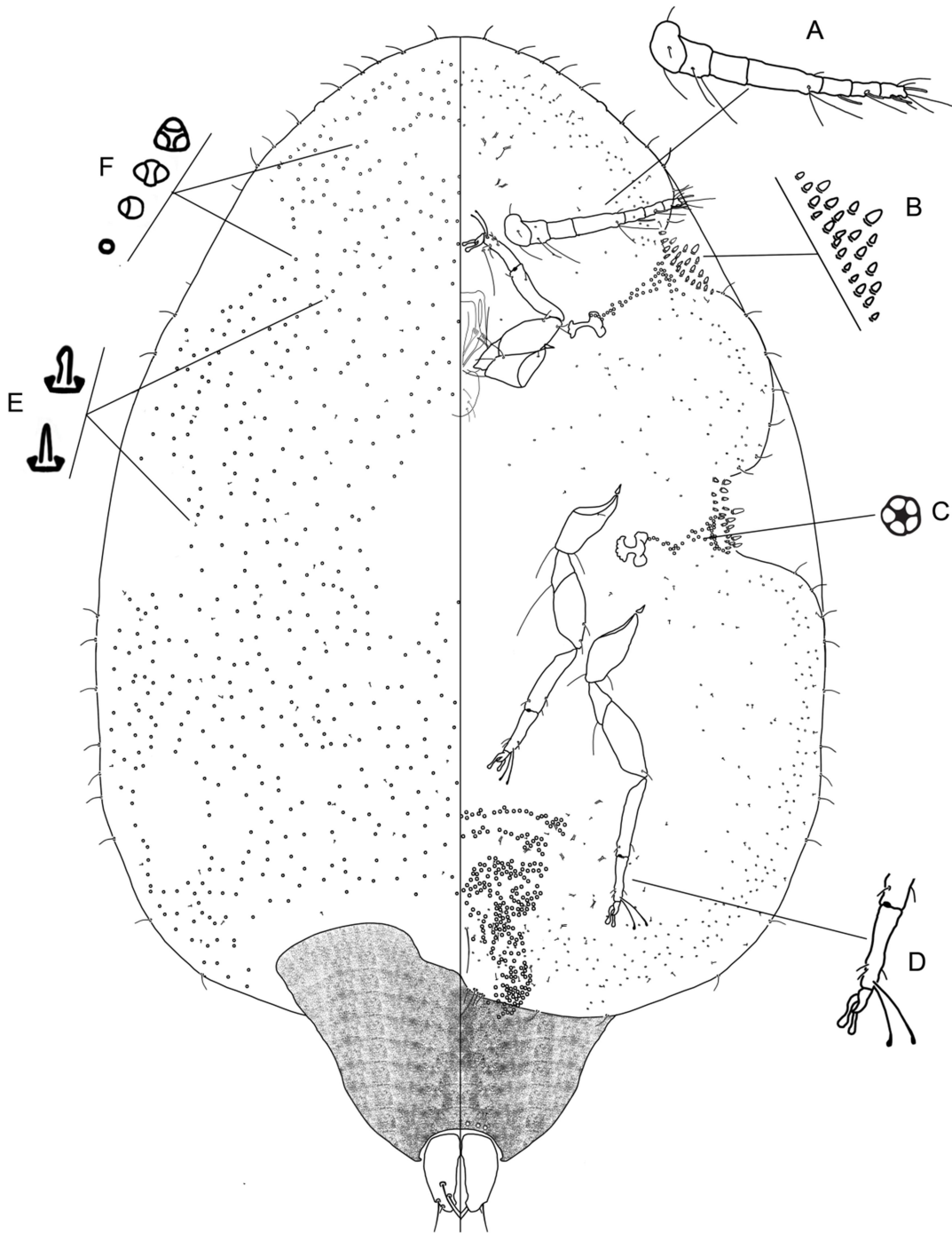


Fig 2 *Ceroplastes* sp.1. A= Antena, B= setas estigmáticas, C= poros estigmáticos, D= detalhe da junção tíbia-tarso, E= setas dorsais, F= poros dorsais.

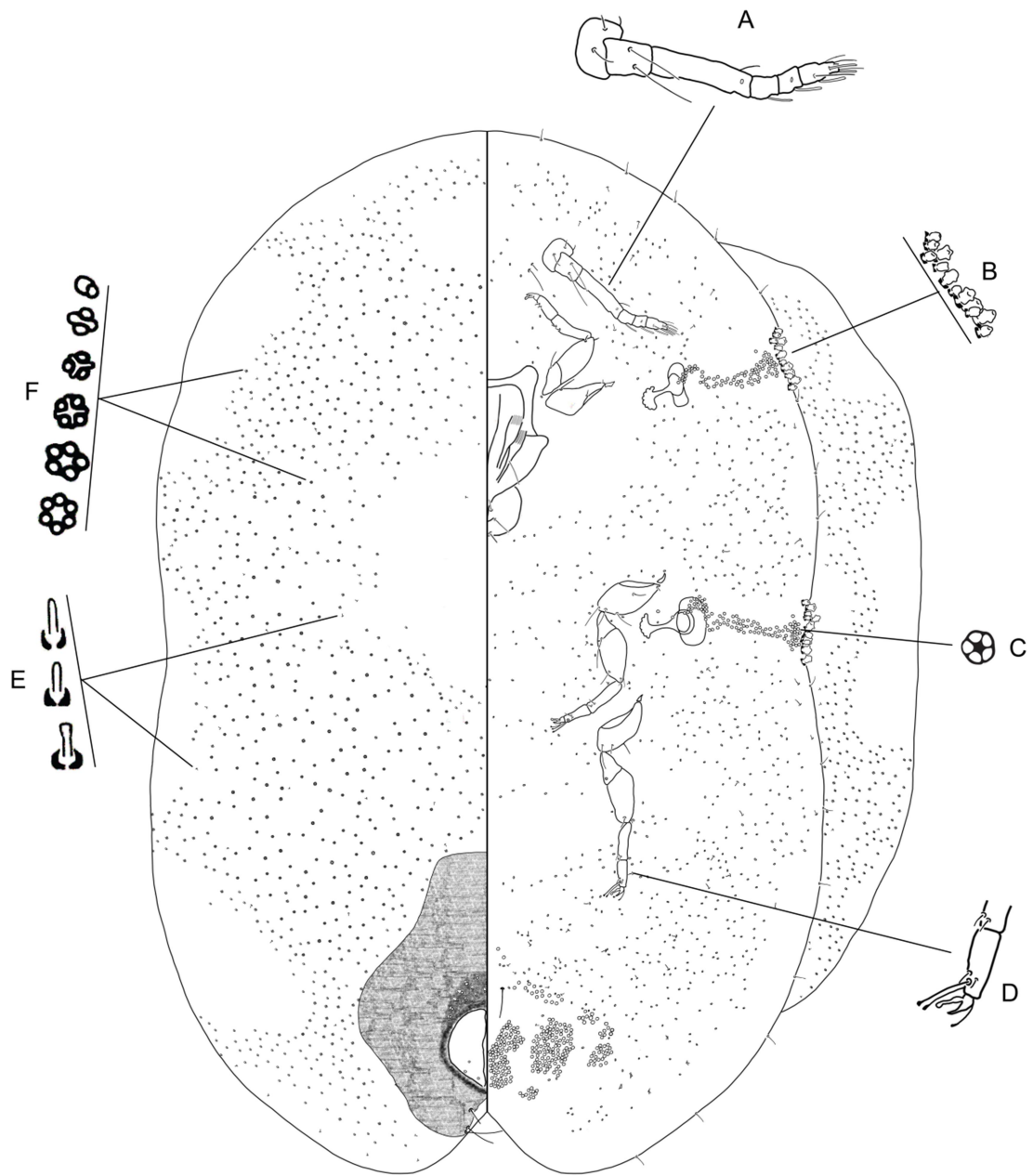


Fig 3 *Ceroplastes* sp.2. A= Antena, B= setas estigmáticas, C= poros estigmáticos, D= detalhe da junção tíbia-tarso, E= setas dorsais, F= poros dorsais.

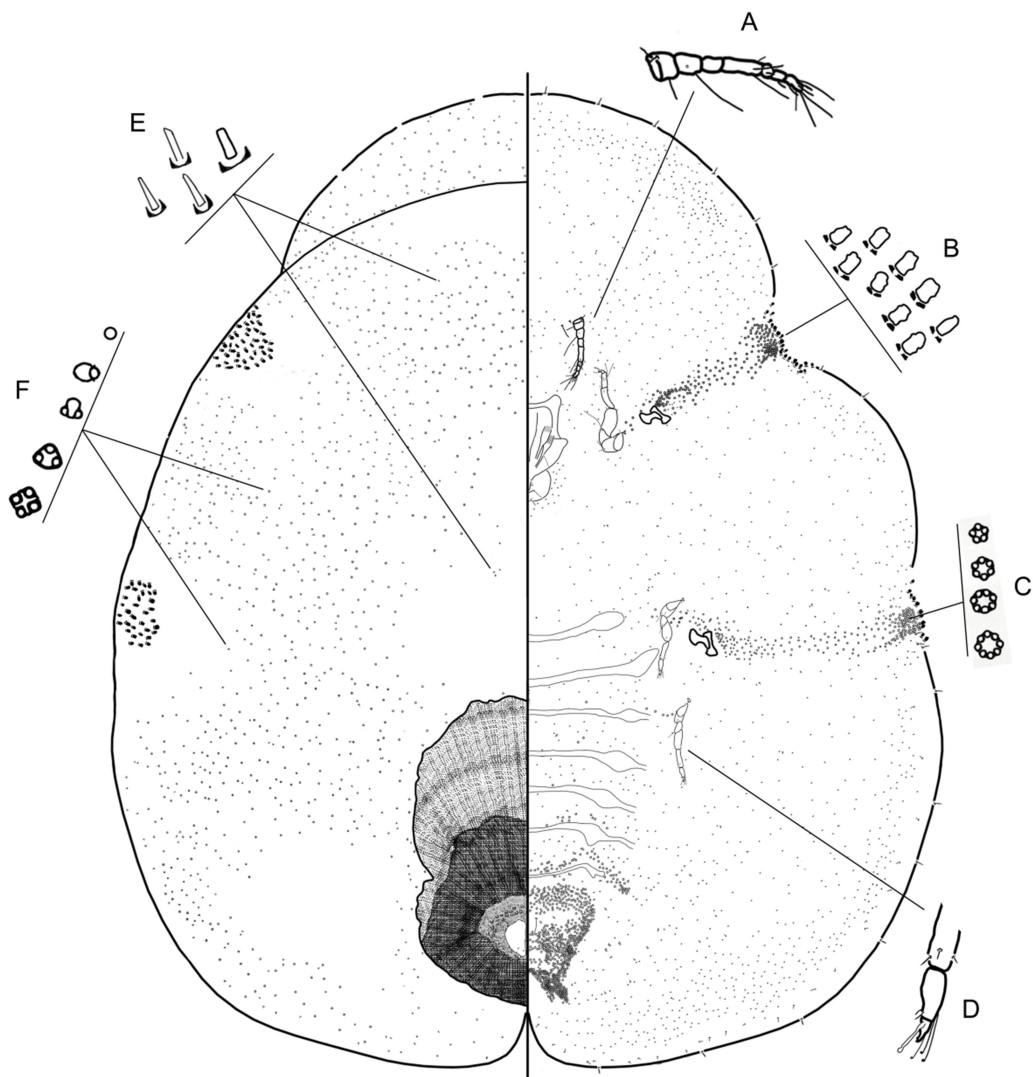


Fig 4 *Ceroplastes* sp.3. A= Antena, B= setas estigmáticas, C= poros estigmáticos, D= detalhe da junção tíbia-tarso, E= setas dorsais, F= poros dorsais.

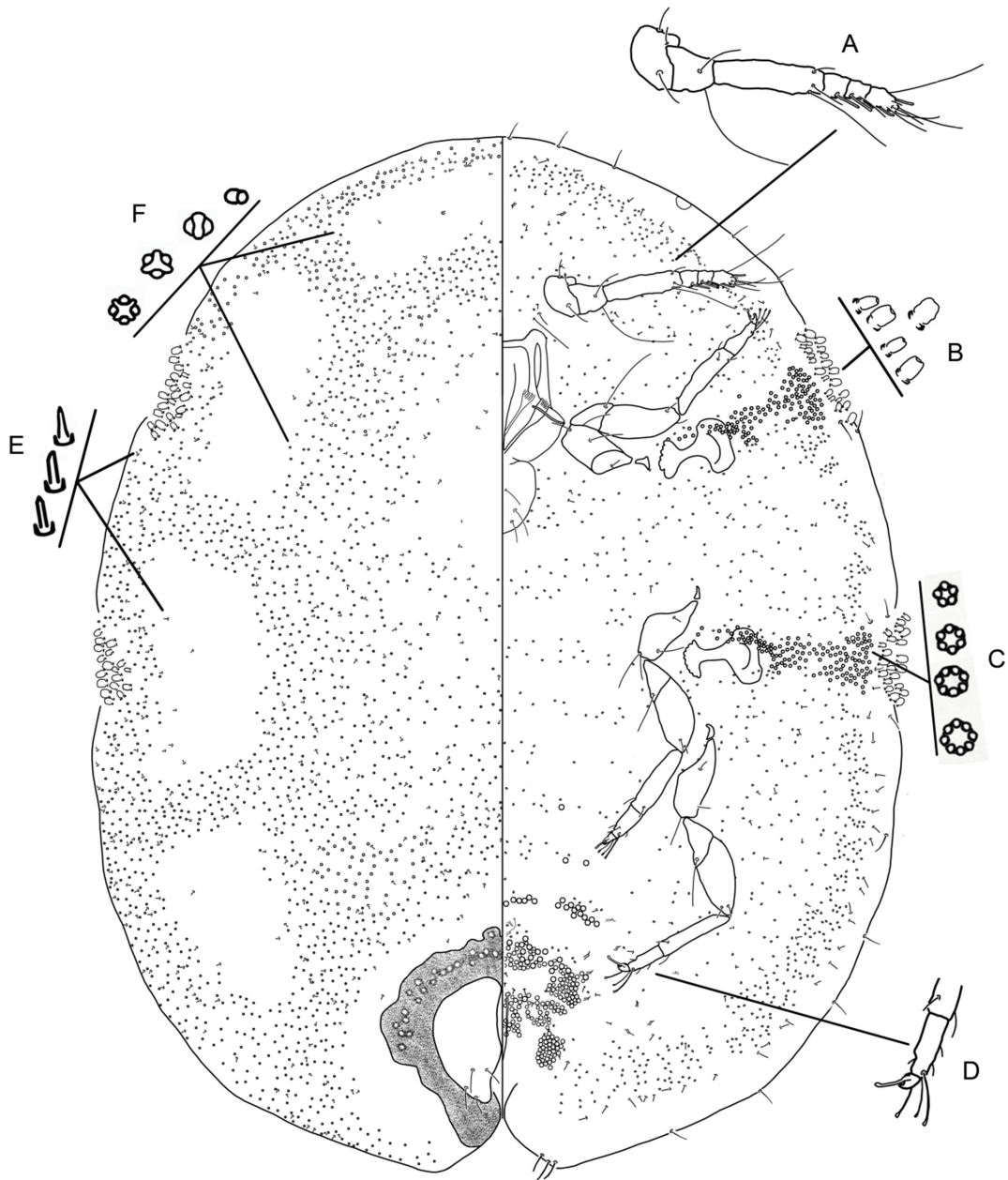


Fig 5 *Ceroplastes* sp.4. A= Antena, B= setas estigmáticas, C= poros estigmáticos, D= detalhe da junção tíbia-tarso, E= setas dorsais, F= poros dorsais.

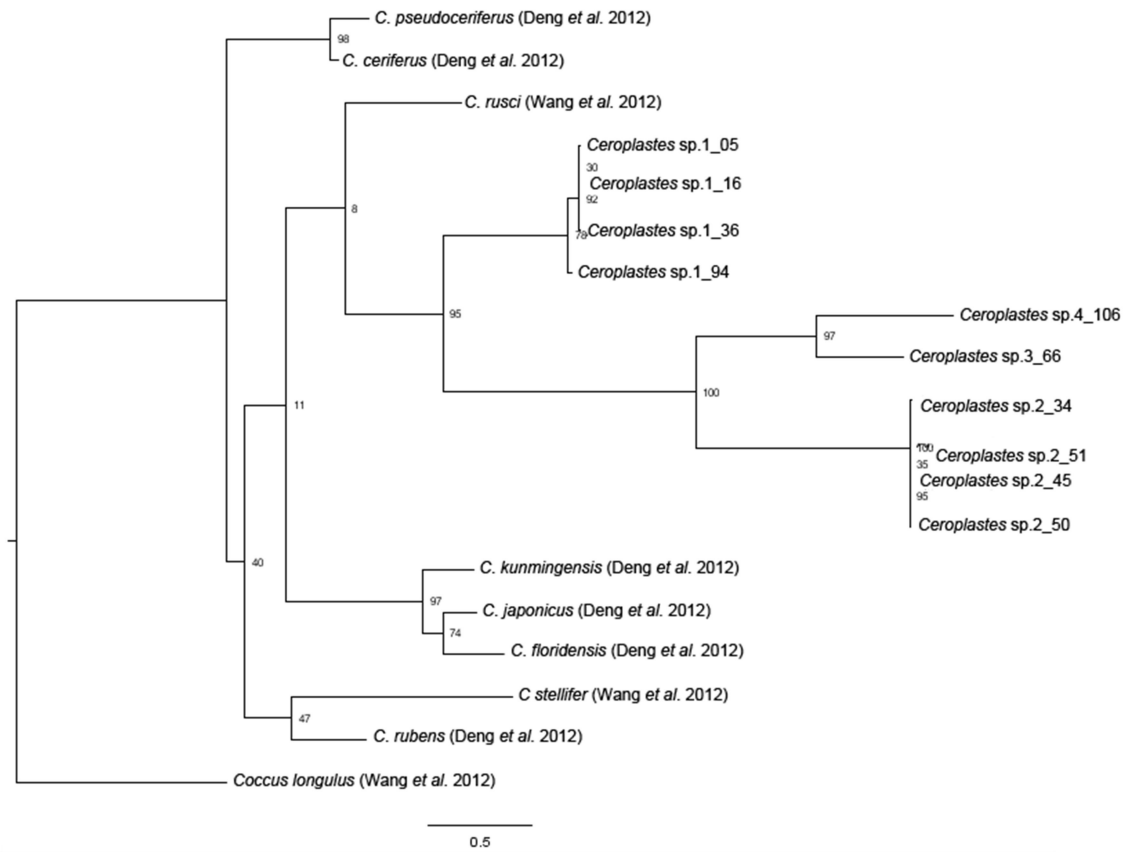


Fig 7 Árvore de consenso da análise de verossimilhança de fragmentos de COI (DNA mitocondrial); os números ao lado dos nós são os valores de *bootstrap*; a espécie *Coccus longulus* (Douglas) foi utilizada como grupo externo.

**Capítulo II – Polifenismo sazonal e variações no comportamento de
Ceroplastes glomeratus Peronti 2008 (Hemiptera: Coccidae) [◇]**

[◇]Submetido à Neotropical Entomology

Correspondencia para: Keila de Cássia Coelho Rosa, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil, tel/fax: (16) 3351-8322, keilacoelho@yahoo.com.br

Sistemática, morfologia e fisiologia

Polifenismo sazonal e variações no comportamento de *Ceroplastes glomeratus* Peronti (Hemiptera: Coccidae)

KCC Rosa¹, ALBG Peronti², FL Cônsoli³, CR Sousa-Silva⁴

¹Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Depto de Ecologia e Biologia Evolutiva, Univ Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

²Depto de Fitossanidade, Fac de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

³Depto de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Univ de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil

⁴Depto de Ecologia e Biologia Evolutiva, Univ Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

Resumo

Polifinismo sazonal e variações no comportamento de *Ceroplastes glomeratus* Peronti (Hemiptera: Coccidae). A cochonilha cerosa *Ceroplastes glomeratus* mostra diferenças sazonais do fenótipo e do comportamento. Indivíduos desenvolvem-se gregariamente durante o outono, e solitários na primavera. Além das diferenças no comportamento, as formas de primavera (“forma isolada”) e de outono (“forma agregada”) também produzem diferentes morfotipos. Nós fornecemos dados adicionais aos dados morfológicos das espécies baseados nas características macroscópicas e microscópicas das fêmeas adultas e do primeiro ínstar das duas formas adultas de *C. glomeratus*.

Palavras-chave

Morfologia, cochonilha, taxonomia, cochonilhas cerosas

Abstract

Seasonal polyphenism and behavioral variations of *Ceroplastes glomeratus* Peronti (Hemiptera: Coccidae). The wax scale *Ceroplastes glomeratus* shows seasonal behavioral and phenotype differences. Individuals develop gregariously during autumn, while solitarily in spring. Besides such behavioral differences, spring (“isolated morph”) and autumn (“aggregated morph”) morphs will also produce different morphotypes. We provide additional data on the morphological data of the species based on the microscopic and macroscopic characteristics of adult females and of first-instars of the two adult morphs of *C. glomeratus*.

Keywords

Morphology, soft scale, taxonomy, wax scale

Introdução

Polifenismo é uma resposta plástica do genótipo para estímulos internos e/ou externos, assim como em condições de estresse ambiental (nutrição, temperatura, aglomeração, entre outros), e esta plasticidade de desenvolvimento está relacionada com o sucesso de adaptação de várias espécies de insetos (Mayr 1963, Greene 1989, Smith 1991, Strübing & Drosopoulus 2005). Polifenismo em insetos pode ser apresentado de várias maneiras, mas polifenismos de casta e sazonal estão entre os mais comuns (Simpson *et al* 2011). Polifenismo sazonal é um bom exemplo de como os insetos podem se beneficiar da sua plasticidade do desenvolvimento, e é definido como “um padrão de mudança fenotípica que se repete anualmente, sob algum tipo de controle ambiental” (Shapiro 1976). Além disso, a ocorrência de diferentes tipos morfológicos pode causar identificação incorreta de espécies devido ao não reconhecimento como resposta polifênica, particularmente para espécies em que os tipos morfológicos diferentes não se sobrepõem durante o seu desenvolvimento (Grella *et al* 2015).

Entre os Coccoidea, os poucos exemplos de polifenismo são encontrados nos Diaspididae. Lupo (1943) demonstrou que o diaspidídeo *Mytilococcus ficifoliae* (Berlese) era na verdade a forma de verão de *Mytilococcus conchiformis* (Gmelin). Diferenças morfológicas observadas para essas formas sazonais também foram relacionadas ao tecido da planta hospedeira em que cada morfotipo estava associado. A forma *ficifoliae* foi encontrada alimentando-se sobre folhas de figueiras, enquanto que a forma *conchiformis* sobre o galho. *Mytilococcus ficifoliae* foi sinonimizado com *M. conchiformis* e pertence atualmente ao gênero *Lepidosaphes* Shimer (García *et al* 2016). Variações fenotípicas nos diaspidídeos em resposta à sua associação com diferentes tecidos da planta hospedeira são conhecidas para algumas espécies (Takahashi 1953,

Stannard 1965, Takagi & Kawai 1967, Knipscher *et al* 1976, Liu *et al* 1989), e esse polifenismo induzido pela associação com diferentes tecidos da planta hospedeira foi referido como “polifenismo induzido pelo local no hospedeiro” (Liu *et al* 1989). Mas diferentes morfotipos associados com o mesmo tecido da planta hospedeira em diferentes épocas do ano também foram descritos (Takagi 2012).

Polifenismo sazonal entre os Coccidae são extremamente raros, mas nós fomos capazes de demonstrar neste estudo a existência de dois tipos morfológicos em *Ceroplastes glomeratus* Peronti (Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae). *Ceroplastes glomeratus* é uma espécie Neotropical, conhecida somente para o Brasil. Os Ceroplastinae são normalmente conhecidos como cochonilhas de cera porque as fêmeas adultas tem uma grossa cobertura de cera recobrando toda a região dorsal. *Ceroplastes* Gray é o maior gênero de Ceroplastinae com 145 espécies descritas em todo o mundo (García *et al* 2016). *Ceroplastes glomeratus* foi descrita ocorrendo sobre Fabaceae, mas também registrada sobre Asteraceae e Anacardiaceae, apresentando somente a forma aglomerada (Peronti *et al* 2008).

Também fornecemos aqui dados morfológicos e comportamentais adicionais de *C. glomeratus*, bem como relatamos a ocorrência de polifenismo sazonal e fornecemos uma análise morfológica comparativa para caracterizar cada forma.

Materiais e Métodos

Fêmeas adultas e ovipositando da forma aglomerada de *C. glomeratus*, identificadas como descrito por Peronti *et al* (2008), foram coletadas sobre *Inga* sp. (Fabaceae) no município de São Carlos (22°01'S–47°53'W), estado de São Paulo, Brasil, em julho de 2012. Os insetos foram colocados em tubos de vidro, fechados com algodão até a

emergência das ninfas. Parte das ninfas de primeiro instar recém-emergidas foi montada em lâminas permanentes e o restante foi colocado sobre mudas de *Inga* sp. para serem criadas, com condições não controladas, no laboratório de Entomologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, por duas gerações. As formas obtidas de cada geração foram submetidas às análises molecular e morfológica.

Análise Molecular

Adultos (2) de cada forma foram individualmente submetidos à uma extração de DNA não-destrutiva seguindo Gilbert *et al* (2007), como modificado por Dossi *et al* (2014). O exoesqueleto dos insetos foi removido do “buffer” de digestão, armazenado em etanol a 70%, e, posteriormente, montado em lâmina permanente de acordo com Granara de Willink (1989) para comprovação da identificação da espécie.

O DNA obtido foi submetido à amplificação de PCR do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI), usando o conjunto de “primers” C1-1554F (5'-CAGGAATAATAGGAACATCAATAAG-3') e C1-2342R (5'-ATCAATGTCTAATCCGATAGTAAATA-3') (Deng *et al* 2012), e o segmento (D2) do rDNA 28S rDNA, utilizando os “primers” D2-3566F (5'TGCAGCTCTAAGTTGGTGGT-3') e D2-4068R (5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG- 3') (Campbell *et al* 1993). As reações de PCR continham 1 µL de DNA total, 5 µL de 5x Green Reaction Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,32 µM de cada “primer”, 1 unidade de Taq-Dna polimerase em um volume total de reação de 25 µL. As condições do termociclador foram 3 min a 95°C (1x), seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 52°C por 50s e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72 °C. Para visualização dos fragmentos amplificados

foi utilizado eletroforese em gel de agarose a 1%, usando TAE “buffer” com brometo de etídeo, em uma voltagem constante (100V), e os fragmentos foram observados com a ajuda de um transiluminador.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando precipitação com etanol a 80% (Davis *et al* 1994) e submetidos a tratamento ExoSAP (Fermentas) seguindo as recomendações do fabricante para a limpeza antes do sequenciamento. As amostras foram sequenciadas bidirecionalmente usando o conjunto original de “primers” no “Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP)” ([http:// genoma.ib.usp.br/](http://genoma.ib.usp.br/)). As sequências obtidas foram analisadas, editadas e alinhadas usando o programa “Sequencher” versão 4.2 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). As sequências resultantes foram também comparadas às sequências depositadas no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo de busca para identificação de espécies “Blastn”. Todas as sequências obtidas foram depositadas no banco de dados do NCBI (números de acesso no GenBank: KX650805–KX650808 e KX670819– KX670822).

Análise Morfológica

Adultos e ninfas de primeiro ínstar de cada geração foram montadas em lâminas permanentes de acordo com Granara de Willink (1989) e estudadas sob um microscópio óptico Olympus CBA; as descrições morfológicas foram baseadas em cinco adultos e seis ninfas de primeiro ínstar de cada geração, seguindo a terminologia de Hodgson & Peronti (2012) para os adultos e de Rosa *et al* (2011) para as ninfas. Imagens digitais

foram adquiridas com uma câmera Nikon D3200 acoplada a um estéreo microscópio Olympus SZ40.

Todos os espécimes utilizados nas análises morfológicas e moleculares, montados em lâminas permanentes, foram depositados na Coleção Entomológica do Laboratório de Entomologia Econômica, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos.

Resultados

Ceroplastes glomeratus apresentou duas gerações entre julho de 2012 e julho de 2013 na criação dentro do laboratório. Adultos da primeira geração foram coletados para as análises em 29 de Novembro de 2012 (final da primavera) e aqueles da segunda geração em 20 de maio de 2013 (final do outono), ambos coletados sobre galhos de *Inga* sp. (Fabaceae). Os adultos da geração de primavera apresentaram diferenças morfológicas e comportamentais dos seus parentais. Adultos amostrados na primavera não mostraram o comportamento agregado como de seus parentais, e foram então nomeados como “forma isolada” (Figs 1a–d). Os adultos da geração de outono retornaram para o comportamento aglomerado dos adultos coletados em campo. Indivíduos do outono foram densamente agregados, formando uma massa de cera a qual torna difícil a distinção dos limites de cada espécime. Esses espécimes foram nomeados como “forma aglomerada” (Figs 1e–g). Embora os adultos tenham exibido diferenças morfológicas e comportamentais, as ninfas de primeiro instar obtidas de cada uma das gerações de *C. glomeratus*, sob condições de laboratório, não mostraram qualquer diferença que pudesse ser detectada.

Análise Molecular

A análise molecular das sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) e o segmento (D2) do 28S do rDNA de ambos morfotipos resultaram em 100% de similaridade entre eles, confirmando que eles pertencem à mesma espécie.

Descrições Morfológicas

Primeiro ínstar (Figs 1i, 2)

Material Não-montado (Fig 1i)

Cera. Fina, vítrea, translúcida, mas pode parecer amarela devido à cor do tegumento do inseto, destacável, cobrindo todo o dorso, com expansões marginais pouco evidentes. Filamentos de cera seca e expansões na região central do dorso ausentes. Bandas estigmáticas são visíveis e restritas às regiões estigmáticas.

Corpo. Oval alongado, 370–430 μm comprimento e 200–225 μm de largura, amarelado na cor. Processo caudal ausente.

Material montado (Fig 2)

Dorso. Derme inteiramente membranosa, áreas claras dorsais ausentes. Poros dorsais simples não detectados. Um par de poros próximo ao ápice da cabeça, 2,5–3,0 μm de diâmetro, com 3 lóculos cada, e dois pares de setas dorsais nitidamente cônicas, mais longas do que a largura da base, 2,5 μm de comprimento e largura da base 2,0 μm , presentes na área dorsal média da cabeça. Poros pré-operculares ausentes. Cada placa anal com margem anterior diagonal e margem posterior arredondada, comprimento das placas: 42–49 μm , largura das placas combinadas: 55–56 μm e individuais: 26–28 μm ; cada com 1 seta ventral de 17–20 μm de comprimento e com 4 setas dorsais na metade

posterior de cada placa: seta apical mais longa, 230–260 μm de comprimento, com 3 setas mais curtas: seta na margem interior 6–9 μm de comprimento, e duas próximas ao ápice, 20–30 μm de comprimento. Dobra anogenital com 1 par de setas. Tubo anal mais curto do que o tamanho da placa anal. Anel anal com 4 pares de setas: 2 setas bem desenvolvidas, 50–58 μm de comprimento; 1 mais curta com 35–45 μm de comprimento; 1 par de setas muito curtas, 6–10 μm de comprimento.

Margem. Setas marginais flageladas, cada 5–9 μm de comprimento, com uma larga base; 6 anteriores entre os olhos, a cada lado: 2 entre os olhos e a área estigmática anterior, 2 lateralmente entre as áreas estigmáticas e 7 entre a área estigmática posterior e o lobo anal, cada lobo anal com 1 seta pouco mais espessa, 10–11 de comprimento. Aberturas estigmáticas rasas, cada com 3 setas estigmáticas com ápice arredondado; seta central 4–5 μm de altura, 4–6 μm de largura, base 4–5 μm de largura, levemente deslocada para o dorso, e setas laterais com ápice arredondado, 3–4 μm de altura, 3–4 μm de largura, base com 3,5–4 μm de largura. Olhos levemente deslocados para o dorso; largura de cada lente 11–12 μm .

Ventre. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais ausentes. Poros do canal estigmático com 5 (raramente 4 e 7) lóculos, e 2,5–3,5 μm de diâmetro; com 2–3 em uma única linha em cada banda de poros estigmáticos. Dutos tubulares ventrais ausentes. Microdutos ventrais com um poro cruciforme, 2–3 μm de largura; com 9–10 microdutos submarginalmente em cada lado do corpo; ausentes no resto do ventre. Setas submarginais como cerdas, 2–4 μm de comprimento, com 2 entre os olhos e, em cada lado: 1 entre as aberturas estigmáticas e 7 entre cada abertura posterior e a abertura anal. Setas ventrais similares às setas submarginais mas levemente mais longas, com 7 em uma fileira longitudinal submediana em cada lado, 3–7 μm de comprimento; com um

par de setas interantenas, cada 25–35 μm de comprimento, e um par de setas pré-genitais, 25–30 μm de comprimento.

Antenas com 6 segmentos, 115–126 μm ; tamanhos dos segmentos (μm): I: 16–20; II: 14–15; III: 29–30; IV: 13–14; V: 17–18; VI: 28–30; setas antenais: segmento I: 3 setas flageladas; II: 2 setas flageladas; III: 3 setas flageladas; IV: 1 seta mais espessa; V: 1 seta mais espessa e 1 seta flagelada; VI: 6–7 setas flageladas e 4 setas mais espessas. Escudo clipeo-labral 95–107 μm de comprimento, com 1 par de setas no clipeo e 4 pares de setas no lábio. Espiráculos com a placa do músculo maior do que o diâmetro do peritreme: diâmetro do peritreme 6–7 μm ; comprimento da placa do músculo 8–13 μm . Pernas bem desenvolvidas, sem esclerotização tíbio-tarsal; cada garra com um denticulo; digítulos tarsais desiguais no tamanho e espessura, um mais curto e mais delgado do que outro, cada 27–30 μm e 37–40 μm de comprimento respectivamente, mas ambos dilatados no ápice, digítulos da garra desiguais, um mais largo do que outro, 19–23 μm de comprimento; dimensões das pernas metatorácicas (μm): coxa 35–40; trocânter + fêmur 65–73; tibia 45–50, tarso 32–38, e garra 15–16; com 3 setas na tibia e 4 no tarso.

Fêmeas Adultas

Forma isolada (Figs 1a–d, 1j, 3)

Material não-montado

Fêmeas adultas jovens: mais ou menos oval no formato; com uma carapaça branca de cera úmida cobrindo a superfície dorsal do corpo, exceto por uma área ao redor das placas anais, mais a região do núcleo médio-dorsal e dos sete núcleos submarginais, os quais são desprovidos de cera úmida e são preenchidos com cera vítrea translúcida; cera

úmida não dividia em placas; Bandas estigmáticas brancas e largas, pouco desenvolvidas e visíveis sobre a região marginal da cera úmida e confinadas às áreas estigmáticas (Figs 1a–b).

Fêmeas adultas velhas: formato levemente hemisférico, derme dorsal mais esclerotizada e cera úmida branca, tornando-se mais fina sobre o dorso, algumas vezes permitindo visualizar a derme esclerotizada (Figs 1c–d).

Corpo. 0,9–1,6 mm de comprimento e 0,6–1,3 mm de largura, cor castanho claro. Pequena esclerotização do processo caudal (Fig 1j).

Material montado (Fig 3)

Dorso. Derme inteiramente membranosa quando jovem, exceto pela pequena esclerotização do processo caudal; derme torna-se mais esclerotizada nos indivíduos mais velhos. Processo caudal um pouco mais largo do que longo, estendendo-se sobre o dorso, 0,35–0,5 mm de largura e 0,3–0,4 mm de comprimento. Derme com 8 áreas claras sendo: 1 cefálica, 1 médio-dorsal e 3 pares laterais, todas destituídas de poros ou setas, exceto área clara cefálica que pode apresentar um par de setas. Setas dorsais com formatos e tamanhos variáveis: (i) cônicas, comprimento: 5–6 μm , aproximadamente 1,6–2,0x mais longas do que a largura da base, largura da base: 3 μm ; (ii) cilíndricas ou com as laterais levemente convergentes e ápices que podem variar de truncado, arredondado ou truncado em uma das laterais, comprimento: 2,0–4,5 μm , 0,6–1,5x mais longos do que a largura da base; largura da base: 3 μm . Poros dorsais: (i) microdutos loculados com 1–4 lóculos satélites, principalmente com 2 lóculos satélites, 2–4 μm de largura; e (ii) microdutos simples não detectados. Poros preoperculares facilmente visíveis: 20–30 em uma estreita banda de 1–2 poros de largura, presentes ao redor da

margem anterior das placas anais, estendendo-se para cada extremidade, 4 μm de largura. Placas anais com margem externa arredondada, comprimento das placas: 87–107 μm , largura das placas combinadas: 87–108 μm ; cada placa com 3 longas setas dorsais: 35–50 μm de comprimento e uma curta seta subapical: 10–15 μm de comprimento. Dobra anogenital com 4 pares de setas. Tubo anal curto, mais curto do que o comprimento das placas anais.

Margem. Setas marginais flageladas; 15–21 μm de comprimento; 6 anteriores entre os olhos, a cada lado: 2 entre os olhos e a área estigmática anterior, 2 entre as áreas estigmáticas e 7 no abdomen; cada lobo anal com 1 seta. Aberturas estigmáticas rasas, com 35–42 setas estigmáticas; cada grupo mais largo do que longo, com 2–4 fileiras irregulares de setas estigmáticas; cada grupo de setas estigmáticas estendendo-se ao longo das margens mas não se encontram entre as aberturas; setas estigmáticas cônicas ou cilíndricas com o ápice levemente achatado; cada seta com 5–12 μm de largura na base e 6–10 μm de comprimento. Olhos 15–19 μm de largura.

Ventre. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais abundantes ao redor da vulva e no segmento VI; 4 medialmente e 4–6 submedialmente em cada lado no segmento V; 0–1 medialmente no segmento IV. Poros do canal estigmático presentes em uma banda de 40–47 poros, cada banda 1,0–1,5x a largura do peritreme perto da margem, com poucos poros estendendo-se além da área do peritreme. Microdutos ventrais com 3 μm de largura, presentes em toda região ventral e mais abundantes em uma banda submarginal. Dutos ventrais tubulares sem uma glândula terminal evidente; ausentes entre as antenas e esparsos na região submediana dos segmentos abdominais III–VI. Setas submarginais mais abundantes do que as setas marginais, cada 5–8 μm de comprimento.

Antenas com 7 segmentos; 202–222 μm de comprimento. Escudo cípeo-labral 162–225 μm de comprimento. Espiráculo: largura do peritreme 35–40 μm . Pernas desenvolvidas, com esclerotização na articulação tíbio-tarsal; garra com denticulo; digítulos da garra ambos dilatados e mais curtos do que os digítulos tarsais; dimensões das pernas metatorácicas (μm): coxa 80–90; trocânter + fêmur 120–135; tíbia 85–95; tarso 55–57, e garra 20–21.

Forma aglomerada (Figs 1e–h, 1k–n, 4, 5)

Material não-montado. Fêmea adulta jovem: densamente agregados ao redor do galho, cera frequentemente tocando os indivíduos vizinhos mas não fundidas; formato mais ou menos oval, cobertos com uma cera úmida e completa ausência de divisões da cera em placas. Núcleo mediodorsal, sete núcleos submarginais e uma área ao redor da placa anal com ausência de cera úmida, mas preenchidos com uma cera vítrea translúcida. Bandas estigmáticas espessas e coloração branca, pouco desenvolvidas e visíveis sobre a região marginal da cera úmida e confinadas às áreas estigmáticas (Fig 1e).

Fêmeas adultas velhas: carapaça de cera mais espessa, completamente fundida entre os indivíduos adjacentes, formando uma massa de cera ao redor do galho (Figs 1f–g); Bandas estigmáticas bem desenvolvidas, espessas e estendendo-se em direção ao dorso (Fig 1h); crescimento do corpo no sentido vertical (indivíduos mais altos do que largos), em direção ao dorso (Figs 1h, 1n); processo caudal fundido com uma esclerotização dorsal no centro do dorso, parecendo uma mancha escura sobre o dorso (Figs 1m–1n).

Corpo. Comprimento do corpo: 1,4–3,5 mm e largura: 1,1–2,5 mm, coloração marrom clara. Quando jovem, presença de uma pequena esclerotização do processo caudal, mas com a idade, presença de uma área esclerotizada no meio do dorso estendendo-se do

processo caudal à cabeça, cobrindo a maior parte mediana do dorso nos indivíduos mais velhos (Figs 1k–1n).

Material montado (Figs 4–5).

Dorso. Derme inteiramente membranosa, exceto por forte esclerotização do processo caudal. Processo caudal 0,45–1,5 mm de largura e 0,3–2,0 mm de comprimento, desenvolvido sobre o dorso. Derme com 8 áreas claras destituídas de poros e setas e distribuídas como segue: 1 cefálica, 1 médio-dorsal (visível somente em indivíduos mais jovens) e 3 pares laterais. Setas dorsais de formatos e tamanhos variáveis: (i) cônicas, comprimento 3–5 μm , aproximadamente 1,0–1,7x mais longas do que a largura da base, largura da base 3 μm , (ii) cilíndricas ou com as laterais levemente convergentes e ápices que podem variar de truncado, arredondado ou truncado em uma das laterais, comprimento 4–6 μm , aproximadamente 1,0–1,5x mais longos do que a largura da base; largura da base 3–4 μm . Poros dorsais: (i) microdutos loculados com 1–4 lóculos satélites, principalmente com 2 lóculos satélites, 3–5 μm de largura; (ii) microdutos simples não detectados. Poros preoperculares: 6 em uma banda transversal ao longo da margem anterior das placas anais, difíceis de visualizar, 2–3 μm de largura. Placas anais ligeiramente alongadas, com a margem exterior arredondada e ápice pontiagudo; comprimento das placas 130–140 μm , largura das placas combinadas 125–130 μm , cada placa com três longas setas dorsais, 40–50 μm de comprimento, dispostas em um triângulo, uma curta seta subapical, 17–25 μm de comprimento. Dobra anogenital com 4 pares de setas na margem anterior. Tubo anal curto, aparentemente menor do que o comprimento da placa anal.

Margem. Setas marginais flageladas; 20–23 μm de comprimento; 6 anteriores entre os olhos, a cada lado do corpo: 2 entre os olhos e área estigmática anterior, 2 entre as áreas estigmáticas e 6–7 no abdômen, cada lobo anal com 1 seta. Aberturas estigmáticas bastante distintas, com aproximadamente 110–125 setas; cada grupo mais largo do que longo, com 8–10 fileiras irregulares de setas estigmáticas, estendendo-se dorsalmente; setas estigmáticas cônicas ou cilíndricas com ápice arredondado ou levemente achatado; cada seta 5–9 μm de largura na base e 6–10 μm de comprimento. Olhos 15–17 μm de largura.

Ventre. Derme inteiramente membranosa. Poros pré-genitais abundantes ao redor da vulva e nos segmentos IV–VI, 9 medialmente e 3–5 submedialmente em cada lado do segmento III, 3–4 medialmente no segmento II. Poros do canal estigmático em uma banda de mais de 100 poros, cada banda tão larga medialmente quanto o peritreme e aproximadamente 3,0x a largura do peritreme perto da margem, poucas estendendo-se além do peritreme. Microdutos ventrais de 3 μm de largura, dispersos pela região ventral e abundantes na região submarginal. Dutos tubulares ventrais sem uma glândula terminal evidente, ausentes entre as antenas, e esparsos submedialmente nos segmentos abdominais II–V. Setas submarginais mais abundantes do que as setas marginais, com 10–13 μm de comprimento.

Antenas com 7 segmentos; 245–335 μm . Escudo clipeo-labral 225–285 μm de comprimento. Espiráculos: largura do peritreme 55–65 μm . Pernas desenvolvidas, esclerotização tíbio-tarsal presente, garra com denticulo; digítulos da garra ambos mais espessos e curtos do que os digítulos tarsais; dimensões das pernas metatorácicas (μm): coxa 110–150; trocânter + fêmur 130–160; tíbia 100–135; tarso 60–80 e garra 20–25.

Discussão

Os adultos de *Ceroplastes glomeratus* apresentaram dois tipos de formas adultas diferentes (fenótipos) durante o ano, como confirmado pela análise molecular e criação em laboratório. A espécie observada mostrou um comportamento agregado (forma aglomerada) ou isolado (forma isolada), respectivamente no outono e primavera, com ambas formas alimentando-se sobre galhos de *Inga* sp. Além das diferenças de comportamento, as principais diferenças observadas entre as formas foram uma grande diferença no número total de setas estigmáticas e de poros dos canais estigmáticos, sendo esses valores significativamente maiores na forma aglomerada. Os poros pré-operculares presentes sobre a derme ao longo da margem anterior das placas anais foram mais numerosos e fáceis de visualizar na forma isolada. Além disso, a forma isolada é menos esclerotizada, apresentando um pequeno processo caudal quando comparada à forma aglomerada, a qual mostra uma forte área esclerotizada estendendo-se da porção final do abdomen até a cabeça, cobrindo a maior parte mediana do dorso. Em contraste, as ninfas de primeiro ínstar das formas aglomerada e isolada foram similares.

Elucidar as razões das mudanças de comportamento e morfológicas e quando essas variações ambientais são notadas, se pelos genitores ou durante o desenvolvimento da prole, não foram os objetivos deste estudo. Entretanto, há várias causas ambientais que poderiam estar envolvidas na determinação dos dois fenótipos descritos, como já foram relatadas induzindo o desenvolvimento de polifenismos em algumas espécies, como temperatura, umidade, fotoperíodo, entre outras (Smith 1991, Roskam & Brakefield 1996, Yamamoto *et al* 2011). Portanto, experimentos adequados deveriam ser elaborados para investigar os fatores que induzem a plasticidade

morfológica no desenvolvimento de *Ceroplastes glomeratus*, e os benefícios evolutivos associados com cada morfotipo. Além disso, a ocorrência de morfotipos deveria ser verificada em outras espécies, como *Ceroplastes bruneri* Cockerell & Cockerell, *Ceroplastes lahillei* Cockerell, *Ceroplastes caesalpiniae* Reyne e *Ceroplastes madagascariensis* Targioni Tozzetti, que de acordo com Peronti *et al* (2008) também apresentam indivíduos densamente agregados, formando uma massa de cera.

Diferenças macro e microscópicas nos traços morfológicos de espécimes para outras dentro do mesmo gênero geralmente não são suficientes para assegurar seu “status” como uma nova espécie. Em casos onde criações em laboratório e estudos biológicos não podem ser desenvolvidos para confirmar que as diferenças nos tipos morfológicos são devidas ao polifenismos, como em *C. glomeratus*, erros na identificação de espécies podem ocorrer se ferramentas moleculares não são usadas. Identificações incorretas de espécies podem levar a desinformações sobre as características ecológicas de organismos e tem implicações na gestão de recursos naturais e agrícolas, bem como em humanos (van Borthel *et al* 2001, Bortolus 2008, Shea *et al* 2011, Bin *et al* 2012).

Agradecimentos. Somos gratos ao Dr. Takumasa Kondo (CORPOICA, Palmira, Colombia) pela revisão inicial deste manuscrito, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Bin F, Roversi PF, van Lenteren JC (2012) Erroneous host identification frustrates systematics and delays implementation of biological control. *Redia* 95: 83-88
- Bortolus A (2008) Error cascades in the biological sciences: The unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO* 37: 114–118
- Campbell BC, Steffen-Campbell JD, Werren JH (1993) Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol Biol* 2(4): 225–237.
- Davis LB, Kuehl WM, Battey JF (1994). *Basic methods in molecular biology*. 2nd Ed., Appleton and Lange, East Norwalk, CT., p. 777
- Deng JUN, Yu F, Zhang TX, Hu HY, Zhu CD, Wu SA, Zhang YZ (2012) DNA barcoding of six *Ceroplastes* species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. *Mol Ecol Resour* 12(5): 791–796.
- Dossi FCA, Silva EP, Cònsoli FL (2014) Population dynamics and growth rates of endosymbionts during *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae) ontogeny. *Microb Ecol* 68: 881–889.
- García M, Denno B, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y, Hardy NB (2016) ScaleNet: A Literature-based model of scale insect biology and systematics. <http://scalenet.info>
Accessed: February 2016.
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE* 2(3):e272.

- Granara de Willink MC (1989) Conociendo nuestra fauna I. Superfamilia Coccoidea (Homoptera: Sternorrhyncha). Serie Monográfica y Didáctica, n° 6. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, pp. 43
- Greene E (1989) A diet-induced developmental polymorphism in a caterpillar. *Science* 243(4891): 643–646
- Grella MD, Savinoa AG, Paulo DF, Mendes FM, Azeredo-Espin, AML, Queiroz, MMC, Thyssend PJ, Linhares AX (2015) Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. *Acta Trop* 141: 60-72.
- Hodgson CJ, Peronti ALBG (2012) A revision of the wax scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Ceroplastinae) of the Afrotropical Region. *Zootaxa* 3372: 1–265
- Knipscher RC, Miller DR, Davidson JA (1976) Biosystematics of *Chionaspis nyssae* Comstock (Homoptera: Diaspididae), with evidence supporting leaf and bark dimorphism of the scale. *Melandria* 25: 1–30.
- Liu T, Kosztarab M, Rhoades M 1989. I. Biosystematics of the adult females of the genus *Chionaspis* (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae) of North America, with emphasis on polymorphism. *Studies on the morphology and systematics of scale Insects* 15. Virginia Polytechnic Institute and State University Agriculture Experiment Station Bulletin 88–2:1–126
- Lupo V (1943) *Mytilococcus ficifoliae* (Berlese) e una forma estiva del *M. conchiformis* (Gmelin). *Boll Lab Zool Gen Agr R Scuola Super Agric, Portici* 5: 196–205.

- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, p.797
- Peronti ALBG, Sousa-Silva CR, Granara de Willink MC (2008) Revisão das espécies de Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera, Coccoidea, Coccidae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol* 52(2): 139–181.
- Rosa KCC, Peronti ALBG, Sousa-Silva CR (2011) Description of the immature female stages of *Ceroplastes janeirensis* (Gray) (Hemiptera: Coccidae) with special reference to the development of the wax test. *Zootaxa* 2808: 18–30.
- Roskam JC, Brakefield PM (1996) A comparison of temperature-induced polyphenism in African *Bicyclus* butterflies from a seasonal savannah-rainforest ecotone. *Evolution* 50(6): 2360–2372.
- Shapiro AM (1976) Seasonal polyphenism. *Evol Biol* 9: 259–333.
- Shea CP, Peterson JT, Wisniewski JM, Johnson NA (2011) Misidentification of freshwater mussel species (Bivalvia:Unionidae): Contributing factors, management implications, and potential solutions. *J N Am Benthol Soc* 30: 446–458.
- Simpson SJ, Sword GA, Lo N (2011) Polyphenism in insects. *Curr Biol* 21(18): R738–R749. doi 10.1016/j.cub.2011.06.006
- Smith KC (1991) The effects of temperature and day length on the *Rosa* polyphenism in the buckeye butterfly, *Precis coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J Res Lepid* 30(3–4): 225–236.
- Stannard LJ (1965) Polymorphism in the Putnam's scale, *Aspidiotus ancylus* (Homoptera: Coccoidea). *Ann Entomol Soc Am* 58: 573–576.
- Strübing H, Drosopoulos S (2005) Photoperiodism, morphology and acoustic behaviour in the leafhopper genus, *Euscelis*. In: Drosopoulos S, Claridge MF (Eds.). *Insect*

Sounds and Communication: Physiology, Behaviour, Ecology, and Evolution. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 255–262

Takagi S (2012) Two new species of *Aulacaspis* from Japan, with notes on a strange organ and seasonal variation (Sternorrhyncha: Coccoidea: Diaspididae). *Insecta Matsumurana* 68: 117–132.

Takagi S, Kawai S (1967) The genera *Chionaspis* and *Pseudaulacaspis* with a criticism on *Phenacaspis* (Homoptera: Coccoidea). *Insecta Matsumurana* 30: 29–43.

Takahashi R (1953) Dimorphism in some species of *Chionaspis* or *Phenacaspis* (Diaspididae, Coccoidea, Homoptera). *Boll Lab Zool Gen Agr Filippo Silvestri, Portici* 33: 48–56.

Van Bortel W, Harbach RE, Trung HD, Roelants P, Backeljau T, Coosemans M (2001) Confirmation of *Anopheles varuna* in Vietnam, previously misidentified and mistargeted as the malaria vector *Anopheles minimus*. *Am J Trop Med Hyg* 65(6): 729–732.

Yamamoto K, Tsujimura Y, Kometani M, Kitazawa C, Islam ATMF, Yamanaka A (2011) Diapause pupal color diphenism induced by temperature and humidity conditions in *Byasa alcinous* (Lepidoptera: Papilionidae). *J Insect Physiol* 57: 930–934.

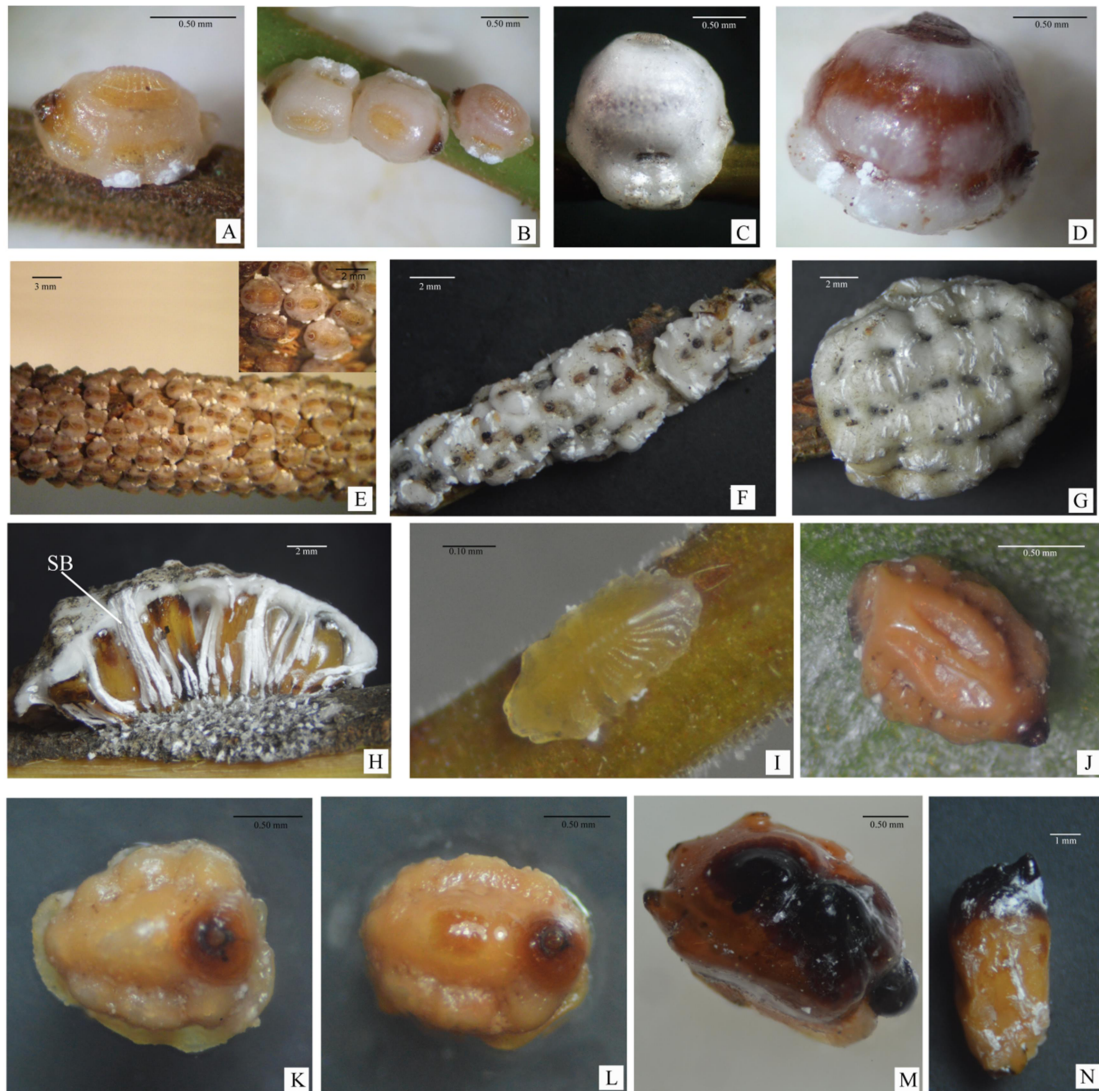


Figure 1. *Ceroplastes glomeratus* Peronti 2008. A–B. Wax test of young adult females (isolated form); C–D. Wax test of old adult females (isolated form). E. Wax test of young adult female (agglomerated form); F–G. Wax test of old adult female (agglomerated form); H. Lateral view of old adults females with lateral wax removed (agglomerated form), where: SB = stigmatic band; I. Wax test on first-instar nymph; J. Dorsal view of adult female (isolated form) with wax test removed, showing short caudal process. K–M. Dorsal view of adult females (agglomerated form) with wax test removed, showing development of dorsal sclerotization and caudal process; N. Lateral view of mature specimen with wax removed (agglomerated form), with strong sclerotization of caudal process on dorsum.

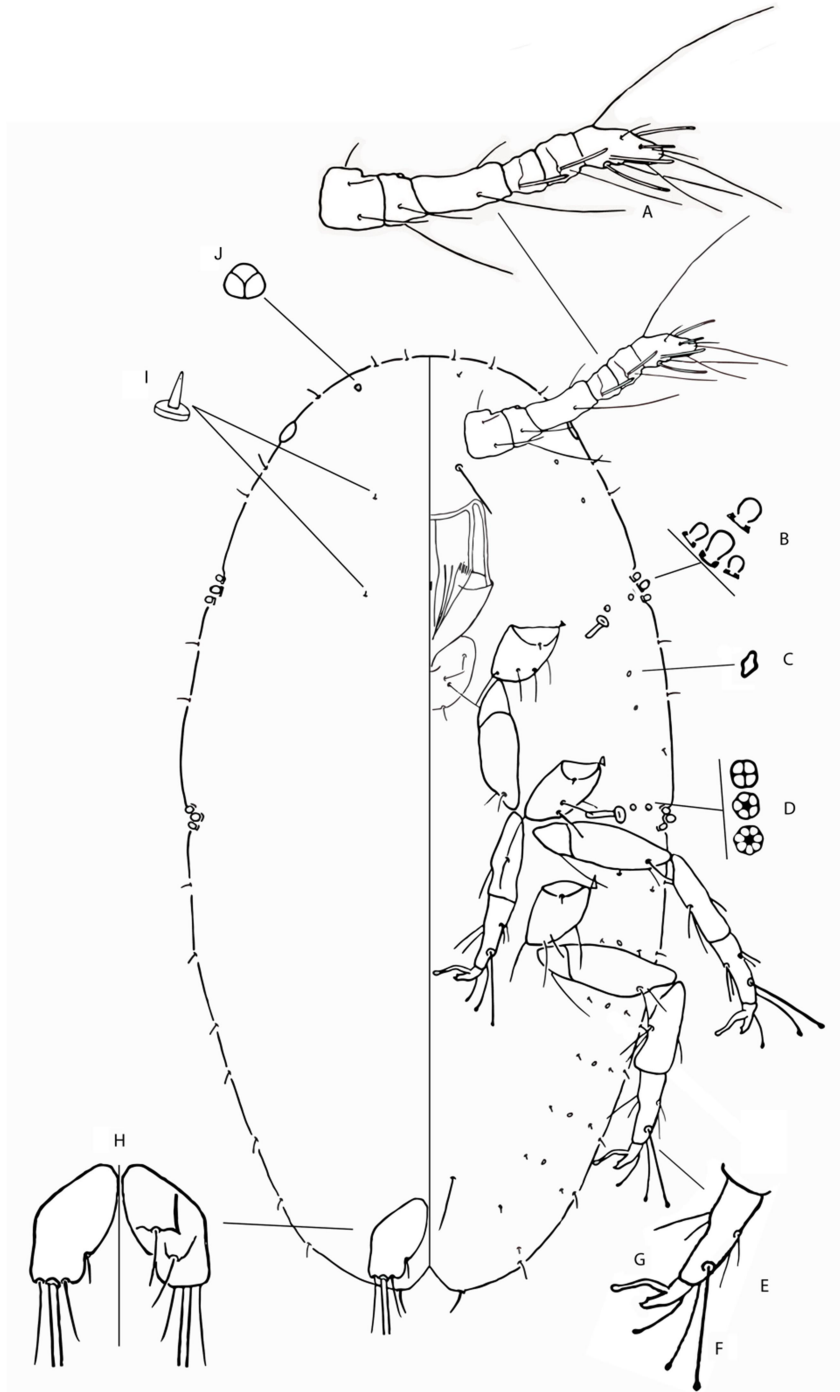


Figure 2. *Ceroplastes glomeratus* Peronti 2008. First-instar nymph, where: A= antenna; B= stigmatic setae; C= ventral microducts; D= spiracular disc-pores; E= tarsal segment; F= tarsal digitules; G= claw digitules; H= anal plates, dorsal and ventral aspect; I= dorsal seta; J= dorsal pore.

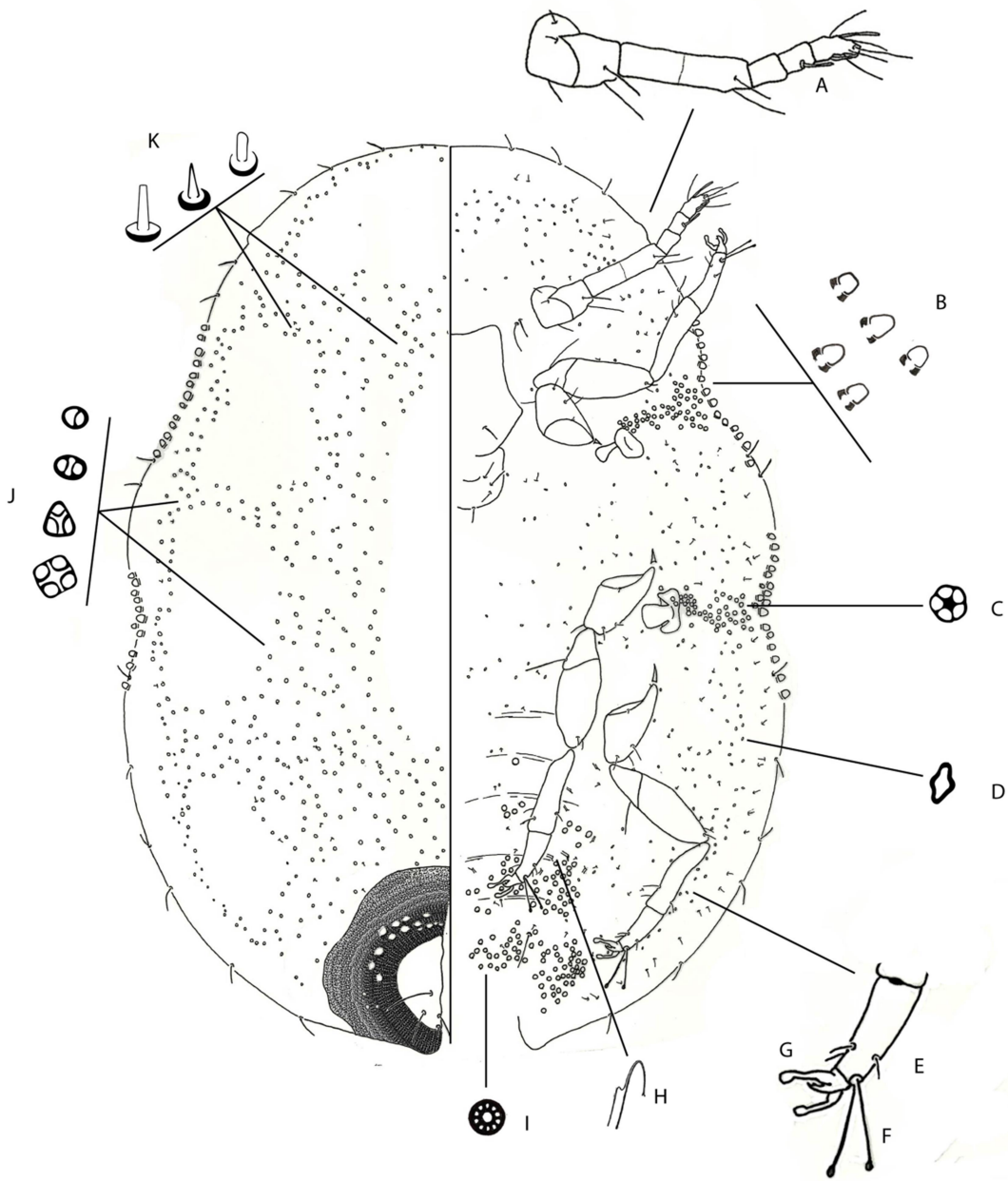


Figure 3. *Ceroplastes glomeratus* Peronti 2008. Adult female (isolated form), where: A= antenna; B= stigmatic setae; C= spiracular disc-pores; D= ventral microducts; E= tarsal segment; F= tarsal digitules; G= claw digitules; H= ventral tubular ducts; I= pregenital disc pores; J= dorsal pores; k= dorsal setae.

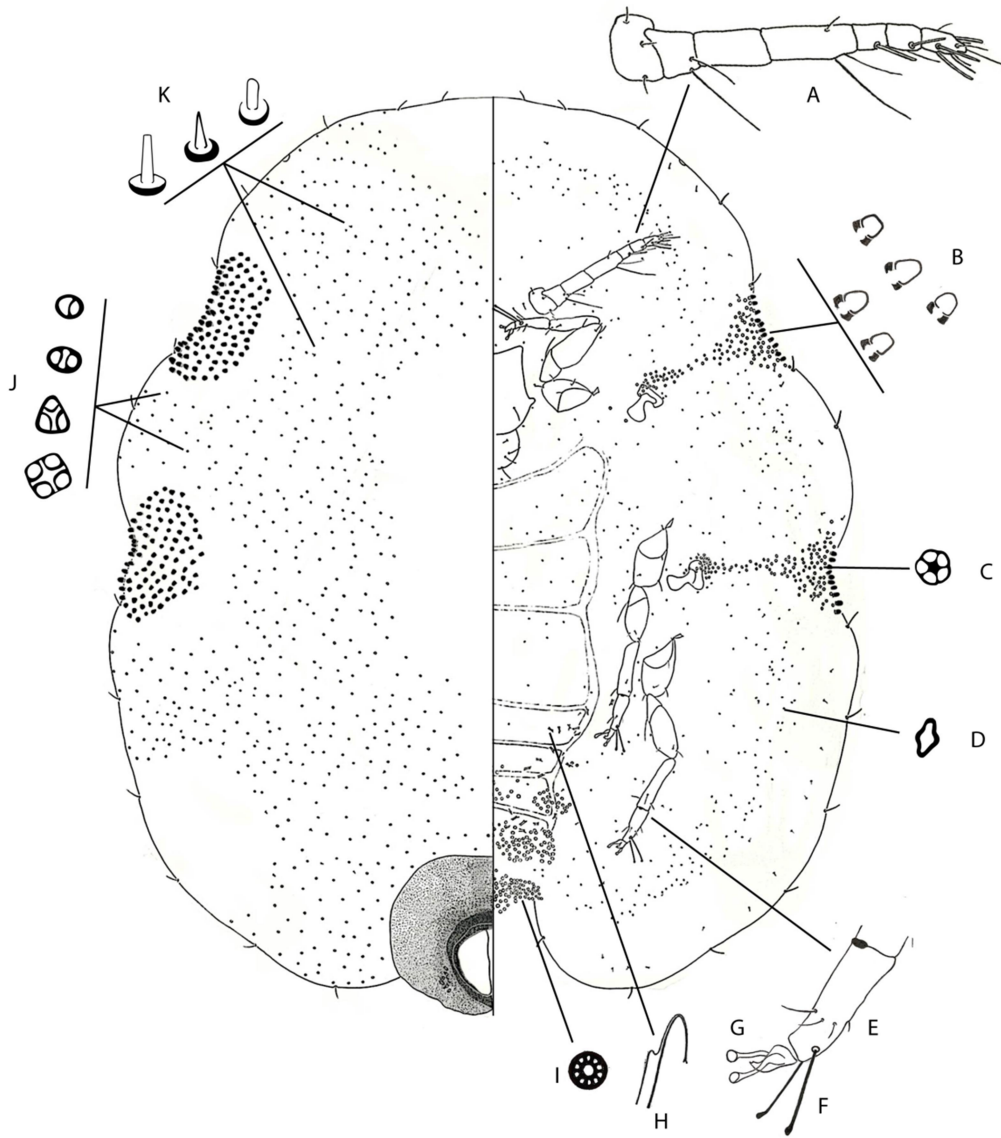


Figure 4. *Ceroplastes glomeratus* Peronti 2008. Young adult female (agglomerated form), where: A= antenna; B= stigmatic setae; C= spiracular disc-pores; D= ventral microducts; E= tarsal segment; F= tarsal digitules; G= claw digitules; H= ventral tubular ducts; I= pregenital disc pores; J= dorsal pores; k= dorsal setae.

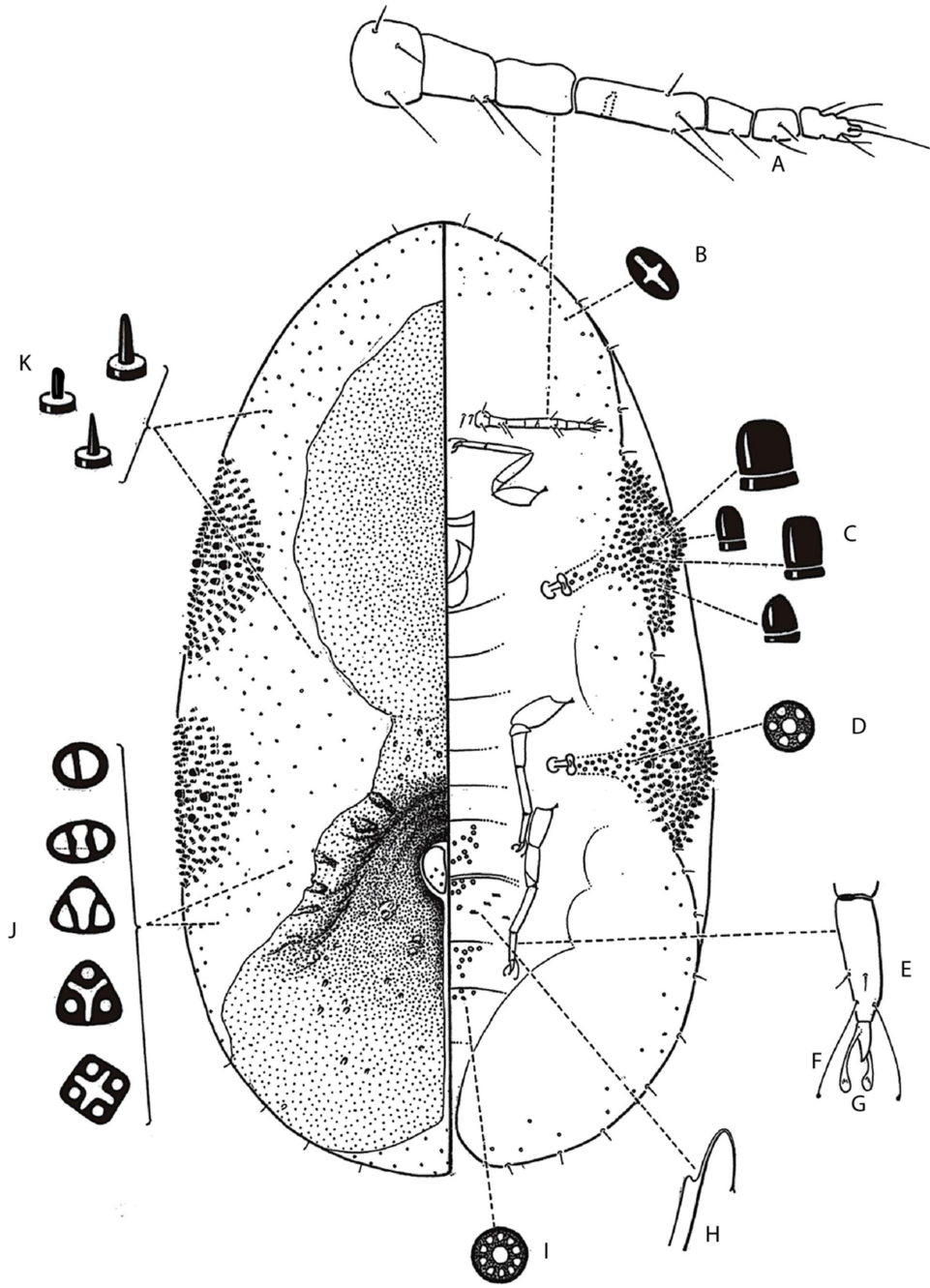


Figure 5. *Ceroplastes glomeratus* Peronti 2008. Modified after Peronti *et al.* (2008). Old adult female (agglomerated form), where: A= antenna; B= ventral microducts; C= stigmatic setae; D= spiracular disc-pores; E= tarsal segment; F= tarsal digitules; G= claw digitules; H= ventral tubular ducts; I= pregenital disc pores; J= dorsal pores; k= dorsal setae.

**Capítulo III – Análise filogenética da subfamília Ceroplastinae,
baseada em segmentos de DNA mitocondrial e nuclear[‡]**

*“A classificação por descendência não pode ser inventada
por biólogos, ela pode apenas ser descoberta”*
Theodosius Dobzansky

[‡]Formatado nas normas da revista Molecular Ecology

**Análise filogenética da subfamília Ceroplastinae, baseada em segmentos de DNA
mitocondrial e nuclear**

KCC Rosa¹, ALBG Peronti², CR Sousa-Silva³

¹Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, UFSCar, CP 676, 13565-905, São Carlos-SP, Brasil, e-mail: keilacoelho@yahoo.com.br

²Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n Jaboticabal-SP, Brasil, 14884-900, e-mail: anaperonti@gmail.com

³Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, UFSCar, CP 676, 13565-905, São Carlos-SP, Brasil, e-mail: dcrs@ufscar.br

Palavras-chave: cochonilhas cerosas, *Ceroplastes*, 28S, COI.

Autor correspondente: Keila de Cássia Coelho Rosa, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis s/n, km 235, CP 676, 13565-905, São Carlos-SP, Brasil; número de fax: 55 (16) 3351-8315; e-mail: keilacoelho@yahoo.com.br

1 **Resumo.** Ceroplastinae (Coccidae) engloba as cochonilhas que produzem uma espessa
2 carapaça de cera que recobre a superfície dorsal da fêmea adulta. Apesar de ser considerado
3 um grupo monofilético, as relações evolutivas entre as espécies dessa subfamília ainda são
4 controversas. Este estudo discute as relações filogenéticas, com base nas análises Bayesiana e
5 de máxima verossimilhança, dos dados agrupados de 493 pares de bases do gene mitocondrial
6 citocromo oxidase subunidade I (COI) e 311 pares de bases do fragmento D2 do gene nuclear
7 28S de 24 espécies de Ceroplastinae, juntamente com cinco espécies escolhidas como grupo
8 externo. Os resultados obtidos foram comparados com os agrupamentos formados a partir de
9 observações dos caracteres morfológicos da fêmea adulta e padrão da cera secretada pelos
10 imaturos. As espécies de Ceroplastinae amostradas formaram um grupo monofilético
11 subdividido em três grupos menores com possíveis origens nas regiões Paleártica/Oriental,
12 Afrotropical e Neotropical.

13 **Palavras-chave:** cochonilha cerosa, *Ceroplastes*, 28S, COI

14 **Abstract** – Ceroplastinae (Coccidae) includes the scale insects that produce a thick waxy test
15 that cover the whole of the dorsum of the adult female. Although considered a monophyletic
16 group, the evolutionary relationships between species this subfamily are still controversial.
17 This study discusses the phylogenetic relationships based on Bayesian and maximum
18 likelihood analysis of grouped data from 493 base pairs of the mitochondrial gene cytochrome
19 oxidase subunit I (COI) and 311 base pairs of D2 fragment of the nuclear gene 28S of 24
20 Ceroplastinae species, together with five species as outgroups. The results were compared
21 with the groups formed from observations of morphological characteristics of adult female
22 and pattern of wax secreted by immature. The Ceroplastinae species formed a monophyletic
23 group subdivided into three smaller groups with possible origins in regions
24 Palearctic/Oriental, Afrotropical and Neotropical.

25 **Key-words:** wax scale, *Ceroplastes*, 28S, COI

26 **Introdução**

27 Ceroplastinae é a segunda subfamília mais especiosa de Coccidae, com 155 espécies
28 descritas em todo o mundo (García *et al.* 2016). O nome comum, cochonilha cerosa, deriva da
29 secreção de espessa camada de cera que recobre a região dorsal das fêmeas adultas.

30 Assim como todas as cochonilhas, os Ceroplastinae são insetos pequenos, sugadores
31 de seiva, com muitas espécies pragas de plantas frutíferas e ornamentais (Peronti *et al.* 2008).

32 Essa subfamília tem ampla distribuição com registros para quase todas as regiões
33 zoogeográficas, entretanto, o maior número de espécies ocorre nas regiões Neotropical e
34 Afrotropical, com aproximadamente 77 e 58 espécies, respectivamente (García *et al.* 2016).

35 Atualmente, todas as espécies de Ceroplastinae estão distribuídas em apenas dois
36 gêneros: *Ceroplastes* Gray, abrigando 145 espécies, e *Waxiella* De Lotto, com 10 espécies
37 restritas à região Afrotropical (Hodgson & Peronti 2012; García *et al.* 2016).

38 O “status” da maioria dos gêneros desta subfamília é controverso. Desde o
39 estabelecimento do gênero *Ceroplastes* por Gray em 1828, outros nove gêneros foram
40 propostos para esta subfamília: *Columnea* Targioni Tozzetti, *Vinsonia* Signoret, *Gascardia*
41 Targioni Tozzetti, *Ceroplastidia* Cockerell, *Ceroplastina* Cockerell, *Baccacoccus* Brain,
42 *Cerostegia* De Lotto, *Waxiella* e *Paracerostegia* Tang. *Columnea*, *Ceroplastina* e
43 *Baccacoccus* foram reconhecidos como sinônimos de *Ceroplastes* pela maioria dos autores
44 (De Lotto 1965; Gimpel *et al.* 1974; Ben-Dov 1993), restando dúvidas em relação aos outros
45 gêneros.

46 Entretanto, Qin & Gullan (1995) fizeram uma análise cladística para esta subfamília
47 utilizando caracteres das fêmeas adultas de 83 espécies, representantes dos sete gêneros ainda
48 existentes, e demonstraram que todas as espécies de cochonilhas cerosas formavam um grupo
49 monofilético, com isso, todos os gêneros testados deveriam ser tratados como sinônimos de
50 *Ceroplastes*.

51 Peronti *et al.* (2008) revisando as espécies de Ceroplastinae do estado de São Paulo,
52 Brasil também incluíram todas as espécies estudadas no gênero *Ceroplastes*. Além disso,
53 esses autores observaram que as espécies estudadas poderiam ser agrupadas principalmente
54 através de diferenças na estrutura, frequência e distribuição dos poros dorsais secretores de
55 cera da fêmea adulta. Da mesma forma, Hodgson & Peronti (2012) revisando os
56 Ceroplastinae da região Afrotropical, observaram a formação de 19 grupos distintos, além de
57 reconhecerem *Waxiella* como um gênero válido. Outros grupos também foram observados e
58 caracterizados no Brasil, por Rosa *et al.* (2016), que estudaram dez espécies distribuídas no
59 Brasil, principalmente no estado de São Paulo, sendo sete endêmicas para a região
60 Neotropical. Esses autores dividiram as espécies estudadas em três grupos diferentes,
61 levando-se em consideração o padrão e tipo de cera secretada pelas ninfas de primeiro instar.
62 Eles observaram que todas as ninfas produzem uma carapaça de cera vítrea recobrando o
63 corpo da ninfa. O primeiro grupo (Grupo I), produz também filamentos submarginais e
64 dorsais de cera seca; o segundo grupo (Grupo II) não produz qualquer tipo de filamento ou
65 expansão de cera; e o terceiro grupo (Grupo III), possui características intermediárias aos dois
66 grupos anteriores, com filamentos de cera seca ausentes, mas com prolongamentos da cera
67 vítrea com formato e localização semelhantes aos filamentos de cera seca presentes no Grupo
68 I (Fig. 1).

69 Para tentar elucidar as relações entre as espécies de cochonilhas cerosas, Hodgson &
70 Peronti (2012) sugeriram a utilização de métodos moleculares. Esta ferramenta tem sido
71 eficaz para resolver as relações de parentesco entre famílias de coccóideos ou gêneros e
72 espécies de diferentes famílias (Cook *et al.* 2002; Downie & Gullan 2004; Morse & Normark
73 2006; Gullan *et al.* 2010).

74 A filogenia de um grupo é a base para qualquer estudo que vise entender sua
75 distribuição geográfica, suas relações com as plantas hospedeiras e com seus inimigos
76 naturais, e as técnicas moleculares podem auxiliar na compreensão das relações entre as
77 espécies. O objetivo deste trabalho é reconstruir uma pequena parte da história evolutiva da
78 subfamília Ceroplastinae utilizando sequências de DNA de genes nucleares e mitocondriais,
79 testando, principalmente, os agrupamentos propostos por Rosa *et al.* (2016) para espécies que
80 ocorrem no estado de São Paulo.

81 **Materiais e métodos**

82 **Extração, PCR e sequenciamento**

83 Para a extração do DNA foram utilizados dois espécimes de cada amostra (Tabela 1).
84 O processo seguiu o método proposto por de Gilbert *et al.* (2007) com algumas modificações
85 realizadas por Dossi *et al.* (2014). O exoesqueleto de cada indivíduo que teve seu DNA
86 extraído foi posteriormente montado em lâmina permanente, seguindo a metodologia de
87 Granara de Willink (1989), para permitir a identificação e fornecer espécimes-*voucher*.

88 Os *vouchers* foram identificados utilizando as chaves de identificação de Peronti *et al.*
89 (2008) e Hodgson & Peronti (2012) e, estão depositados na Coleção Entomológica do
90 Laboratório de Entomologia Econômica do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva
91 da Universidade Federal de São Carlos.

92 Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram gerados para o gene
93 mitocondrial, citocromo oxidase I (COI) e para o fragmento da região D2 do gene da grande
94 subunidade (28S) do DNA ribossomal. Os “primers” utilizados para amplificação e
95 sequenciamento foram: C1-1554F (5'-CAGGAATAATAGGAACATCAATAAG-3') e C1-
96 2342R (5'- ATCAATGTCTAATCCGATAGTAAATA-3') (Deng *et al.* 2012) para COI; D2-
97 3566F (5'TGCAGCTCTAAGTTGGTGGT-3') e D2-4068R (5'-
98 TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG- 3') (Campbell *et al.* 1993) para o segmento D2 do
99 rDNA (28S). Cada PCR foi processada utilizando 1 µL de DNA total, 5 µL 5x Green
100 Reaction Buffer, 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM de cada “primer”, 1 unidade de *Taq*-
101 DNA polimerase, para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação para COI e
102 D2 (28S) foram: uma fase inicial de 3 min a 95 °C, seguida por 35 ciclos de 30s a 94 °C, 50s a
103 52 °C e 1 min a 72 °C, seguidos de um turno final de extensão de 10 min a 72 °C. Para
104 visualização dos “amplicons” foi utilizada eletroforese em gel, com gel de agarose 1%, TAE
105 “buffer” com brometo de etídio e voltagem constante (100V). Os “amplicons” foram
106 observados através de um transiluminador.

107 O material resultante do processo de amplificação foi purificado seguindo o método de
108 precipitação com etanol a 80% (Davis *et al.* 1994) para os fragmentos de COI e utilizando o
109 kit ExoSAP (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante, para o fragmento D2 da
110 estrutura secundária 28S do rDNA. Todas as amostras foram sequenciadas bidirecionalmente
111 pelo “Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP)” ([http:// genoma.ib.usp.br/](http://genoma.ib.usp.br/)).

112 **Análises das sequências**

113 As sequências de 28 amostras referentes a 19 espécies de Ceroplastinae (com três
114 dessas espécies sendo representadas por mais de uma amostra de coleta) foram editadas
115 utilizando o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

116 Sequências de outras espécies de *Ceroplastes* como, *C. ceriferus* (Fabricius), *C.*
117 *floridensis* Comstock, *C. japonicus* Green, *C. kunmingensis* (Tang & Xie), *C. pseudoceriferus*
118 Green, *C. rubens* Maskell, *C. rusci* (Linnaeus), *C. stellifer* (Westwood), bem como dos
119 coccídeos incluídos como grupo externo, *Coccus formicarii* (Green), *Coccus longulus*
120 (Douglas), *Didesmococcus koreanus* Borchsenius, *S. coffeae* (Walker) e *Saissetia oleae*
121 (Olivier) foram obtidas do GenBank (ncbi.nlm.nih.gov) e adicionadas às análises. *Ceroplastes*
122 *floridensis* e *C. stellifer* também estão incluídas entre as espécies sequenciadas neste trabalho.
123 Essas, e as demais espécies analisadas no decorrer desse trabalho são indicadas na Tabela 1,
124 juntamente com os números de acesso do GenBank, números das amostras e informações de
125 coleta.

126 Todas as sequências foram alinhadas utilizando Mafft version 7 (Kato & Standley,
127 2013). O alinhamento obtido para o fragmento D2 da subunidade 28S do rDNA foi inserido
128 no programa Gblocks v.0.91b (Castresana 2000, Talavera & Castresana 2007), para remover
129 as regiões com múltiplos *gaps* e de duvidosa homologia.

130 A matriz de distância foi calculada utilizando as sequências obtidas para o fragmento
131 D2 da subunidade 28S do rDNA associada ao fragmento COI, no programa Mega 6.0
132 (Tamura *et al.* 2013) e, aplicando o modelo de distância Kimura 2 Parâmetros (K2P) (Kimura
133 1980).

134 **Reconstrução filogenética**

135 Foi executada uma análise particionada de inferência Bayesiana utilizando o Método
136 de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) com o programa MrBayes versão 3.1.2
137 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Inicialmente, para esta análise, foi utilizado PartitionFinder
138 v.1.1.0 (Lanfear *et al.* 2012) para escolher a melhor maneira de partição dos dados e o modelo
139 de substituição mais adequado para cada partição. Assim, foram aplicados os modelos de
140 substituição nucleotídica K81uf+G, TrN+I+G, HKY+I+G para a 1^a, 2^a e 3^a posições do
141 códon, respectivamente, do gene mitocondrial (COI) e o modelo TrN+I+G para todo
142 fragmento D2 (28S). A árvore de consenso baseada na inferência Bayesiana foi gerada após
143 20.000.000 de gerações.

144 Para a reconstrução filogenética utilizando o método probabilístico de Máxima
145 Verossimilhança (ML) foi utilizada a mesma partição dos dados indicada pelo PartitionFinder
146 v.1.1.0 (Lanfear *et al.* 2012), como descrito anteriormente, mas o modelo de evolução
147 aplicado foi o GTR+CAT no programa RaxML v. 8.1.24 (Stamatakis 2006), utilizando 1000
148 réplicas na análise de *bootstrap*. A árvore de consenso foi visualizada e formatada utilizando
149 o software FigTree v1.4.2 (Rambaut 2008).

150 **Resultados e discussão**

151 O alinhamento final das sequências resultou em 804 caracteres, dos quais 493 foram
152 dos dados do COI e 311 foram do 28S, sendo que a quantidade de sítios informativos foi de
153 144 e 84, respectivamente.

154 Os valores de divergência apresentados entre os exemplares analisados são mostrados
155 na Figura 2. Entre as espécies de Ceroplastinae a divergência variou de 3,6%, entre *C.*
156 *ceriferus* e *C. pseudoceriferus*, a 18,4%, entre *C. eugeniae* Hall e *Ceroplastes* sp. 2. A menor
157 divergência entre os Ceroplastinae e as espécies do grupo externo utilizado foi de apenas

158 13,3% e ocorreu entre *C. eugeniae* e *Coccus longulus*, enquanto que a maior divergência foi
159 de 23,2% entre *C. formicarius* Hempel e *Didesmococcus koreanus*.

160 As espécies *C. floridensis* e *C. stellifer* coletados no Brasil, que tiveram suas
161 sequências comparadas com exemplares das mesmas espécies provenientes da China (Deng *et*
162 *al.* 2012; Wang *et al.* 2015), apresentaram uma divergência intra-específica de 0,4% e 1,5%,
163 respectivamente. Curiosamente, a divergência apresentada por *C. eugeniae* Hall (coletado no
164 Brasil) e *C. rusci*, coletado na China e sequenciado por Wang *et al.* (2015), mostraram uma
165 divergência de apenas 0,9%, indicando que são a mesma espécie (Fig. 2). De acordo com
166 Hodgson & Peronti (2012), as diferenças entre *C. rusci*, *C. eucleae* Brain, *C. eugeniae*, *C.*
167 *tenuitectus* Green e *C. toddaliae* Hall são muito sutis, mas, de acordo com os autores, a
168 espécie *C. rusci sensu stricto* estaria restrita à região Mediterrânea e norte da África, portanto,
169 para confirmação da identificação, seria necessário realizar o sequenciamento genético de
170 espécimes de *C. rusci* provenientes daquela região.

171 A árvore de máxima verossimilhança (ML) e de inferência Bayesiana, com seus
172 respectivos valores de *bootstrap* e probabilidade (representados em cada nó), que foram
173 reconstruídas a partir da análise dos dados combinados, estão representadas nas Figuras 3 e 4,
174 respectivamente. As duas árvores demonstraram que as espécies de Ceroplastinae formam um
175 grupo monofilético, como indicado pelo clado **a**. A monofilia para essa subfamília já havia
176 sido demonstrada por Qin & Gullan (1995) através de análise cladística realizada com base
177 nos caracteres morfológicos de fêmeas adultas de 83 espécies dessa subfamília.

178 O clado **a** agrupa o clado **b**, constituído pelas espécies *C. kunmingensis*, *C. japonicus*,
179 *C. floridensis*, *C. ceriferus*, *C. pseudoceriferus* e *C. rubens*, e o clado **c**, com as demais
180 espécies: *C. eugeniae/C. rusci*, *C. stellifer*, *C. lucidus* Hempel, *C. quadratus* Green, *C.*

181 *janeirensis* Gray, *C. formicarius*, *C. cassiae* (Chavannes), *C. glomeratus* Peronti, *C. iheringi*
182 Cockerell, *C. mosquera* (Mosquera), *C. sinensis* Del Guercio, *Ceroplastes* sp. 1, *C.*
183 *cirripediformis* Comstock, *C. flosculoides* Matile-Ferrero, *Ceroplastes* sp. 2, *Ceroplastes* sp.
184 3, *Ceroplastes* sp. 4, *C. diospyros* Hempel.

185 Dentre as seis espécies que constituem o clado **b**, foi possível observar dois
186 agrupamentos que incluem espécies mais amplamente distribuídas nas regiões Australiana,
187 Oriental e Paleártica: *Ceroplastes kunmingensis*, *C. japonicus* e *C. floridensis* (representadas
188 no clado **e**); e *C. ceriferus* e *C. pseudoceriferus* (representadas no clado **f**). Associado a esses
189 dois ramos, *C. rubens* aparece como grupo irmão de ambos. Hodgson & Peronti (2012), com
190 base nos estudos dos caracteres morfológicos das fêmeas adultas, incluíram as espécies aqui
191 subdivididas nos clados “**e**” e “**f**” em grupos denominados “*C. floridensis*” e “*C. ceriferus*”,
192 respectivamente. *Ceroplastes rubens* foi incluída no grupo “*C. rubens*”, por esses mesmos
193 autores, juntamente com *C. reunionensis* Ben-Dov & Matile Ferrero. As espécies dos grupos
194 “*C. floridensis*” e “*C. ceriferus*” se assemelham morfológicamente por possuírem a área clara
195 médio-dorsal pequena ou ausente, fazendo com que o núcleo dorsal seja deslocado para trás
196 ou lateralmente, devido à produção de cera extra nesta região. Entretanto, os representantes do
197 grupo “*C. floridensis*” diferenciam-se por apresentar 7 áreas claras na região dorsal do corpo
198 (11 no grupo “*C. ceriferus*”) e uma banda de dutos tubulares na região submarginal ventral,
199 ausentes no grupo “*C. ceriferus*”. *Ceroplastes rubens* difere dos grupos anteriores
200 principalmente por apresentar oito áreas claras, incluindo a média-dorsal, que nessa espécie,
201 assim como na maioria dos Ceroplastinae é bem desenvolvida.

202 De acordo com os agrupamentos propostos por Rosa *et al.* (2016), com base no
203 padrão e tipo de cera produzida pelas ninfas de primeiro instar, *C. floridensis* forma um
204 grupo, juntamente com *C. cirripediformis*, *C. formicarius*, *C. grandis* Hempel e *C. stellifer*, as

205 quais têm ninfas que produzem uma fina camada de cera vítrea cobrindo o dorso, mas que
206 também secretam filamentos centrais e submarginais de cera seca, denominado pelos autores
207 como “Grupo I” (exemplo na Figura 4A). Esse tipo de cera foi também observado em *C.*
208 *rubens* (Kuwana 1923), *C. pseudoceriferus* (Kawai and Tamaki 1967), *C. ceriferus* e *C.*
209 *japonicus* (Xie & Xue 2005). Apesar do padrão de cera das ninfas de *C. kunmingensis* ser
210 desconhecido, esta espécie provavelmente pertence a esse grupo I, pois microscopicamente se
211 aproxima muito a *C. floridensis*.

212 O clado **c** é subdividido nos clados **g** e **h**. No clado **g**, observa-se que *C.*
213 *eugeniae/rusci* está mais próxima à *C. stellifer* do que das demais espécies. Conforme
214 Hodgson & Peronti (2012), tanto *C. rusci* quanto *C. eugeniae*, fazem parte do grupo “*C.*
215 *rusci*”, o qual é um grande grupo Afrotropical constituído por 14 espécies que se caracterizam
216 principalmente por produzirem cera que formam 9 placas (sendo 7 na maioria dos
217 Ceroplastinae) e microdutos loculados do tipo-*rusci*, caracteres exclusivos do grupo; *C.*
218 *stellifer*, forma sozinha o grupo “*C. stellifer*”. Quanto aos agrupamentos propostos por Rosa *et*
219 *al.*(2016), *C. rusci* e *C. stellifer* possuem ninfas produtoras de filamentos submarginais e
220 dorsais de cera seca, também fazem parte do Grupo I (Silvestri & Martelli 1908; Rosa *et al.*
221 2016), assim como as demais espécies acima mencionadas.

222 O clado **h** inclui as espécies cuja maioria tem distribuição restrita à América do Sul
223 (Tabela 1). Neste clado, pequenas diferenças foram observadas entre as árvores geradas pela
224 análise de máxima verossimilhança (ML) e a de inferência Bayesiana. A análise de ML
225 agrupou *C. janeirensis* com *C. cassiae* e estas com *C. quadratus* e *C. lucidus*, formando um
226 grupo irmão de *C. formicarius* (clado **i**, Fig 2). A inferência Bayesiana também agrupou *C.*
227 *quadratus* com *C. lucidus*, mas neste caso, *C. janeirensis* ficou mais próxima de *C.*
228 *formicarius* (clado **i**, Fig 3) do que de *C. cassiae*, e esta, ocupou posição de grupo irmão das

229 outras espécies (clado **j**, Fig 3). Os demais agrupamentos foram semelhantes nas duas árvores.
230 *Ceroplastes sinensis* mais próxima de *C. mosquerei* e estas junto com *Ceroplastes* sp. 1
231 (visualizado no clado **p**), formam grupo irmão de *C. iheringi* (clado **m**). Enquanto que *C.*
232 *cirripediformis* forma grupo irmão de *C. flosculoides*, *Ceroplastes* sp. 2, *Ceroplastes* sp. 3,
233 *Ceroplastes* sp. 4 e *C. diospyros* (clado **n**). Os resultados indicaram *Ceroplastes glomeratus*
234 como grupo irmão de todas as espécies do clado **l**, o qual inclui os clados **m** e **n**.

235 Entre as duas árvores obtidas (Figs 2 e 3), aquela relativa à análise de máxima
236 verossimilhança foi a que mais se aproximou dos agrupamentos propostos por Rosa *et al.*
237 (2016), com base no tipo de cera produzida pelas ninfas de primeiro instar. Esses autores
238 agruparam *C. janeirensis*, cuja morfologia dos imaturos foi estudada por Rosa, *et al.* (2011),
239 com *C. lucidus* e *C. formosus* Hempel no Grupo II. Eles observaram que essas espécies
240 produzem um padrão de cera exclusivo, conhecido apenas para algumas espécies da região
241 Neotropical. As ninfas dessas espécies não produzem qualquer prolongamento ou filamento
242 de cera, sendo apenas cobertas por uma carapaça de cera vítrea (exemplo na Figura 1B).
243 Embora a morfologia das ninfas de *C. quadratus* e *C. cassiae* não tenha sido descrita, o
244 padrão de cera secretado por essas espécies deve ter o mesmo padrão das espécies acima
245 mencionadas. Essa interpretação da ninfa através da forma adulta é possível, pois, de acordo
246 com as observações do desenvolvimento da cera, por Rosa *et al.* (2016), a carapaça vítrea
247 produzida pelas ninfas de primeiro e segundo instar, forma o núcleo médio-dorsal das ninfas
248 de terceiro instar e dos adultos, enquanto que os núcleos laterais não são preenchidos por cera
249 (exemplo na Figura 5B). Peronti *et al.* (2008) também agruparam *C. janeirensis* com *C.*
250 *cassiae* e *C. quadratus* com *C. lucidus*, baseados na morfologia da fêmea adulta. *Ceroplastes*
251 *formicarius*, também estudada por Rosa *et al.* (2016) foi incluída no Grupo I, entretanto, os

252 autores observaram que essa espécie difere das outras deste grupo por secretar cera vítrea
253 mais evidente e os filamentos de cera seca menos desenvolvidos do que nas demais espécies.

254 *Ceroplastes sinensis*, *C. mosquerasi* e *Ceroplastes* sp. 1, reunidas no clado **p**, também
255 fazem parte do Grupo I. Embora não se conhece as ninfas dessas espécies, os filamentos de
256 cera seca no interior dos núcleos dorsal e laterais dos adultos são evidências da presença de
257 tais filamentos nos imaturos (exemplo na figura 5A). *Ceroplastes iheringi*, que aparece como
258 grupo irmão dessas espécies, pertence ao Grupo III ou intermediário, como classificado por
259 Rosa *et al.* (2016), sendo as ninfas cobertas com cera vítrea e prolongamentos submarginais
260 do mesmo tipo de cera (exemplo na figura 1C). O adulto desse grupo possui os núcleos dorsal
261 e laterais preenchidos com a cera produzida pelas primeiras ninfas (exemplo na figura 5C).
262 *Ceroplastes flosculoides*, *Ceroplastes* sp. 2, *Ceroplastes* sp. 3, *Ceroplastes* sp. 4 e *C.*
263 *diospyros* (clado **o**) também apresentam as características do Grupo III, mas *C.*
264 *cirripediformis* que aparece como grupo irmão dessas espécies pertence ao Grupo I.

265 *Ceroplastes glomeratus*, que apareceu isolada, formando um grupo irmão de todo
266 clado **I**, também pertence ao grupo III, pois o adulto apresenta os núcleos dorsal e laterais
267 preenchidos pela carapaça vítrea e prolongamentos submarginais, como pode ser observado
268 na Figura 5C.

269 Dentre os agrupamentos propostos por Rosa *et al.* (2016), provavelmente o Grupo II,
270 seja o único monofilético, considerando-se somente a análise de máxima verossimilhança.
271 Rosa *et al.* (2016) sugerem que o Grupo II, com espécies restritas à região Neotropical, seja
272 mais recente do que os Grupos I e III, que inclui representantes de outras regiões geográficas.

273 A distribuição das espécies por regiões de origem foram evidenciadas por ambas
274 análises, ML e Bayesiana. As espécies agrupadas no clado **b**, de origem controversa, é

275 constituído por espécies polípagas e amplamente distribuídas por quase todo o globo, como *C.*
276 *floridensis*, *C. ceriferus* e *C. rubens*. Comstock (1881) e Gimpel *et al.* (1974) relacionaram a
277 região Neártica como sendo o centro de origem de *C. floridensis*, mas Cockerell (1895) e
278 Tang (1991) sugeriram que essa espécie deve ter se originado na região Oriental. Quanto a *C.*
279 *ceriferus*, Gimpel *et al.* (1974) consideraram ser nativa da Ásia, enquanto que Qin *et al.*
280 (1994) hipotetizaram que essa espécie deveria ter se originado na região Neotropical.
281 *Ceroplastes rubens*, de acordo com Craw (1896), parece ser da região Oriental, mas Qin *et al.*
282 (1994) acreditam que ela deve ter se originado na região Afrotropical. Entretanto devido a
283 proximidade apresentada por essas espécies em nível molecular, bem como dos caracteres
284 microscópicos acima mencionados, provavelmente tenham se originado na mesma região,
285 sendo aqui sugerida a Oriental, pois algumas espécies do grupo como *C. pseudoceriferus* e *C.*
286 *kunmingensis* tem distribuição restrita à região Oriental e *C. japonicus* nas regiões Oriental e
287 Paleártica.

288 *Ceroplastes eugeniae /rusci*, de acordo com Hodgson & Peronti (2012), é de origem
289 Afrotropical e *C. stellifer* provavelmente tenha mesma origem devido a sua proximidade com
290 essa espécie, fortemente suportada na análise molecular (Figs 2 e 3).

291 O clado **h** é constituído por espécies Neotropicais, sendo 14 restritas a essa região.
292 *Ceroplastes cirripediformis* e *C. sinensis*, embora amplamente distribuídas, já haviam sido
293 mencionadas como sendo nativas dessa região por Gimpel *et al.* (1974) e Qin & Gullan
294 (1995), respectivamente.

295 Visto que as análises moleculares mostraram-se eficientes para testar agrupamentos
296 previamente propostos para os Ceroplastinae, os estudos deveriam ser ampliados utilizando-se

297 dados moleculares de um número maior de espécies, com representantes de todas as regiões
298 zoogeográficas, além de acrescentar outros genes às análises.

299 **Agradecimentos**

300 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio
301 financeiro.

302 **Referências Bibliográficas**

303 Ben-Dov Y (1993) *A Systematic Catalogue of the Soft Scale Insects of the World*
304 *(Homoptera: Coccoidea: Coccidae) with data on geographical distribution, host plants,*
305 *biology and economic importance.* Sandhill Crane Press, Inc., Gainesville, Florida, USA,
306 Flora & Fauna Handbook 9, 563p.

307 Campbell BC, Steffen-Campbell JD, & Werren JH (1993). Phylogeny of the *Nasonia* species
308 complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2)
309 and 28S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology*, **2(4)**, 225–237.

310 Castresana J (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in
311 phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 540–552.

312 Cockerell TDA (1895) Coccidade or scale insects. VI. *Jamaica Botanical Department*
313 *Bulletin* (N.S.), **2**: 5–8.

314 Comstock JH (1881) Report of the entomologist. Part II. Report on scale insects. *United*
315 *States Department of Agriculture, Annual Report of the Commissioner of Agriculture,*
316 **1880**, 276–349.

317 Cook LG, Gullan PJ & Trueman HE (2002) A preliminary phylogeny of the scale insects
318 (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA.
319 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 43–52.

320 Craw A (1896) Injurious insect pests found in trees and plants from foreign countries.
321 *Biennial Report Californian State Commission of Horticulture*, **5**, 33–47.

322 Davis LB, Kuehl WM & Battey JF (1994) *Basic methods in molecular biology*. 2nd Ed.,
323 Appleton and Lange, East Norwalk, CT., 777p.

324 De Lotto, G (1965) On some Coccidae (Homoptera), chiefly from Africa. *Bulletin of the*
325 *British Museum (Natural History), Entomology*, **16**, 177–239.

326 Deng JUN, Yu F, Zhang TX, Hu HY, Zhu CD, Wu SA, & Zhang YZ (2012) DNA barcoding
327 of six Ceroplastes species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. *Molecular*
328 *Ecology Resources*, **12(5)**, 791–796.

329 Dossi FCA, Silva EP & Cônsoli FL (2014) Population dynamics and growth rates of
330 endosymbionts during *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae) ontogeny. *Microbial*
331 *Ecology*, **68**, 881–889.

332 Downie, DA & Gullan PJ (2004) Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea:
333 Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the
334 higher classification. *Systematic Entomology*, **29**, 238–259.

335 García MM, Denno BD, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y & Hardy NB (2016). ScaleNet: A
336 literature-based model of scale insect biology and systematics. Database. doi:
337 10.1093/database/bav118. <http://scalenet.info>. (Acessado em 19 de junho de 2016).

338 Gilbert MTP, Moore W, Melchior L & Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum
339 beetles without conferring external morphological damage. *PLoS One*, **2 (3)**, e272.

340 Gimpel JWF; Miller DR & Davidson JA (1974) A systematic revision of the wax scale, genus
341 *Ceroplastes*, in the United States (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). *University of*
342 *Maryland Agricultural Experiment Station Miscellaneous Publications*, **841**, 1–85.

343 Granara de Willink MC (1989) *Conociendo nuestra fauna I. Superfamilia Coccoidea*
344 *(Homoptera: Sternorrhyncha)*. Serie Monográfica y Didáctica, nº 6. Facultad de Ciencias
345 Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, 43 pp.

346 Gullan PJ; Kaydan M & Hardy NB (2010). Molecular phylogeny and species recognition in
347 the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic*
348 *Entomology*, **35(2)**, 329–339. Hodgson CJ & Peronti ALBG (2012) A revision of the wax
349 scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Ceroplastinae) of the Afrotropical
350 Region. *Zootaxa*, **3372**, 1–265.

351 Katoh K & Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
352 Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772–
353 780.

354 Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions
355 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**,
356 111–120.

357 Kuwana I (1923) Descriptions and biology of new or little known coccids from Japan.
358 *Bulletin of Department of Agriculture and Commerce, Imperial Plant Quarantine Station*,
359 **3**, 1–67.

360 Kawai, S. & Tamaki, Y. (1967) Morphology of *Ceroplastes pseudoceriferus* Green with
361 special reference to the wax secretion. *Zootaxa* 4136, **2(3)**, 133–146.

362 Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012) PartitionFinder: combined selection of
363 partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology
364 and Evolution*, **29** (6), 1695-1701.

365 Morse GE & Normark BB (2006) A molecular phylogenetic study of armoured scale insects
366 (Hemiptera: Diaspididae). *Systematic Entomology*, **31**, 338–349.

367 Peronti ALBG, Sousa-Silva CR & Granara de Willink MC (2008) Revisão das espécies de
368 Ceroplastinae Atkinson (Hemiptera, Coccoidea, Coccidae) do Estado de São Paulo, Brasil.
369 *Revista Brasileira de Entomologia*, **52**(2), 139–181.

370 Qin TK & Gullan PJ (1995) A cladistics analysis of wax scales (Hemiptera: Coccoidea:
371 Coccidae: Ceroplastinae). *Systematic Entomology*, **20**, 289–308.

372 Qin TK, Gullan PJ, Beattie GAC, Trueman JWH, Cranston PS, Fletcher MJ & Sands DPA
373 (1994) The current distribution and geographical origin of the scale insect pest *Ceroplastes
374 sinensis* (Hemiptera: Coccidae). *Bulletin of Entomological Research*, **84**, 541–549.

375 Rambaut A (2008) Tree Figure Drawing Tool. Version 1.4.2. Institute of Evolutionary
376 Biology, University of Edinburgh. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.

377 Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under
378 mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.

379 Rosa KCC, Peronti ALBG, Hodgson CJ & Sousa-Silva CR (2016) Morphology of the
380 immature female stages and the wax test of ten species of *Ceroplastes* (Hemiptera:
381 Coccoidea: Coccidae: Ceroplastinae) from Brazil. *Zootaxa*, **4136**(2), 247–308.

382 Rosa KCC, Peronti ALBG & Sousa-Silva CR (2011) Description of the immature female
383 stages of *Ceroplastes janeirensis* (Gray) (Hemiptera: Coccidae) with special reference to
384 the development of the wax test. *Zootaxa* **2808**: 18–30.

- 385 Silvestri F & Martelli G (1908) La Cocciniglia del fico (*Ceroplastes rusci* L.). *Bollettino del*
386 *Laboratorio di Zoologia Generale e Agraria*, **2**, 297–358.
- 387 Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses
388 with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22(21)**, 2688–2690.
- 389 Talavera G & Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and
390 ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, **56**,
391 564–577.
- 392 Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A & Kumar S (2013) Mega6: Molecular
393 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30(12)**,
394 2725–2729.
- 395 Tang FT (1991) *The Coccidae of China*. Shanxi United Universities Press, Taiyuan, P. R.
396 China. 377 pp.
- 397 Wang XB, Deng J, Zhang JT, Zhou QS, Zhang YZ & Wu SA (2015) DNA barcoding of
398 common soft scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) in China. *Bulletin of Entomological*
399 *Research*, **105**, 545–554.
- 400 Xie Y & Xue J (2005) Ultra-morphology and chemical composition of waxes secreted by two
401 wax scale insects, *Ceroplastes ceriferus* (Fabricius) and *C. japonicus* Green (Homoptera:
402 Coccidae). *Acta Entomologica Sinica*, **48** (6), 837–848.

Tabela 1. Espécimes de Ceroplastinae e dos taxa de grupo externo, dos quais o DNA foi extraído.

Espécie	Nº da amostra ou nº de acesso no GenBank	Hospedeiro	Procedência	Distribuição geográfica
<i>C. cassiae</i> (Chavannes)	60	<i>Erythroxylum</i> sp. (Erythroxylaceae)	Porto Ferreira, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>C. ceriferus</i> (Fabricius)	JQ795622.1 (COI) JQ795578.1 (28S)		China (Deng <i>et al.</i> 2012)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. cirripediformis</i> Comstock	03	<i>Tabebuia</i> sp. (Bignoniaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical, Oriental, Neártica, Paleártica e Australiana
<i>C. diospyros</i> Hempel	01	<i>Diospyros kaki</i> (Ebenaceae)	Louveira, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>C. eugeniae</i> Hall	18	Annonaceae	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. floridensis</i> Comstock	89	<i>Schefflera arboricola</i> (Araliaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. floridensis</i>	JQ795652.1 (COI) JQ795575.1 (28S)		China (Deng <i>et al.</i> 2012)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. flosculoides</i> Matile-Ferrero	47	Rubiaceae	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil e Peru)
<i>C. flosculoides</i>	54	Rubiaceae	Porto Ferreira, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil e Peru)
<i>C. flosculoides</i>	57	<i>Myrcia lingua</i> (Myrtaceae)	Porto Ferreira, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil e Peru)

<i>C. flosculoides</i>	92	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil e Peru)
<i>C. formicarius</i> Hempel	04	<i>Banisteriopsis Oxyclada</i> (Malpighiaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Argentina e Brasil)
<i>C. glomeratus</i> Peronti	12	<i>Inga</i> sp. (Fabaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>C. iheringi</i> Cockerell	10	<i>Vernonia</i> sp. (Asteraceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>C. janeirensis</i> Gray	53	01 (13/03/2013)	Luís Antonio, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Argentina, Brasil e Colômbia)
<i>C. japonicus</i> Green	JQ795649 .1 (COI) JQ795602.1 (28S)		China (Deng <i>et al.</i> 2012)	Oriental e Paleártica
<i>C. kunmingensis</i> (Tang et Xie)	JQ795701.1 (COI) JQ795590.1 (28S)		China (Deng <i>et al.</i> 2012)	Oriental
<i>C. lucidus</i> Hempel	90	Asteraceae	Tambaú, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Argentina, Brasil e Uruguai)
<i>C. mosquera</i> (Mosquera)	74	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Anacardiaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil e Colômbia)
<i>C. pseudoceriferus</i> Green	JQ795693.1 (COI) JQ795579.1 (28S)		China (Deng <i>et al.</i> 2012)	Oriental
<i>C. quadratus</i> Green	17	<i>Leandra</i> sp. (Melastomataceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>C. rubens</i> Maskell	JQ795663.1 (COI) JQ795606.1 (28S)		China (Deng <i>et al.</i> 2012)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. rusci</i> (Linnaeus)	KP189761.1 (COI) KP189495.1 (28S)		China (Wang <i>et al.</i> 2015)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. sinensis</i> Del Guercio	70	<i>Astronium graveolens</i> (Anacardiaceae)	Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo, Brasil	Neotropical, Oriental, Neártica, Paleártica e Australiana

<i>C. stellifer</i> (Westwood)	87	<i>Schefflera arboricola</i> (Araliaceae)	Santos, São Paulo, Brasil	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>C. stellifer</i>	KP189766.1 (COI) KP189501.1 (28S)		China (Wang <i>et al.</i> 2015)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>Ceroplastes</i> sp.1	05	Meliaceae	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.1	16	Meliaceae	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.1	36	<i>Trichilia</i> sp. (Meliaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.1	94	<i>Miconia</i> sp. (Melastomataceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.2	34	<i>Tabebuia</i> sp. (Bignoniaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.2	45	<i>Myrciaria</i> sp. (Myrtaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.2	50	Myrtaceae	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.2	51	<i>Eugenia</i> sp. (Myrtaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.3	66	<i>Schinus molle</i> (Anacardiaceae)	São Carlos, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Ceroplastes</i> sp.4	106	<i>Schinus molle</i> (Anacardiaceae)	Rio Claro, São Paulo, Brasil	Neotropical (restrita a Brasil)
<i>Coccus formicarii</i> (Green)	JX853903.1 (COI) JX866689.1 (28S)		Taiwan (Lin <i>et al.</i> 2013)	Oriental, Afrotropical, Australiana e Paleártica
<i>Coccus longulus</i> (Douglas)	KP189796.1 (COI) KP189530.1 (28S)		China (Wang <i>et al.</i> 2015)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>Didesmococcus koreanus</i> Borchsenius	KP189908.1 (COI) KP189647.1 (28S)		China (Wang <i>et al.</i> 2015)	Paleártica
<i>S. coffeae</i> (Walker)	KP189788.1 (COI) KP189522.1 (28S)		China (Wang <i>et al.</i> 2015)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica
<i>Saissetia oleae</i> (Olivier)	KP189783.1 (COI) KP189517.1 (28S)		China (Wang <i>et al.</i> 2015)	Neotropical, Oriental, Afrotropical, Neártica, Australiana e Paleártica



Fig. 1 Representantes dos agrupamentos propostos por Rosa *et al.* (2012) para espécies da subfamília Ceroplastinae, baseados no tipo e formato da cera secretada pelas ninfas de primeiro instar. A: Grupo I. *Ceroplastes cirripediformis* Comstock: com filamentos dorsais e submarginais de cera seca; B: Grupo II. *C. lucidus* Hempel: com cera vítrea e não apresenta qualquer filamento ou prolongamento de cera; C: Grupo II. *C. iheringi* Cockerell: com cera vítrea dorsal e prolongamentos submarginais do mesmo tipo de cera (Figura adaptada de Rosa *et al.* 2016).

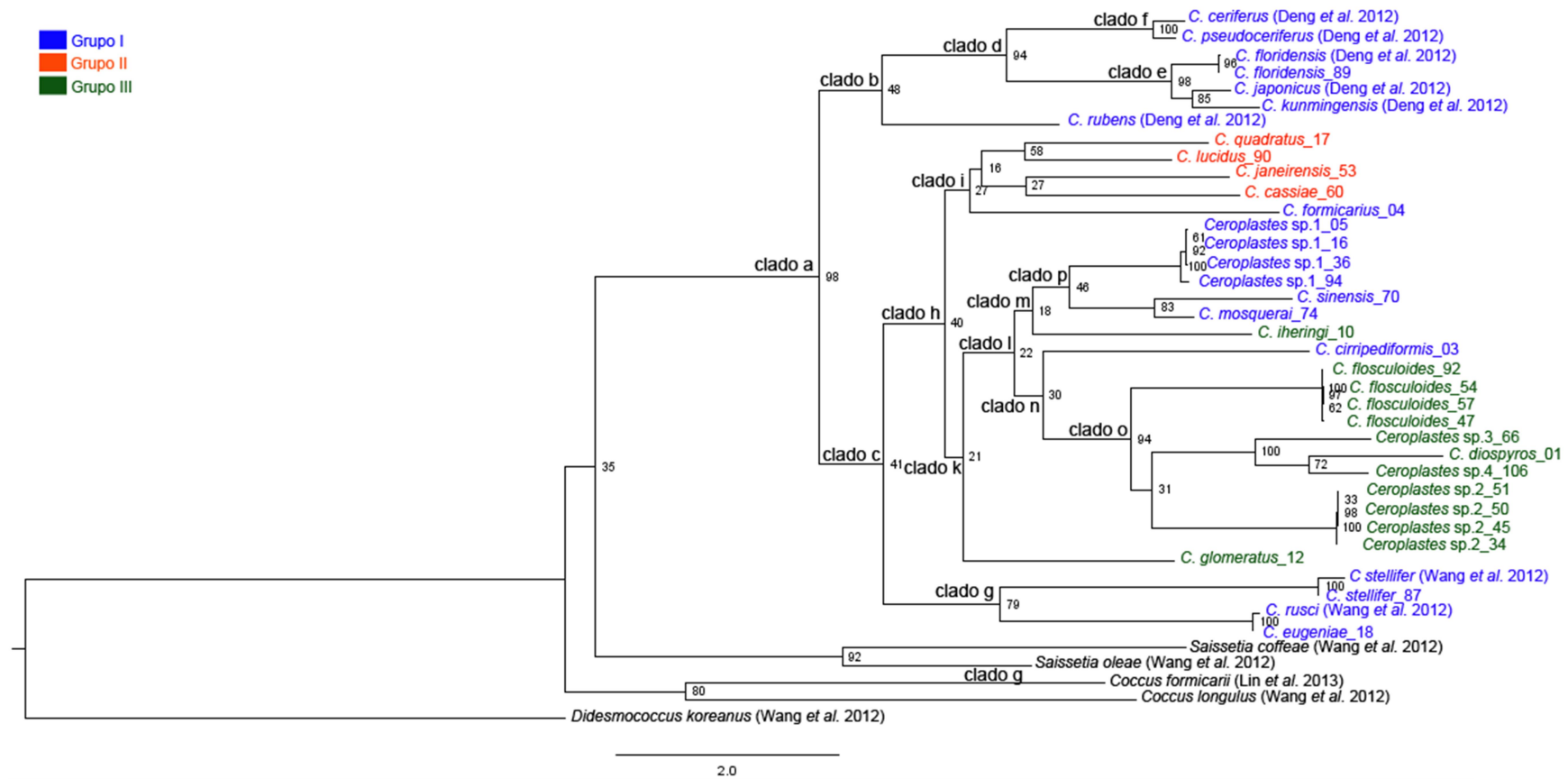


Fig. 3 Árvore filogenética de 24 espécies de Ceroplastinae, baseada na máxima verossimilhança (ML). Os valores de *bootstrap* estão representados ao lado de cada nó. As espécies foram destacadas com cores diferentes, conforme os grupos propostos por Rosa *et al.*(2016).

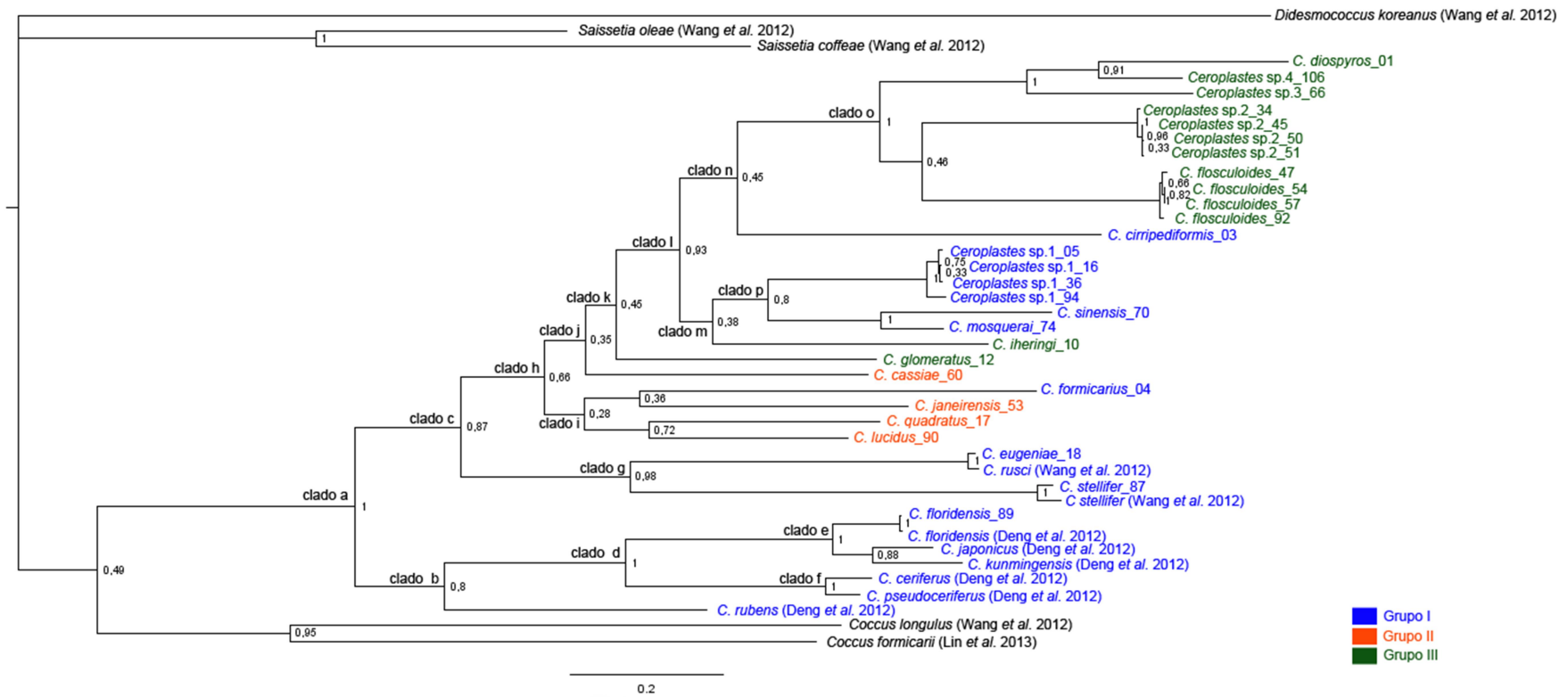


Fig. 4 Árvore filogenética de 24 espécies de Ceroplastinae, baseada na inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade estão representados ao lado de cada nó. As espécies foram destacadas com cores diferentes, conforme os grupos propostos por Rosa *et al.* (2016).

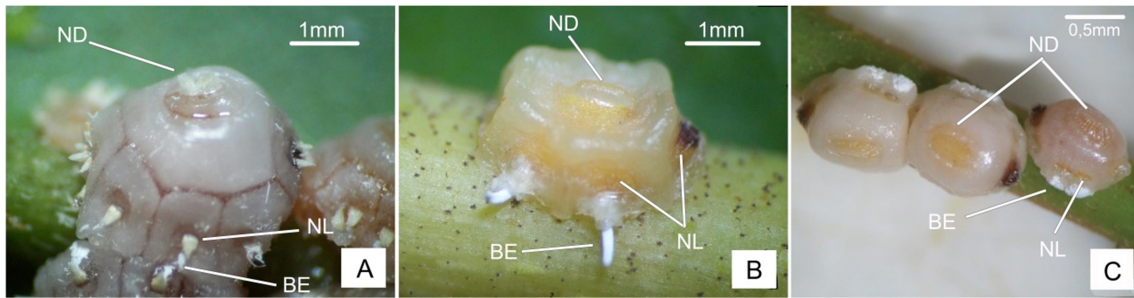


Fig. 5 Fêmeas adultas representantes dos agrupamentos propostos por Rosa *et al.* (2012) para espécies da subfamília Ceroplastinae, onde: BE= banda estigmática, ND= Núcleo dorsal, NL=Núcleo lateral. A: *Ceroplastes eugeniae* Hall: com filamentos de cera seca preenchendo os núcleos dorsal e laterais; B: *C. quadratus* Green: com carapaça de cera vítrea preenchendo o núcleo dorsal e núcleos laterais livres de filamentos ou prolongamentos de cera vítrea; C: *C. glomeratus* Cockerell: com cera vítrea dorsal e prolongamentos submarginais preenchendo os núcleos dorsal e laterais.

Considerações finais

Neste trabalho, a análise de polimorfismos do DNA, através do sequenciamento de pequenos fragmentos, mostrou-se eficiente para auxiliar os estudos de taxonomia e filogenia aqui desenvolvidos. A técnica foi fundamental para: (1) a confirmação de quatro novas espécies de Ceroplastinae, (2) auxiliar a comprovação da existência de polifenismo na espécie *Ceroplastes glomeratus*; (3) gerar hipóteses filogenéticas entre as espécies da subfamília Ceroplastinae examinadas.

Além disso, este estudo colaborou com a inclusão de 16 novas sequências de DNA, para espécies de Ceroplastinae, no banco de dados GenBank, ampliando as informações para essa subfamília.

Entretanto, apesar de muito eficiente, o estudo molecular deve ser utilizado apenas como ferramenta complementar. Estudos sobre a morfologia, comportamento, interações tróficas, biologia e desenvolvimento de uma determinada espécie continuam sendo fundamentais para sua identificação, classificação ou estudos filogenéticos.