

MARCELO SILVA BARCELLOS

MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DOS HEMIPTERA *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (CICADELLIDAE), *Collaria oleosa* (Distant, 1883) E *Prepops zetterstedti* (Stål, 1860) (MIRIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Barcellos, Marcelo Silva, 1980-
B242m Morfologia dos espermatozoides dos hemiptera *Dalbulus*
2018 *maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (*ciadellidae*), *Collaria*
oleosa (Distant, 1883) e *Prepops zetterstedti* (Stål,
1860) (*miridae*) / Marcelo Silva Barcellos. – Viçosa, MG, 2018.
x, 32f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Lino Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Hemiptera - Espermatozoides. 2. Ultraestrutura.
3. Cigarrinha. 4. Adjunto do centríolo. 5. Acrossomo.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.75

MARCELO SILVA BARCELLOS

MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DOS HEMIPTERA *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (CICADELLIDAE), *Collaria oleosa* (Distant, 1883) E *Prepops zetterstedti* (Stål, 1860) (MIRIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2018.

Vinícius Albano Araújo

José Eduardo Serrão

Uyrá dos Santos Zama

Luis Carlos Martinez Castrillón

José Lino Neto
(Orientador)

“Não é o nascimento, o casamento ou a morte, mas é a gastrulação que é verdadeiramente a parte mais importante de nossa vida.”

LEWIS WOLKPert (1986)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural pelo ensino de qualidade.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e aos funcionários de lá, em especial Karla Ribeiro, Gilmar Valente, pela atenção e ajuda sempre que solicitadas.

Ao Prof. Lino que além de orientador, é meu grande amigo, pela oportunidade de crescimento. Agradeço pelas horas dedicadas à minha formação acadêmica, pelos conselhos, pelos “puxões de orelha”, pela orientação e por ter acreditado em mim. Não há palavras que demonstre toda a minha imensa gratificação.

Ao Prof. Serrão pelos vários conselhos durante o tempo de mestrado e doutorado além da grande amizade.

Agradeço a Elizabeth Alves Pena (Beth), pelo profissionalismo, competência e toda disposição em ajudar.

A minha orientadora na graduação Marla Piumbini Rocha por me colocar no caminho da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e pelos ensinamentos ao longo da minha vida acadêmica, a essa pessoa eu sou imensamente grato!

Ao meu amigo Rômulo por todo apoio na minha chegada aqui em Viçosa. A Professora Reggiane Vilela pela ajuda a me encaminhar para UFV. Aos colegas de laboratório: Jamile (companheira de jornada no laboratório), Aline, André, Helen, Deia, Glenda, Pedro, Camila, Wagner, Dihego, Kenner, Débora, Dodora, Raíssa. Muito obrigado!

No âmbito familiar, agradeço aos meus irmãos Márcio, Paula e Fernanda que de uma forma ou de outra, sempre estiveram presentes na minha vida e muito me estimularam, mesmo sem saber ao certo do que se tratava a minha pesquisa.

Agradeço à minha mãe Tereza que foi mãe e pai ao mesmo tempo e nunca deixou faltar nada, além da educação que passou para nós ‘minha mãe é uma guerreira’.

Agradeço a minha esposa Chaiane por estar sempre do meu lado me apoiando em tudo, essa vitória também é sua, meu amor!

Aos meus filhos Patrick e Gabriel que são em grande parte a inspiração de tudo na minha vida.

Agradeço meus sogros Luiz e Sônia por todo apoio na minha caminhada!

Aos meus amigos de Pelotas-RS, meu amigo e cunhado Elton, ao Gustavo pelos inúmeros churrascos que fizemos ao meu grande amigo José Henrique (patrão) por sempre estar disposto em me apoiar e todos os colegas da Biologia UFPEL.

BIOGRAFIA

Marcelo Silva Barcellos, filho de Tereza de Jesus Silva Barcellos e João Damacir Martins de Martins, nasceu em Pelotas, Rio Grande do Sul, em 09 de novembro de 1980.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2004 em colégio público. Em abril de 2007 iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas RS, concluindo em 20 de janeiro de 2012. Durante a graduação foi bolsista dos programas PIBID pelo MEC e Novos Talentos pela CAPES, além de monitor voluntário das disciplinas de Biologia Celular e Histologia. Em março de 2012 ingressou no curso de mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo a dissertação em fevereiro de 2014. Já em dezembro de 2013 foi aprovado no curso de Doutorado também em Biologia Celular e Estrutural – UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1.Introdução.....	1
1.1. A Ordem Hemiptera	1
1.2.A subordem Auchenorrhyncha.....	1
1.3. A subordem Heteroptera	1
1.4. A morfologia geral dos espermatozoides em insetos	2
1.5. Referências Bibliográficas	3
2. Objetivos	7
3.1. Capítulo 1: Re-description of the sperm morphology of <i>Dalbulus maidis</i> (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae)	8
3.2. Capítulo 2: Estrutura e ultraestrutura dos Espermatozoides de duas espécies de percevejos da família Miridae (Heteroptera, Cimicomorpha).	15
4.Conclusões gerais	32

RESUMO

BARCELLOS, Marcelo Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Morfologia dos espermatozoides dos Hemiptera *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Cicadellidae), *Collaria oleosa* (Distant, 1883) e *Prepops zetterstedti* (Stål, 1860) (Miridae).** Orientador: José Lino Neto.

A ordem Hemiptera compreende um grupo diversificado de insetos com cerca de 89 mil espécies descritas e agrupadas nas quatro subordens: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha. Esta última possui mais de 25 mil espécies descritas dentro de duas grandes infraordens: Cicadomorpha (Cercopoidea, Cicadoidea e Membracoidea) e Fulgoromorpha (Fulgoroidea). A subordem Heteroptera é dividida nas infraordens: Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Pentatomomorpha e Cimicomorpha. Ela possui mais de 400 mil espécies descritas que podem ser predadoras, fitófagas e hematófagas caracterizando essa subordem como de importância econômica e de saúde pública. As relações filogenéticas dentro dos Auchenorrhyncha e dos Heteroptera ainda são temas de muito debate. O conhecimento da biologia reprodutiva e da morfologia dos espermatozoides podem contribuir para estudos taxonômicos e filogenéticos dessas duas subordens. Nesse contexto, no presente trabalho descrevemos, usando as microscopias de luz e eletrônica de transmissão, a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Dalbulus maidis* e *Collaria oleosa* e *Prepops zetterstedti*. No primeiro capítulo, nós redescrevemos os espermatozoides de *D. maidis*, que mediram de 118,1-128,5 µm de comprimento, sendo este valor cerca de três vezes menor do que o descrito anteriormente. A região da cabeça é formada por acrossomo e núcleo. O acrossomo é paracristalino e tem a base bifurcada que está encaixada em duas cavidades em um lado da região anterior do núcleo. O núcleo mediu 19,3-22,9 µm de comprimento e, em corte transversal, exibiu a forma de meio lua com uma fina projeção central, mas nas extremidades ele se mostrou oval. O flagelo consistiu de um axonema com 9+9+2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais simétricos, dois corpos acessórios associados a uma pequena estrutura sub-elipsoidal e um "material centro-flagelar". A porção final do flagelo de todos os espermatozoides era ramificada em três filamentos. No segundo capítulo nós caracterizamos morfologicamente os espermatozoides de dois percevejos da família Miridae, *C. oleosa* e *P. zetterstedti*. Os espermatozoides de *C. oleosa* e *P. zetterstedti* mediram 171,3 µm e 276,0 µm de comprimento, dos quais 24,7 µm e 27,2 µm representaram o núcleo, respectivamente. Em ambas espécies, essas células apresentaram na região de cabeça um acrossomo e núcleo, e no flagelo um axonema de 9+9+2 microtúbulos e dois derivados mitocondriais simétricos. Em *C. oleosa*, não em *P. zetterstedti*, o acrossomo é revestido por uma espessa camada de material denso. Na transição

núcleo-flagelo das duas espécies foi observado um longo adjunto do centríolo cilíndrico formando uma ponte entre núcleo e os componentes flagelares, essa característica é exclusiva para Miridae.

ABSTRACT

BARCELLOS, Marcelo Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Morphology of spermatozoa of Hemiptera *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Cicadellidae), *Collaria oleosa* (Distant, 1883) and *Prepops zetterstedti* (Stål, 1860) (Miridae).** Adviser: Jose Lino Neto.

The order Hemiptera comprises a diverse group of insects with about 89 thousand species described and group in four suborders: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha and Auchenorrhyncha. The latter has more than 25 thousand species described within two major infraorders: Cicadomorpha (Cercopoidea, Cicadoidea and Membracoidea) and Fulgoromorpha (Fulgoroidea). The suborder Heteroptera is divided in the infraorders: Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Pentatomomorpha and Cimicomorpha. It has more than 400 thousand species described that can be predatory, phytophagous and hematophagous, characterizing this suborder as of economic importance and public health. Phylogenetic relationships within Auchenorrhyncha and Heteroptera are still subjects of much debate. The knowledge of reproductive biology and morphology of spermatozoa can contribute to taxonomic and phylogenetic studies of these two suborders. In this context, the present work described, using light microscopy and transmission electron microscopy, the structure and ultrastructure of spermatozoa of *Dalbulus maidis*, *Collaria oleosa* and *Prepops zetterstedti*. In the first chapter, we redescribed the spermatozoa of *D. maidis*, which measured 118.1-128.5 μm in length, being about three times smaller than that previously described. The head region is formed by acrosome and nucleus. Acrosome is paracrystalline and has a bifurcated base which was docked in two cavities on one side of the anterior region of the nucleus. The nucleus measured 19.3-22.9 μm in length and, in cross section, showed a half-moon shape with a thin central projection, but at the extremities it was oval. The flagellum consisted of an axonema with 9+9+2 microtubules, two symmetrical mitochondrial derivatives, two accessory bodies associated with a small sub-ellipsoidal structure and a 'center-flagellar material'. The final portion of the flagellum of all spermatozoa was branched into three filaments. In the second chapter, we morphologically characterized the spermatozoa of two Miridae bugs, *C. oleosa* and *P. zetterstedti*. The spermatozoa of *C. oleosa* and *P. zetterstedti* measured 171.3 μm and 276.0 μm in length, of which 24.7 μm and 27.2 μm represented the nucleus, respectively. In both species, the head region presented acrosome and nucleus, and in the flagellum an axoneme of 9+9+2 microtubules and two symmetrical mitochondrial derivatives. Only in *C. oleosa*, not in *P. zetterstedti*, acrosome is coated by a thick layer of dense material. In the nucleus-flagellum transition of the two species a

long cylindrical centriole adjunct forming a bridge between the nucleus and flagellar components was observed, this feature is exclusive to Miridae.

1. Introdução

1.1. A ordem Hemiptera

A ordem Hemiptera compreende um grupo diversificado de insetos os quais variam consideravelmente em tamanho e forma do corpo, das asas e das antenas e no ciclo de vida e no hábito alimentar. Atualmente são reconhecidas cerca de 89 mil espécies distribuídas por todo o mundo (Rafael et al., 2012). Os Hemiptera são um grupo monofilético que se distingue dos outros insetos por possuírem peças bucais adaptadas à perfuração e sucção, alojadas em uma longa tromba ou bico (rostrum), tanto na fase de ninfa como na fase adulta (Schuh e Slater, 1995). São reconhecidas quatro subordens: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha (Bourgoin et al., 1997; Cryan e Urban, 2012; Grazia et al., 2012). A diversidade da ordem está relacionada à radiação das angiospermas e a eficiência na alimentação em plantas se dá graças a estruturas das peças bucais, que também possui algumas pré-adaptações para a predação.

1.2.A subordem Auchenorrhyncha

A subordem Auchenorrhyncha possui mais de 25 mil espécies descritas, com a maioria delas alimentando-se de fluidos de plantas. Os Auchenorrhyncha estão distribuídas em duas grandes infraordens: Cicadomorpha (Cercopoidea, Cicadoidea e Membracoidea) e Fulgoromorpha (Fulgoroidea) (Grimaldi e Angel, 2005; Cryan e Urban, 2012).

A condição monofilética da subordem Auchenorrhyncha tem sido alvo de muita discussão, por exemplo, Goodchild (1996) a partir de dados morfológicos do intestino, considera a subordem parafilética e indica uma relação próxima de Fulgoromorpha com Heteroptera. Da mesma forma, Hamilton (1981), reforça a parafilia de Auchenorrhyncha. Entretanto, a monofilia dessa subordem tem sido suportada utilizando dados morfológicos das antenas (Grimaldi e Angel, 2005) e dados moleculares (Cryan e Urban, 2012). Contudo Letsch et al. (2012) julga que essas relações não são claras e, portanto, ainda são alvos de questionamentos.

1.3. A subordem Heteroptera

A subordem Heteroptera foi dividida em sete infraordens: Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Pentatomomorpha e Cimicomorpha (Li et al., 2012). Esta subordem, também conhecida como percevejos, representa o grupo de insetos endopterigotos e não holometábolos mais diversificado dentro de Hemiptera, apresentando mais de 40 mil espécies (Weirauch e Schuh, 2011). A maioria dos Heteroptera é fitófaga, se alimentando de seiva e de outros fluidos produzidos pelas plantas. Entretanto existem

espécies que se alimentam de sangue (hematófagos) ou, ainda, que são predadoras de outros insetos (entomófagos) (Triplehorn e Johnson, 2005). A existência de espécies que causam danos às culturas agrícolas e espécies que transmitem doenças ao homem e animais domésticos (Rafael et al., 2012) caracteriza essa subordem de percevejos como de importância econômica e de saúde pública.

1.4. A morfologia geral dos espermatozoides em insetos

Os espermatozoides de insetos são, em geral, muito longos e finos, que podem variar de 1,7 µm de comprimento, como em *Reticulitermes lucifugus* (Baccetti et al., 1981), a 58.000 µm, como em *Drosophila bifurca* (Pitnick et al., 1995). Geralmente é possível distinguir a região da cabeça da região do flagelo, mesmo elas exibindo aproximadamente o mesmo diâmetro. A região de cabeça compreende geralmente o acrossomo e o núcleo, enquanto a região de flagelo é constituída por: um axonema, geralmente dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Na região de transição núcleo-flagelo em geral é observado um material denso chamado de adjunto do centríolo.

Segundo Jamieson et al. (1999), os espermatozoides são certamente o tipo celular com morfologia mais diversa nos insetos. Por isso, as características estruturais e ultraestruturais dessas células vêm sendo amplamente utilizadas em diversos estudos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Dallai e Afzelius, 1990, 1995; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto e Dolder, 2001; Dallai et al., 2002, 2004; Alves et al., 2006; Mancini et al., 2006, 2009). Pois os espermatozoides oferecem um conjunto de caracteres não tradicionais, uma vez que as pressões seletivas exercidas sobre eles são distintas daquelas que atuam sobre as estruturas somáticas dos indivíduos que os produzam.

Na subordem Auchenorrhyncha, estudos sobre a ultraestrutura dos espermatozoides têm sido publicados com espécies das famílias Cicadellidae (Cruz-Landim e Kitajima, 1972; Zhang e Dai, 2012; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016), Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005 e 2006), Aethalionidae (Araújo et al., 2010) e Cercopidae (Hodgson et al., 2016). Já em Heteroptera, os trabalhos foram com representantes das famílias: Lygaeidae (Barker e Reiss, 1966; Dallai e Afzelius, 1980), Gerridae (Tandler e Moriber, 1966), Pentatomidae (Philips, 1970; Trandaburu, 1973; Fernandes e Bão, 1998; Araújo et al., 2011; Dias et al., 2016), Notonectidae (Afzelius et al., 1976; Novais et al., 2017), Nepidae, Coreidae, Lygaeidae, Corixidae, Cimicidae, Hidrometridae (Dallai e Afzelius, 1980; Lee, 1991; Lee e Lee, 1992); Reduviidae, (Bão e DeSouza, 1994; Dolder, 1998; Baffa et al., 2017); Pyrrhocoridae (Dallai e Afzelius, 1980; Mercati

et al., 2009.); Largidae (Araújo et al., 2012) e Anthocoridae (Santos e Lino-Neto, 2018). Como pode observar acima, ainda não há qualquer informação sobre a morfologia de espermatozoides de representantes da família Miridae.

Considerando exposto acima, o presente estudo teve como objetivo: No capítulo 1 redescrever a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Dalbulus maidis* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae) e, no capítulo 2, fazer a caracterização morfológica dos espermatozoides de dois indivíduos representantes da família Miridae.

1.5. Referências Bibliográficas

- Afzelius, B.A., Baccetti, B., Dallai, R., 1976. The giant spermatozoon of *Notonecta*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 8, 149–161.
- Alves, I., Mancini, K., Lino-Neto J., Dolder, H., 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). Acta. Zool. (Stockholm) 87, 131–139.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Moreira, J., Neves, C.A., Lino-Neto, J., 2010. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). Micron 41, 306–311.
- Araújo, V.A., Lino-Neto, J., de Sousa Ramalho, F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). Micron 42, 560–567.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). Acta. Zool. 93, 239–244.
- Baccetti, B., Dallai, R., Callaini, G., 1981. The spermatozoa of arthropoda, *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. Int. J. Inver. Rep. Dev. 3, 87–99.
- Bão, S.N., DeSouza, W., 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). Tissue Cell 26, 299–308.
- Baffa, A.F., Camara, D.C.P., Santos-Mallet, J.R., Dasilva, E.R., Costa, J., Freitas, S.P.C., 2017. Sperm dimorphism in the *Triatoma brasiliensis* species complex and its applications. Med. Vet. Entomol. 31, 192–199.
- Barker, K.R., Riess, R. W., 1966. An electron microscope study of spermateleosis in the hemipteran *Oncopeltus fasciatus*. Cellule 66, 41–54.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2005. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 37, 257–267.

- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 38, 373–388.
- Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1972. The ultrastructure of male spermatozoa of corn leafhopper *Dalbulus maidis* Del. and W. (Homoptera: Cicadellidae). *J. Submicrosc. Cytol.* 4, 75–82.
- Cryan, J.R., Urban, J.M., 2012. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Syst. Entomol.* 37, 7–21.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *J. Morphol.* 164, 301–309.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J. Struct. Biol.* 103, 164–179.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1995. Phylogeny significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: Jamieson, B. G. M. et al. (Ed.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Memoires du Museum National D'Histoire Naturelle, Paris 16, 291–296.
- Dallai, R., Carapelli, A., Nardi, F., Fanciulli, P. P., Lupetti, P., Afzelius, B.A., Frati, F., 2004. Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletiidae, Zygentoma, Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in *Zygentoma*. *Tissue Cell* 36, 233–244.
- Dallai, R., Lupetti, P., Carapelli, A., Frati, F., Afzelius B.A., 2002. Sperm structure and spermiogenesis in *Atelura formicaria* Heyden (*Zygentoma*, Insecta). *Acta. Zool.* 83, 245–262.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., Dallai, R., 2016. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. *Micron.* 82, 33–40.
- Dolder, H., 1988. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Ultra. Mol. Struct. R.* 101, 159–164.
- Fernandes, A.P., Bão, S.N., 1998. Spermiogenesis in phytophagous bug (Hemiptera, Pentatomidae): an ultrastructural study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30, 485–493.
- Goodchild, A.J.P., 1966. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biol. Rev.* 41, 97–139.
- Grazia, J., Cavichioli, R.R., Wolff, V.R.S., Fernandes, J.A.M., Takiya, D.M., 2012. Hemiptera. In: Rafael, J.A., Melo, G.A.R., et al. (Ed). *Insetos do Brasil: Diversidade e taxonomia*. Holos, Ribeirão Preto. 28, 810.
- Grimaldi, D., Engel, M. S., 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press. 755 pp.

- Hamilton, K.G.A., 1981. Morphology and evolution of the rhynchotan head (Insecta: Hemiptera, Homoptera). *Can. Entomol.* 113, 953–974.
- Hodgson, A.N., Ridgeway, J.A., Villet, M.H., 2016. Sperm ultrastructure and spermatodesm morphology of the spittle bug *Locris transversa* (Thunberg 1822) (Hemiptera: Cercopidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* 60, 87–94.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insect: their spermatozoa and phylogeny.* Science, Enfield, NH.
- Kubo-Irie, M., Irie, M., Nakazawa, T., Mohri, H., 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *J. Insect. Physiol.* 49, 983–991.
- Lee, C.E., 1991. Morphological and phylogenetic studies on the true water bugs (Hemiptera: Heteroptera). *Nature. Life.* 21, 1–183.
- Lee, Y.H., Lee, C.E., 1992. Ultrastructure of Spermatozoa and Spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with Special Reference to Phytogeny (Cell Biology). *Zool. Sci.* 9, 971–981.
- Letsch, H.O., Meusemann, K., Wipfler, B., Schütte, K., Beutel, R., Misof, B., 2012. Insect phylogenomics: results, problems and the impact of matrix composition. *Proc. R. Soc. B* 279, 3282–3290.
- Li, M., Tian, Y., Zhao, Y., Bu, W., 2012. Higher level phylogeny and the first divergence time estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) based on multiple genes. *PloS One* 7, 32152.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001a. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scr.* 30, 89–96.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.* 53, 333–338.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., Dallai, R., 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38, 54–59.
- Mercati, D., Giusti, F., Dallai, R., 2009. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). *J. Morphol.* 270, 825–833.
- Novais, A.M., Dias, G., Lino-Neto, J., 2017. Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera: Notonectidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 46, 635–643.
- Phillips, D.M., 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell. Biol.* 44, 243–277.
- Pitnick, S., Spicer, G.S., Markow, T.A., 1995. How long is a giant sperm? *Nature* 375, 109–109.
- Constantino, R., 2012. *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia.* Ribeirão Preto: Holos, 796 pp.

- Santos, A.B.R., Lino-Neto, J., 2018. Sperm morphology of predatory pirate bugs *Amphiareus constrictus* and *Blaptostethus pallescens* (Heteroptera: Anthocoridae) with phylogenetic inferences. *Micron* 105, 18–23.
- Su, M., Dietrich, C.H., Zhang, Y., Dai, W., 2014. Ultrastructure of the spermatozoa of *Psammotettix striatus* (Linnaeus) and *Exitianus nanus* (Distant) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Arthropod. Struct. Dev.* 43, 559–570.
- Schuh, R.T., Slater, J.A., 1995. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history. Cornell University Press.
- Tandler, B., Moriber, L.G., 1966. Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remigis* (Say). *J. Ultrastruct. Res.* 14, 391–404.
- Trandaburu, V., 1973. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). *Trav. Mus. Hist. Nat. “Grigore Antipa”* 13, 137–145
- Triplehorn, C.A., Johnson, N., 2005. Introduction to the study of insects. Belmont, California, Thomson Brooks/Cole.
- Weirauch, C., Schuh, R.T., 2011. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 487–510.
- Vitale, D.G., D’Urso, V., Viscuso, R., 2016. Morphostructural investigation on spermatozoa and sperm bundles of the leafhopper *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Hemiptera: Deltocephalinae). *Zoomorphology* 135, 441–451.
- Zhang, B., Dai, W., 2012. Ultrastructure of the spermatozoa of *Cicadella viridis* (Linnaeus) and its bearing on the phylogeny of Auchenorrhyncha. *Micron* 43, 978–984.

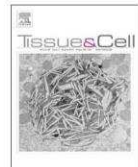
2. Objetivos

Descrever a morfologia dos espermatozoides de *Dalbulus maidis* (Auchenorrhyncha, Cicadellidae) e de duas espécies de Miridae (Heteroptera, Cimicomorpha), contribuindo com informações que para auxiliar na compreensão da biologia reprodutiva e sistemática destes grupos de insetos.

3.1. Capítulo 1

**Re-description of the sperm morphology of
Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae)**

Artigo publicado na revista Tissue and Cell



Re-description of the sperm morphology of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae)

Marcelo Silva Barcellos, Glenda Dias, José Lino-Neto*

Departamento de Biologia Geral, UFV, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Corn leafhopper
Sperm ultrastructure
Membracoidea
Cicadomorpha

ABSTRACT

The corn leafhopper, *Dalbulus maidis*, which is one of the most important vectors of maize diseases, had the morphology of its spermatozoa described more than 40 years ago. However, the description is imprecise, requiring certain rectifications. Hence, we re-describe the sperm morphology of this species using light microscopy and transmission electron microscopy. Their spermatozoa measured from 118.1 to 128.5 μm in length, this value being about three times smaller than what was previously described. The head region is formed by a small acrosome and the nucleus. The acrosome is paracrystalline and has the bifurcated base that is docked in two cavities on one side of the anterior region of the nucleus. The nucleus, which is linear and thin, measured from 19.3 to 22.9 μm in length, and exhibited homogeneously compact chromatin. In cross-section, it has a thumbtack shape, except in the anterior and posterior regions, where it is oval. The flagellum consists of an axoneme with 9 + 9 + 2 microtubules, two similar mitochondrial derivatives, two accessory bodies each associated with a small sub-ellipsoidal structure, and a 'center-flagellar material'. In all the spermatozoa observed, the final portion of the flagellum was branched into four filaments. Some of these morphological features are now being re-described, while others have been observed for the first time in the Cicadellidae family, as the center-flagellar material.

1. Introduction

Cicadellidae is one of five families of Membracoidea, which together with Cercopoidea and Cicadoidea constitute the infraorder Cicadomorpha, and this, together with the Fulgoromorpha, form the suborder Auchenorrhyncha.

The cicadellids, the largest family of hemimetabolous insects, are economically important because they are plant-sucking insects. This family is composed of approximately 25,000 species in more than 3200 genera that are distributed worldwide (Dietrich, 2005). The corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott), is the vector of pathogens of major importance in many tropical regions of Latin America, generating several phytosanitary problems (Nault and Rodríguez, 1985; Hruska and Peralta, 1997; Krinsky, 2002). Considering this spittlebug to be one of the major vectors of corn disease, Cruz-Landim and Kitajima (1972) described the morphology of their sperm more than 40 years ago. Recently, while observing the morphology of these cells, we noticed some features not yet described, and some others very discordant to those described by those authors.

There are still a few Auchenorrhyncha species with the sperm morphology described so far. However, it is already observed that in

this suborder of *Hemiptera*, the sperm cells exhibit unique characteristics such as the existence of branches at the flagellum tip, and the acrosome with the bifurcate base. Zhang and Dai (2012), Su et al. (2014), and Vitale et al. (2016), described the sperm morphology of some species of Deltocephalinae, including: *Cicadella viridis* (Linnaeus), *Psammodettix striatus* (Linnaeus), *Exitianus nanus* (Distant), and *Balclutha brevis* (Lindberg), where comparisons were made with other Cicadellidae, as well as with other Auchenorrhyncha. However, the general knowledge of this cellular type for this group still remains little explored. In this work we re-describe the sperm morphology of *D. maidis*, adding information to the description made by Cruz-Landim and Kitajima (1972), with the intention of contributing to future taxonomic and phylogenetic studies of this suborder of Hemiptera insects.

2. Materials and methods

2.1. Obtaining insects

Adult males of *D. maidis* were collected in the experimental corn field of Universidade Federal de Viçosa, in the municipality of Viçosa, Minas Gerais State, Southwestern Brazil (20°46'04.2"S 42°51'20.8"W).

* Corresponding author.

E-mail addresses: marcelo.barcellos@ufv.br (M. Silva Barcellos), glenda.santos@ufv.br (G. Dias), linoneto@ufv.br (J. Lino-Neto).

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.001>

Received 1 February 2018; Received in revised form 1 March 2018; Accepted 2 March 2018

Available online 03 March 2018

0040-8166/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Six voucher specimens were deposited in the entomological collection of the Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2.2. Light microscopy (LM)

For obtain the histological sections, seminal vesicles were dissected and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2 and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer, for 2 h. They were then dehydrated in increasing alcohol series and embedded in Histo-resin (GMA, Leica). Semithin sections (2 µm) were stained with Harris haematoxylin for 15 min, washed in running water for 10 min, stained with eosin for 1 min, rapidly rinsed in tap water and mounted in Entelan (Merck). The analysis and photographs were made with an Olympus BX-60 microscope. For the morphometric description, spermatozoa extracted from the seminal vesicles of five individuals were spread on histological slides in the presence 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, and fixed with 4% paraformaldehyde for 15–20 min at room temperature. The slides were then washed in running water, distilled water, and dried at room temperature. To measure total sperm size, some slides were stained with Giemsa for 15 min, then washed in running water and dried at room temperature. The analysis and the photographs were made using an Olympus BX-60 microscope with Olympus Q-Color 3 digital camera attached. To measure the length of the nuclei, two preparations from each individual were stained with DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml in sodium phosphate buffer for 20 min, then washed in running water and set up with 50% sucrose. These spermatozoa were photographed with an epifluorescence microscope (Olympus, BX-60) equipped with BP360-370 nm filter. All measurements were taken using the image analysis program, *Image Pro-Plus*, totalling 50 sperm and 50 nuclei measured.

2.3. Transmission electron microscopy (TEM)

For the ultrastructural description of the sperm, seminal vesicles of five adult males of *D. maidis* were dissected 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, and fixed for 24 h in 2.5% glutaraldehyde solution, 0.2% picric acid, 2% sucrose and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Then the material was washed with the same buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide solution for 2 h, dehydrated in increasing series of acetone, infiltrated and included in epoxy resin (Epon 812). Ultrathin sections (~70 nm) were routinely contrasted with uranyl acetate and lead citrate. All images were taken in a TEM Zeiss EM109, operating at 80 kV, at the Center for Microscopy and Microanalysis at UFV.

3. Results

The *D. maidis* sperm were slender and long, with an overall length of 121.90 ± 2.32 (118.13–127.45) µm ($n = 50$; Fig. 1A). In the seminal vesicles, they were observed in bundles joined at the head region by an amorphous extracellular matrix (Figs. 1D,E and 2A). Each spermatozoon comprised a head region formed by the acrosome and nucleus, and a flagellar region (Fig. 1B–D), which in its final portion, branches into four filaments with about 10 µm in length each (Fig. 1D). The acrosome, with about 2 µm in length, was paracrystalline and exhibited a small sub-acrosomal space filled with lower density amorphous material (Fig. 2B–C). Its base was bifurcated with the two projections inserted into two lateral grooves along the anterior end of the nucleus (Fig. 2B,D). The nucleus was also slender, linear and measured 21.16 ± 0.65 (19.63–22.89) µm in length ($n = 50$; Fig. 1A–E). It was entirely filled by dense chromatin (Fig. 2D–J) and, in cross-section, exhibited the thumbtack shape (Fig. 2A,F), except in the anterior regions (Fig. 2D,E) and posterior (Fig. 2H), where it was oval. At the later end, it was bevelled, where the anterior tips of the two mitochondrial derivatives (MDs) were juxtaposed (Fig. 2G,J). The centriole adjunct was very discrete, beginning just above the MDs, and extending, like a

thin blade, between the nucleus and the tip of the MDs, up to the beginning of the axoneme (Fig. 2G–J).

The flagellum, with 100.94 ± 2.53 (96.41–106.67) µm in length, consisted of an axoneme with a microtubular arrangement of $9 + 9 + 2$, two symmetrical MDs, two accessory bodies and a ‘center-flagellar material’ between the MDs and axoneme (Fig. 2L). In addition, two discrete and sub-ellipsoidal structures, each located between an accessory body, the axoneme and a MD were observed (Fig. 2L). The axoneme arose from the basal body, which was associated, and in line, with the nuclear base (Fig. 2G). The MDs, in cross-section, exhibited an amorphous region, close to the accessory bodies, and another larger with paracrystalline material (Fig. 2L). The accessory bodies showed the shape ranging from half moon to triangular, and were quite dense, except in the periphery facing the axoneme (Fig. 2L). They extended up until the flagellum end, finishing immediately before the MDs (Fig. 2M). At the flagellum end, the axoneme was the last to terminate, but before that, its microtubules disorganise and form, in different numbers, the flagellar branches (Fig. 2M).

4. Discussion

The length that we observed for the *D. maidis* sperm differs markedly from that described by Cruz-Landim and Kitajima (1972) for this same species. These authors reported that the sperm measured 300 µm in length, of which 50 µm corresponded to the nucleus. However, of the 50 sperm that we measured, none showed a length smaller than 118 µm and greater than 127.5 µm. Therefore, these were about three times smaller than the previously described length. Similarly, we observed the nuclear length ranging from 19 µm to 23 µm, therefore, these were less than half of those reported by Cruz-Landim and Kitajima (1972). It has been observed in several animal groups that even in species that produce a single sperm morphotype, these cells exhibit some variation in length (De Souza et al., 2018). However, this variation is relatively small, even in species with little or no sperm competition (Immler et al., 2001; Baer et al., 2003). On the other hand, a species that produces more than one sperm morphotype (heteromorphism), the average lengths may be quite different between the morphotypes (e.g., Cicadidae, Chawanji et al., 2006). However, in *D. maidis*, we can claim that they produce only one sperm class. Moreover, with a coefficient of variation ($CV = SD/M \times 100 = 1.9\%$) of very low value, this indicates a great uniformity in sperm morphometry. Low values like this have been translated as one of the indications of high quality ejaculate, a characteristic commonly observed in species exhibiting sperm competition (e.g. Fitzpatrick and Baer, 2011). Only one class of sperm was also observed in three other species of Cicadellidae (Zhang and Dai, 2012; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016), in Aethalionidae (Araújo et al., 2010) and in the Cercopidae *Loctris transversa* (Cercopoidea, Hodgson et al., 2016). On the other hand, polymorphic sperm (polymorphism) were observed in all species of Cicadidae studied (Cicadoidea, Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006). In the suborder Heteroptera, sperm polymorphism is a relatively common occurrence, having already been observed in Pentatomidae, Largidae, and Pirocoryidae (Bowen, 1920; Schrader and Leuchtenberger, 1950; Araújo et al., 2011, 2012; Mercati and Dallai, 2016).

The measures described by Cruz-Landim and Kitajima (1972) certainly do not correspond to the total and nuclear length of the spermatozoa of *D. maidis* that we analysed in this paper. According to Dr Luci B.N. Coelho (personal information), in Brazil, no other species of *Dalbulus* that can be confused with *D. maidis* occurs. Thus, these discrepancies in the measurements are possibly due to methodological errors, however, the authors do not inform us in the work how sperm measurements were taken. Further, we found that the length of the spermatozoa of *D. maidis* is within the range observed for other Deltocephalinae, ranging from 121 µm to 270 µm (Su et al., 2014; Vitale et al., 2016).

Flagella with branches in the final portion, as in this species, were

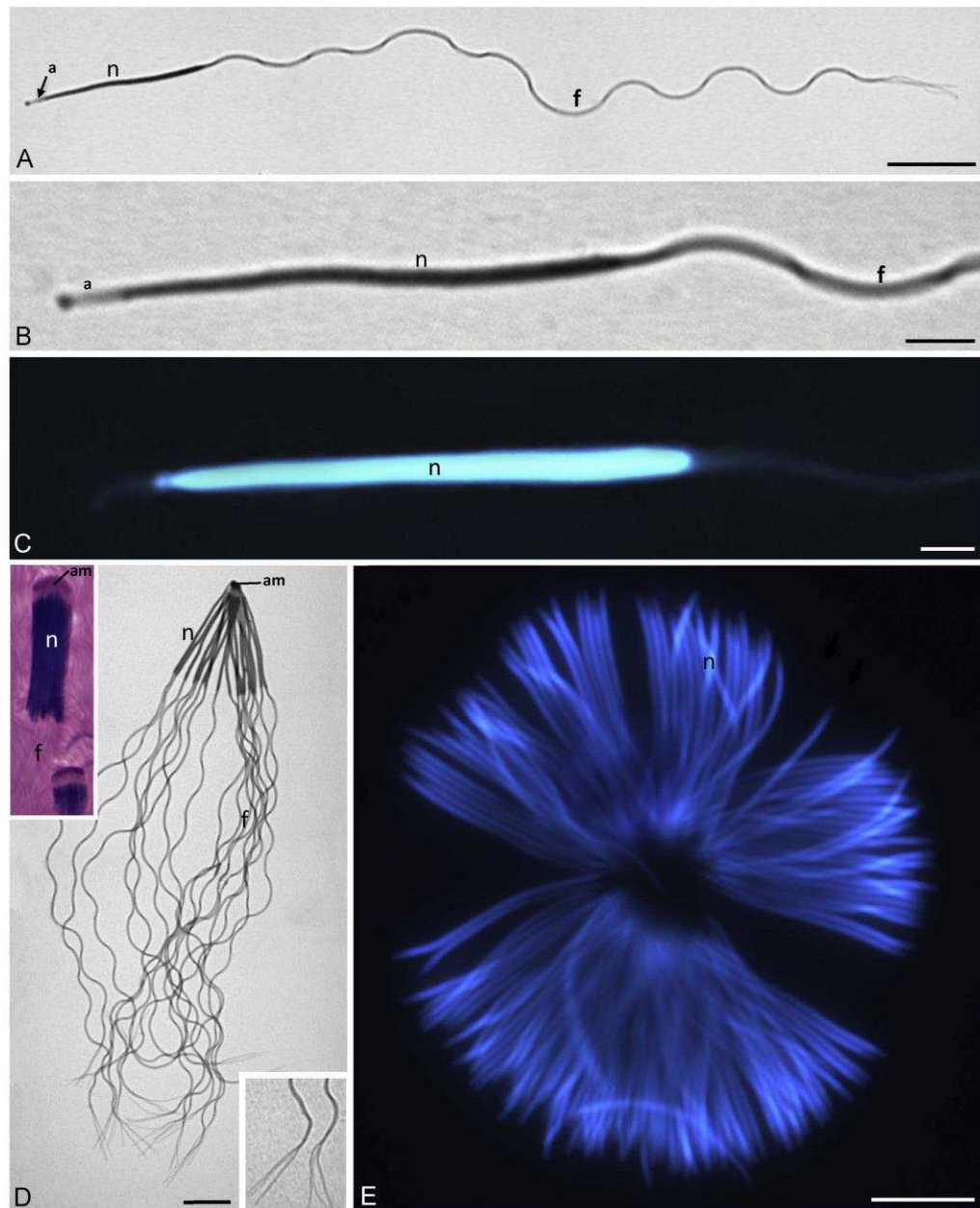
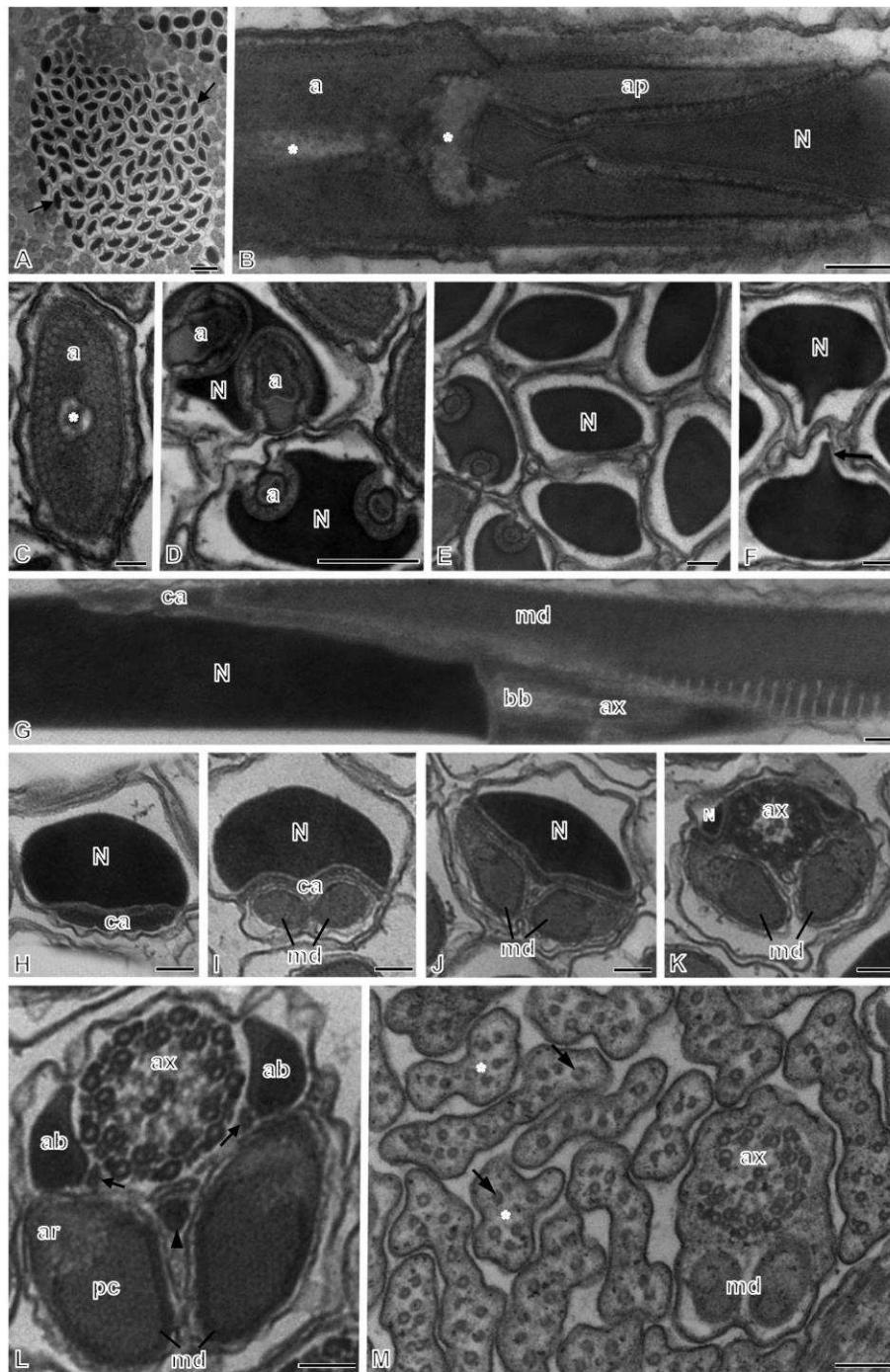


Fig. 1. *D. maidis* sperm from seminal vesicles under LM. (A–B) Sperm stained with Giemsa showing the acrosome (a), the nucleus (n) and flagellum (f). (C) Nucleus stained with DAPI. (D) A fragment of a sperm bundle stained with Giemsa. The inset of the upper left corner shows a sperm bundles in longitudinal section stained with HE, and the inset of the lower right corner, the branched flagellar tips. am, amorphous extracellular matrix; N, nuclei; f, flagella. (E) Nuclei (n) of a sperm bundle stained with DAPI. Scale bars: A,D,E = 10; B,C = 2 μ m.

also observed in another Deltocephalinae (*B. brevis*, Vitale et al., 2016), as well as in five other species distributed in four genera of Membracidae (Phillips, 1969). However, no flagellar branching was observed in the Aethalionidae *Aethalion reticulatum* (Araújo et al., 2010), indicating that this feature may be common only to Cicadellidae and Membracidae. Nevertheless, information is still needed about the spermatozoa of representatives of Melizoderidae and Myerslopiidae. However, these

ramifications appear to be restricted to Membracoidea, since they have not been observed either in Cercopoidea (Hodgson et al., 2016), or in Cicadoidea (Chawanji et al., 2005, 2006).

Spermatozoa in bundles in the seminal vesicles, maintained by the head anterior region inserted in an extracellular matrix, were observed in all Cicadomorpha studied. As observed by Hodgson et al. (2016), the disposition of the spermatozoa in the bundle in Cercopoidea



(caption on next page)

(Cercopidae) and Membracoidea (Aethalionidae, Araújo et al., 2010; Cicadellidae, Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; this study) is quite different from that observed in Cicadoidea (Cicadidae, Kubo-Irie et al.,

2003; Chawanji et al., 2005, 2006). In the latter, the images show the sperm heads attached to a dense rod-like structure (spermatostyle). Some studies have shown that sperm bundles with sperm heads

Fig. 2. *D. maidis* sperm from seminal vesicles under TEM. (A) Cross-sections of a sperm bundle showing the different nuclear shapes. (B) Longitudinal section of the transition region between acrosome (a) and nucleus (N). Note the subacrosomal space (asterisks) and the two acrosomal projections (ap). (C) Cross-section of the acrosome (a). The asterisk indicates the subacrosomal space. (D–F) Cross-sections in the transition between acrosome (a) and nucleus (N), and in the nuclear median region. Note that the nucleus is ovoid near to the acrosome (in E), however in the median region it has the half moon shape with a thin median projection (arrow in F). (G–K) Longitudinal (G) and cross (H–K) sections of the nucleus-flagellum transition region. Note the centriole adjunct material (ca) in front of the mitochondrial derivatives (md) and between these and the nucleus (N), bb, basal body; ax, axoneme. (L) Cross-section of a flagellum. Note the regions of paracrystalline (pc) and amorphous (ar) materials in the mitochondrial derivatives (md), and the center-flagellar material (arrowhead). ax, axoneme; ab, accessory bodies with their sub-ellipsoidal structures (arrows). (M) Cross-section of several ramifications of flagellar ends (asterisks) with microtubules (arrows). Scale bars: A = 0.5 μ m; B–M = 0.1 μ m.

attached to a spermatostyle are formed secondarily (secondary conjugation) in the *vasa deferentia* (e.g. Hodgson et al., 2013; Salazar et al., unpublished). This type of conjugation may have spermatozoa originating from different spermatogonia (post-spermatogenic mechanisms, Higginson and Pitnick, 2011). The term spermatodesm (-a, -ata plural) has been suggested for those bundles whose spermatozoa originate from the same spermatogonium (primary conjugation), and therefore, they are already formed in the testes (Birkhead et al., 2009; Higginson and Pitnick, 2011). The spermatodesma have spermatozoa attached by the head anterior region in an approximately globular material (see Moreira et al., 2004; Lino-Neto et al., 2008). Although the origins of the sperm bundles have not been reported, it is possible to suppose that in Cicadoidea they are secondary conjugation (with spermatostyle), whereas in Cercopoidea and Membracoidea, they are primary conjugation (spermatodesma).

The general ultrastructure of *D. maidis* sperm is very similar to those of other Cicadomorpha studied so far (Folliot and Maillet, 1970; Cruz-Landim and Kitajima, 1972; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006; Araújo et al., 2010; Zhang and Dai, 2012; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; Zhang et al., 2016). They contain: (1) a paracrystalline conical acrosome without perforatorium; (2) a slender nucleus, usually oval, with the posterior extremity flattened laterally to accommodate the centriole adjunct and the tips of the two MDs; (3) The flagellum with an axoneme of 9 + 9 + 2 microtubules, two MDs and, in some species, two well developed accessory bodies. However, observing in detail the spermatozoa of the Cicadomorpha studied so far, it is possible to characterise them by family, genus and even by species. The acrosome with a bifurcated base and the two projections inserted in two lateral grooves to the anterior extremity of the nucleus is a characteristic observed in the three superfamilies of Cicadomorpha: Cercopoidea (Cercopidae, Hodgson et al., 2016), Cicadoidea (Cicadidae, Chawanji et al., 2005, 2006) and Membracoidea (Cicadellidae, Zhang and Dai, 2012; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; Zhang et al., 2016; Membracidae, this study). In practically all species of Cicadomorpha, the two grooves, where the acrosome projections fit, are located on the same face of the nucleus that is oval. So far, only in the Cicadellidae *P. striatus*, each groove lies on one of the two faces of the nucleus (Su et al., 2014).

As in *C. viridis* (Zhang and Dai, 2012), the nuclear form of the *D. maidis* sperm, in cross-section, was named deltoid (roughly triangular) by Cruz-Landim and Kitajima. In *C. viridis* and in *A. reticulatum* (Araújo et al., 2010), the sperm nucleus is, in fact, roughly triangular, but in *D. maidis*, it exhibits the half moon shape with a thin median projection (so-called thumbtack shape by Su et al., 2014), except at both ends where it is ovoid (see Fig. 2E). A nucleus with this same shape was also observed in the spermatozoa of Deltocephalinae *E. nanus* (Su et al., 2014) and *B. brevis* (Vitale et al., 2016), and in the Cicadellinae *Kolla paulula* (Zhang et al., 2016). In the other Cicadomorpha studied, the nucleus varies from deltoid to ovoid.

An axoneme with 9 + 9 + 2 microtubules, two similar mitochondrial derivatives and two accessory bodies also occur in the other Cicadellidae studied (Cicadellinae, Zhang and Dai, 2012; Zhang et al., 2016; Deltocephalinae, Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; this study). However the two small sub-ellipsoidal structures (e.g., Vitale et al., 2016) and the 'center-flagellar material' (this study) were observed only in the Deltocephalinae. A material between the main flagellar structures also occurs in other insect groups, for example Hymenoptera (Zama

et al., 2001; Lino-Neto et al., 2008) and Zoraptera (Dallai et al., 2012). As observed by other authors, the presence of accessory bodies is the main difference among the Cicadomorpha, which are present only in the Membracoidea. In addition, these structures exhibit differences even in the Cicadellidae: while in Deltocephalinae they are triangular and long, ending near the flagellum end (Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; this study), in Cicadellinae they are ovoid and short, being observed only in the flagellum initial region (Zhang and Dai, 2012; Zhang et al., 2016).

Considering the information till now available, it is possible to infer that the acrosome with that paracrystalline pattern and with two projections that fit into nuclear grooves, as well as the nuclear base flattened laterally and in parallel with the centriolar adjunct material and the anterior ends of the two MDs, are synapomorphies for Cicadomorpha, supporting the monophyletic condition for this infra-order of Hemiptera (e.g., Song et al., 2017).

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Luci Boa Nova Coelho (Universidade Federal do Rio de Janeiro) for the identification, preparation and deposition of the voucher specimens in the Museu Nacional, UFRJ. This research was supported by the Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References

- Araújo, V.A., Bão, S.N., Moreira, J., Neves, C.A., Lino-Neto, J., 2010. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalon reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalonidae). *Micron* 41, 306–311.
- Araújo, V.A., Lino-Neto, J., de Sousa Ramalho, F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron* 42, 560–567.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Acta Zool.* 93, 239–244.
- Baer, B., Schmid-Hempel, P., Høeg, J.T., Boomsma, J.J., 2003. Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insectes Soc.* 50, 101–108.
- Birkhead, T.R., Hosken, D.J., Pitnick, S., 2009. *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Academic, Oxford, UK.
- Bowen, R.H., 1920. Studies on insect spermatogenesis I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. *Biol. Bull.* 39, 316–362.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2005. Sperm morphology in four species of African platyleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 37, 257–267.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 38, 373–388.
- Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1972. The ultrastructure of male spermatozoa of corn leafhopper *Dalbulus maidis* Del. and W. (Homoptera: Cicadellidae). *J. Submicrosc. Cytol.* 4, 75–82.
- Dallai, R., Mercati, D., Gottardo, M., Dossey, A.T., Machida, R., Mashymo, Y., Beutel, R.G., 2012. The male and female reproductive systems of *Zorotypus hubbardi* Caudell, 1918 (Zoraptera). *Arthropod Struct. Dev.* 41, 337–359.
- De Souza, A.R., Folly, C., Dias, G., Santos, E.F., Lino-Neto, J., 2018. Sperm morphometric in males of the paper wasp *Polistes simillimus*. *Bull. Insectology* 71 in press.
- Dietrich, C.H., 2005. Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Fla. Entomol.* 88, 502–517.
- Fitzpatrick, J.L., Baer, B., 2011. Polyandry reduces sperm length variation in social insects. *Evolution* 65, 3006–3012.
- Folliot, R., Maillet, P.L., 1970. Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de divers insectes Homoptères. In: Bacchetti, B. (Ed.), *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, pp. 289–300.
- Higginson, D.M., Pitnick, S., 2011. Evolution of intra-ejaculate sperm interactions: do sperm cooperate? *Biol. Rev.* 86, 249–270.
- Hodgson, A.N., Ferenz, H.J., Schneider, S., 2013. Formation of sperm bundles in

- Pterostichus nigrita* (Coleoptera: Carabidae). Invertebr. Reprod. Dev. 57, 120–131.
- Hodgson, A.N., Ridgeway, J.A., Villet, M.H., 2016. Sperm ultrastructure and spermatoderm morphology of the spittle bug *Loxys transversa* (Thunberg 1822) (Hemiptera: Cercopidae). Invertebr. Reprod. Dev. 60, 87–94.
- Hruska, A.J., Peralta, M.G., 1997. Maize response to corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) infestation and achaparramiento disease. J. Econ. Entomol. 90, 604–610.
- Immier, S., Gonzalez-Voyer, A., Birkhead, T.R., 2001. Distinct evolutionary patterns of morphometric sperm traits in passerine birds. J. Zool. Lond. 254, 147–153.
- Krinsky, W., 2002. True bugs (Hemiptera). In: Mullen, G., Durden, L.A. (Eds.), Medical and Veterinary Entomology. Academic Press, Orlando, Florida, USA, pp. 67–86 pp. 597.
- Kubo-Irie, M., Irie, M., Nakazawa, T., Mohri, H., 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). J. Insect Physiol. 49, 983–991.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., Mancini, K., Mercati, D., Dallai, R., 2008. The short spermatoderm of *Arge pagana* (Hymenoptera: Symphyta). Tissue Cell 40, 185–193.
- Mercati, D., Dallai, R., 2016. A peculiar new virus-spermatoderm association in the bug *Raphigaster nebulosa* (Poda) (Heteroptera-Insecta). Arthropod Struct. Dev. 45, 64–68.
- Moreira, J., Zama, U., Lino-Neto, J., 2004. Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). Braz. J. Morphol. Sci. 21, 145–152.
- Nault, L.K., Rodríguez, J.G., 1985. The Leafhoppers and Planthoppers. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA, pp. 500.
- Phillips, D.M., 1969. Exceptions to the prevailing pattern of tubules (9 + 9 + 2) in the sperm flagella of certain insect species. J. Cell Biol. 40, 28–43.
- Schrader, F., Leuchtenberger, C., 1950. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). Exp. Cell Res. 1, 421–452.
- Song, N., Cai, W., Li, H., 2017. Deep-level phylogeny of Cicadomorpha inferred from mitochondrial genomes sequenced by NGS. Sci. Rep. 7, 10429.
- Su, M., Dietrich, C.H., Zhang, Y., Dai, W., 2014. Ultrastructure of the spermatozoa of *Psammotettix striatus* (Linnaeus) and *Exitanus nanus* (Distant) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae). Arthropod Struct. Dev. 43, 559–570.
- Vitale, D.G., D'Urso, V., Viscuso, R., 2016. Morphostructural investigation on spermatozoa and sperm bundles of the leafhopper *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Hemiptera: Deltocephalinae). Zoomorphology 135, 441–451.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J. Hym. Res. 10, 261–270.
- Zhang, B., Dai, W., 2012. Ultrastructure of the spermatozoa of *Cicadella viridis* (Linnaeus) and its bearing on the phylogeny of Auchenorrhyncha. Micron 43, 978–984.
- Zhang, B., Zhang, C., Dietrich, C., Dai, W., 2016. Anatomy and Ultrastructure of Male Reproductive System in Two Leafhoppers *Cicadella viridis* and *Kolla paulula* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 109, 447–462.

3.2. Capítulo 2.

Estrutura e ultraestrutura dos Espermatozoides de duas espécies de percevejos da família Miridae (Heteroptera, Cimicomorpha)

Resumo

A morfologia dos espermatozoides de duas espécies de percevejos da família Miridae, *Collaria oleosa* (Stenodemini) e *Prepops zetterstedti* (Resthenin), foi descrita pela primeira vez nesse trabalho utilizando as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides dessas duas espécies são longos e filiformes, em *C. oleosa* eles mediram de comprimento 171,25 µm (núcleo 24,72 µm) e em *P. zetterstedti* 276,01 µm e núcleo 27,22 µm. Em ambas espécies, os espermatozoides apresentaram uma região de cabeça, formada por um acrossomo e o núcleo, e uma região de flagelo com um axonema de 9+9+2 microtúbulos e dois derivados mitocondriais simétricos, circundando quase que totalmente o axonema principalmente em *C. oleosa*. Nesta espécie, diferente de *P. zetterstedti*, o acrossomo se mostrou revestido por uma espessa camada de material denso. Nas duas espécies, na região de transição núcleo-flagelo foi observado um adjunto do centríolo muito longo (10 µm em *C. oleosa* e 30 µm em *P. zetterstedti*). Ele apresentou a forma de um bastão maciço separando a base do núcleo dos componentes flagelares. Adjunto do centríolo com esta característica não foi observado em nenhum outro inseto, sendo, até o momento exclusivo para Miridae. O comprimento dos espermatozoides, bem como de suas partes, e o revestimento acrossomal em *C. oleosa* distinguem facilmente uma espécie da outra.

1. Introdução

Os Miridae são uma das 16 famílias que compõem a infraordem Cimicomorpha e, como aproximadamente 11 mil espécies descritas, constituem a maior família de Heteroptera (Hemiptera). Eles estão distribuídos em oito subfamílias (Bryocorinae, Cylapinae, Deraeocorinae, Isometopinae, Mirinae, Orthotylinae, Phylinae, Psallopinae) e 39 tribos, formando um dos mais importantes grupos de insetos dentro da ordem Heteroptera. Pois, além da grande diversidade de espécies, exibem ampla distribuição geográfica e são muito importantes nos sistemas naturais e agroecossistemas atuando como herbívoras ou como predadores (Wheeler, 2001).

O gênero *Collaria* pertence à tribo Stenodemini (Mirinae) e tem cerca de 15 espécies reconhecidas (Morales et al., 2016). Essas espécies por serem filófagas são relevantes para a produção agrícola. Elas podem estar associadas a várias culturas, como arroz, trigo, aveia, cevada e gramíneas forrageiras em diferentes estádios de desenvolvimento (Da Silva et al., 1994; Carlessi et al., 1999; Ferreira et al., 2001; Goellner e Floss, 2001). O gênero *Prepops* pertencente à tribo Resthenini (Mirinae) possui cerca de 197 espécies descritas com distribuição restrita ao continente americano (Schuh, 2013). As espécies desse gênero podem causar danos em cultivares de feijão e batata na América Central, bem como em plantações de uva no estado Flórida nos Estados Unidos (Saunders et al., 1988; King e Saunders, 1984; Wheeler 2001).

Nos Cimicomorpha, como nos Heteroptera em geral, as relações filogenéticas em nível de família ou inferior ainda é objeto de discussão (Schuh e Štys, 1991, Tian et al., 2008). Nesse sentido, o conhecimento sobre a morfologia dos espermatozoides pode contribuir para a sistemática desses insetos como tem feito para vários outros grupos de insetos (Dallai e Afzelius, 1980; Jamieson et al., 1999; Birkhead et al., 2009; Dallai et al., 2016; Gottardo et al., 2016). Considerando a quantidade de espécies, o número de trabalhos sobre a ultraestrutura de espermatozoides em Cimicomorpha ainda é muito escasso. Na literatura consta trabalhos com representantes de apenas duas famílias: Reduviidae (Dallai e Afzelius 1980; Dolder, 1988; Bão e Souza 1994; Baffa et al. 2017) e Anthocoridae (Santos e Lino-Neto 2018). Como pode ser observado, não existe qualquer descrição sobre os espermatozoides dos Miridae, por isso neste trabalho nós descrevemos a morfologia dos espermatozoides de *C. oleosa* e *P. zettertedti* representando duas tribos desses percevejos.

2. Material e Métodos

2.1. Insetos

Machos adultos de *C. oleosa* e *P. zetterstedti* foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (20° 45' 14" S, 42° 52' 55" W 648 m).

2.2. Microscopia de luz (ML)

Espermatozoides extraídos das vesículas seminais de cinco indivíduos de cada espécie, foram espalhados sobre lâminas histológicas em presença de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fixadas com paraformaldeído a 4% por 15-20 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e secas à temperatura ambiente. Para medir o tamanho total dos espermatozoides, algumas lâminas foram coradas com Giemsa por 15 min, em seguida lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em um fotomicroscópio Olympus BX-60. Para medir o comprimento dos núcleos, algumas preparações foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em *tampão* fosfato-salino (PBS), por 20 minutos, em seguida lavadas em água corrente e as lamínulas montadas com sacarose 50%. Estas lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60), equipado com filtro BP360-370 nm. Todas as medidas foram feitas utilizando o programa de análise de imagem *Image Pro-Plus*, totalizando 30 espermatozoides e 30 núcleos medidos para cada espécie.

2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a descrição ultraestrutural dos espermatozoides, vesículas seminais de cinco machos adultos de *C. oleosa* e *P. zettertedti* foram dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl₂ 5 mM no tampão cacodilato de sódio. Após 24 horas, o material foi lavado com o mesmo tampão, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 h, desidratado em série crescente de acetona, infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo a 2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3. Resultados

Os espermatozoides de *C. oleosa* e *P. zetterstedti* são longos e filiformes, mediram $171,25 \pm 5,85 \mu\text{m}$ e $276,01 \pm 5,85 \mu\text{m}$ de comprimento, respectivamente (Figs 1A,C) e nas vesículas seminais das duas espécies foram observados individualizados. Nas duas espécies observou-se apenas um morfotipo de espermatozoides e cada espermatozoide exibiu uma região de cabeça, formada por um acrossomo e um núcleo, e uma região flagelar (Figs 1A-D). O acrossomo, em secção transversal, mostrou o formato de gota e totalmente preenchido por material paracristalino (Figs 2B-C;3A). A sua base afilada assimetricamente estava apoiada lateralmente à extremidade anterior do núcleo por aproximadamente $3 \mu\text{m}$ (Figs 1B;2D-F;3C-D). Em *C. oleosa*, diferente de *P. zetterstedti*, o acrossomo se mostrou espiralado e envolvido por uma camada espessa de material denso que se estende até a região da sobreposição dele com o núcleo (Figs 3B-F). Nas duas espécies o núcleo dos espermatozoides também se mostrou filiforme e mediram $24,72 \pm 1,43 \mu\text{m}$ (*C. oleosa*) e $27,22 \pm 1,02 \mu\text{m}$ (*P. zetterstedti*) de comprimento (Figs 1A-D).

Em MET, o núcleo se apresentou totalmente preenchido por cromatina homogênea e densa, e com formato circular nos cortes transversais (Figs 2G, H;3E,F). A sua extremidade final tornou-se abruptamente afilada ($\sim 3 \mu\text{m}$, Figs 1B,D) e assimetricamente encaixado na extremidade anterior do adjunto do centríolo (Figs 2I,J; 3G,H). Em ambas as espécies, entre a base nuclear e as extremidades anteriores dos componentes do flagelo observou-se uma estrutura cilíndrica e densa denominada de adjunto do centríolo. Essa estrutura mediu cerca de $10 \mu\text{m}$ em *C. oleosa* e $30 \mu\text{m}$ em *P. zetterstedti* (Figs 1A,C;2I-M;3G-J), comprimentos estes considerados muito longos, especialmente na última espécie, onde ele é mais longo do que o núcleo (Fig. 1C). Em sua porção anterior, o adjunto circundava a região posterior afilada do núcleo (Figs 2G, I,J;3G,H), Em seguida ele assumiu a forma de um longo bastão ($10 \mu\text{m}$ em *C. oleosa* e $30 \mu\text{m}$ em *P. zetterstedti*) quase totalmente maciço com apenas uma pequena região clara em forma de trevo (Figs 2G,K;3E,I). Já a sua extremidade posterior circundou inicialmente as pontas anteriores dos dois derivados mitocondriais e, em seguida, a ponta do axonema (centríolo ou corpo basal) (Figs 2L,M;3J). O flagelo apresentou um axonema como padrão microtubular $9+9+2$, sendo nove microtúbulos acessórios mais externos, seguidos de nove duplas e um par central (Figs 2N;3K).

Nas duas espécies os derivados mitocondriais foram muito similares: em secção transversal eles foram simétricos, cada um com área aproximadamente igual à do axonema e formato aproximadamente de lua crescente (Figs 2N;3K). Eles circundavam quase que totalmente o axonema especialmente em *C. oleosa* por apresentarem uma das extremidades mais alongada (Fig. 3N, setas). Além disso, observou-se pontes ligando axonema aos derivados mitocondriais (Fig. 3N).

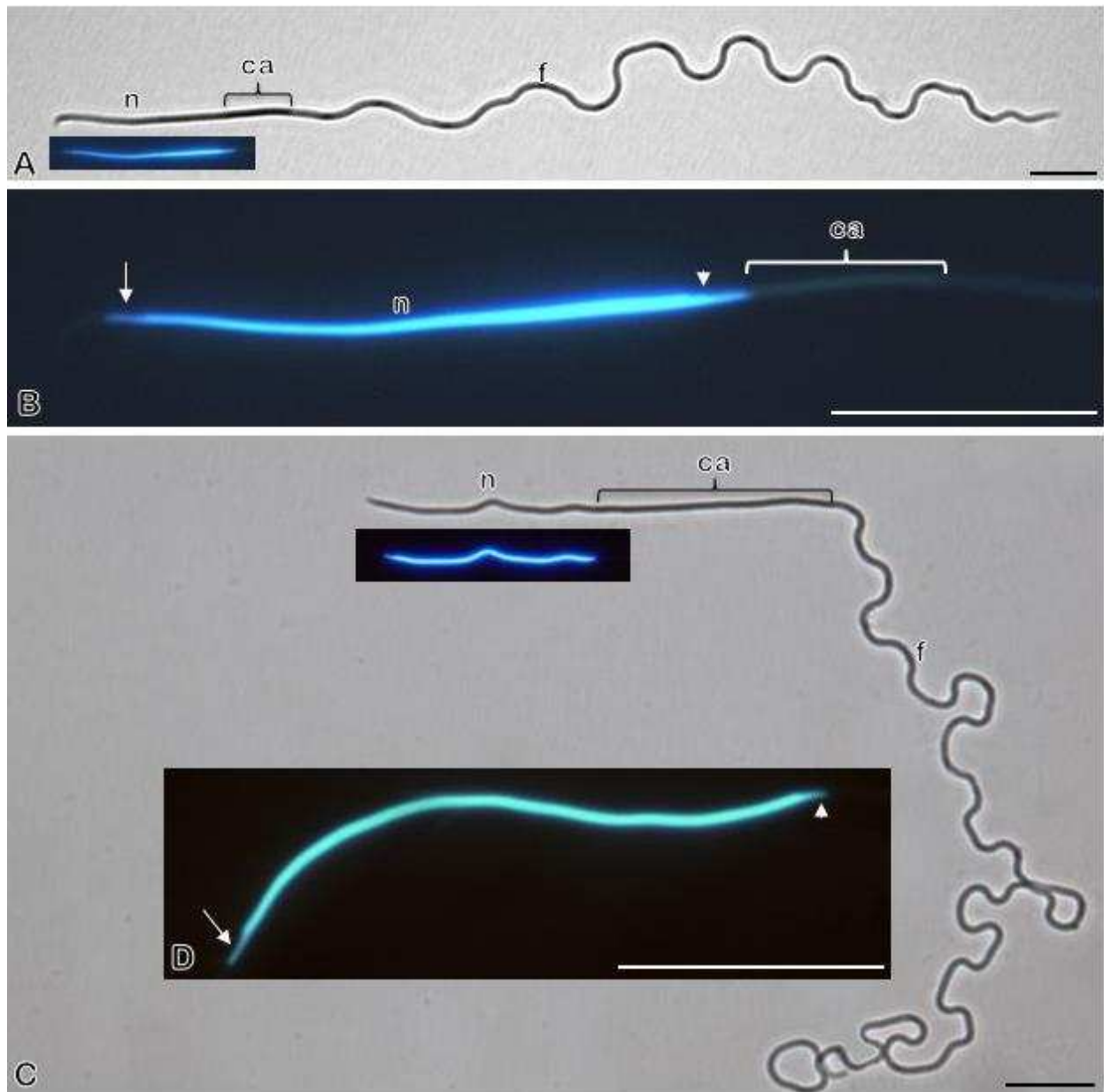


Fig. 1. Espermatozoides de *C. oleosa* (A e B) e *P. zettertedti* (C e D) sobre microscopia de luz. (A e C) Espermatozoides corados com Giemsa mostrando núcleo (n) e flagelo (f). Note o núcleo (n) e logo em seguida o adjunto do centríolo (ca) bastante extenso, principalmente em C. Observe ainda, nessas mesmas figuras, os núcleos dos mesmos espermatozoides que foram corados com Giemsa, corados com DAPI (*Inset*). (B e D) Espermatozoides corados com DAPI mostrando a região de sobreposição acrossomo-núcleo (seta) e a região de sobreposição núcleo-adjunto do centríolo (cabeça de seta). Barras = 10 μ m.

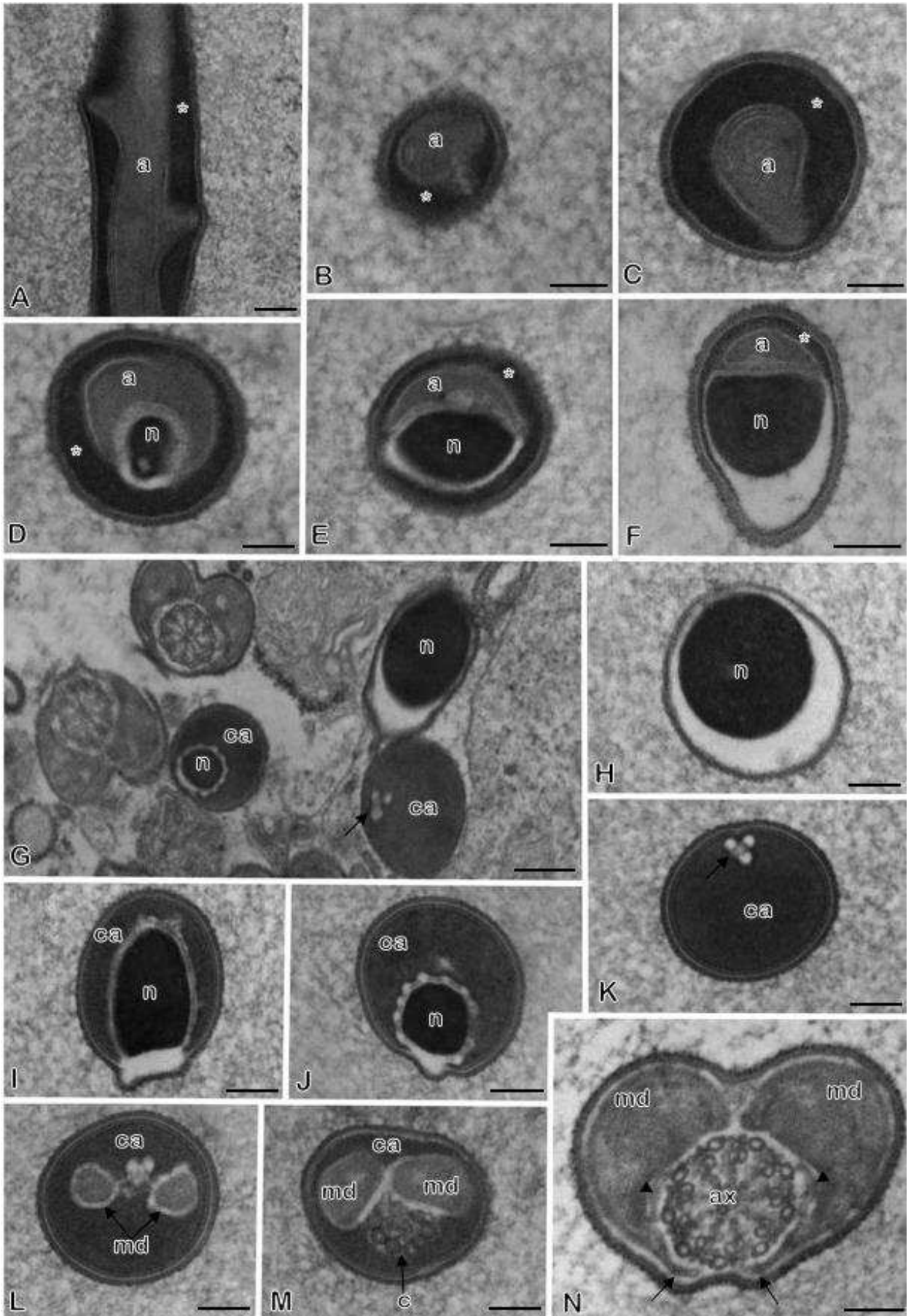


Fig. 2. Espermatozoides de *C. oleosa* sobre microscopia eletrônica de transmissão (TEM) em secção longitudinal (**A**) e transversal (**B-N**). (**A-C**) Região do acrossomo (a) totalmente preenchido com material paracristalino. Note, a camada espessa de material denso que reveste externamente o acrossomo (asterisco). (**D-F**) Região de transição acrossomo (a) núcleo (n). Observe que a camada espessa de material denso (asterisco) persiste até o final dessa região de transição. (**G-M**) Região de transição núcleo-flagelo mostrando o núcleo (n) com formato circular e o adjunto do centríolo (ca) com uma pequena região periférica em forma de “trevo” (setas). Note o adjunto do centríolo (ca), em (**G, I e J**), envolvendo a ponta posterior do núcleo (n) e em (**L e M**), abraçando a ponta anterior dos dois derivados mitocondriais (md) e do axonema (ax) (centríolo (c)). (**N**) Região do flagelo mostrando o axonema (ax) e os dois derivados mitocondriais (md) simétricos. Setas mostrando uma das extremidades mais alongada dos derivados mitocondriais (md) e cabeças de setas indicando as pontes que ligam o axonema aos derivados mitocondriais. Barras: G = 0,2 μm ; A-F e H-N= 0,1 μm .

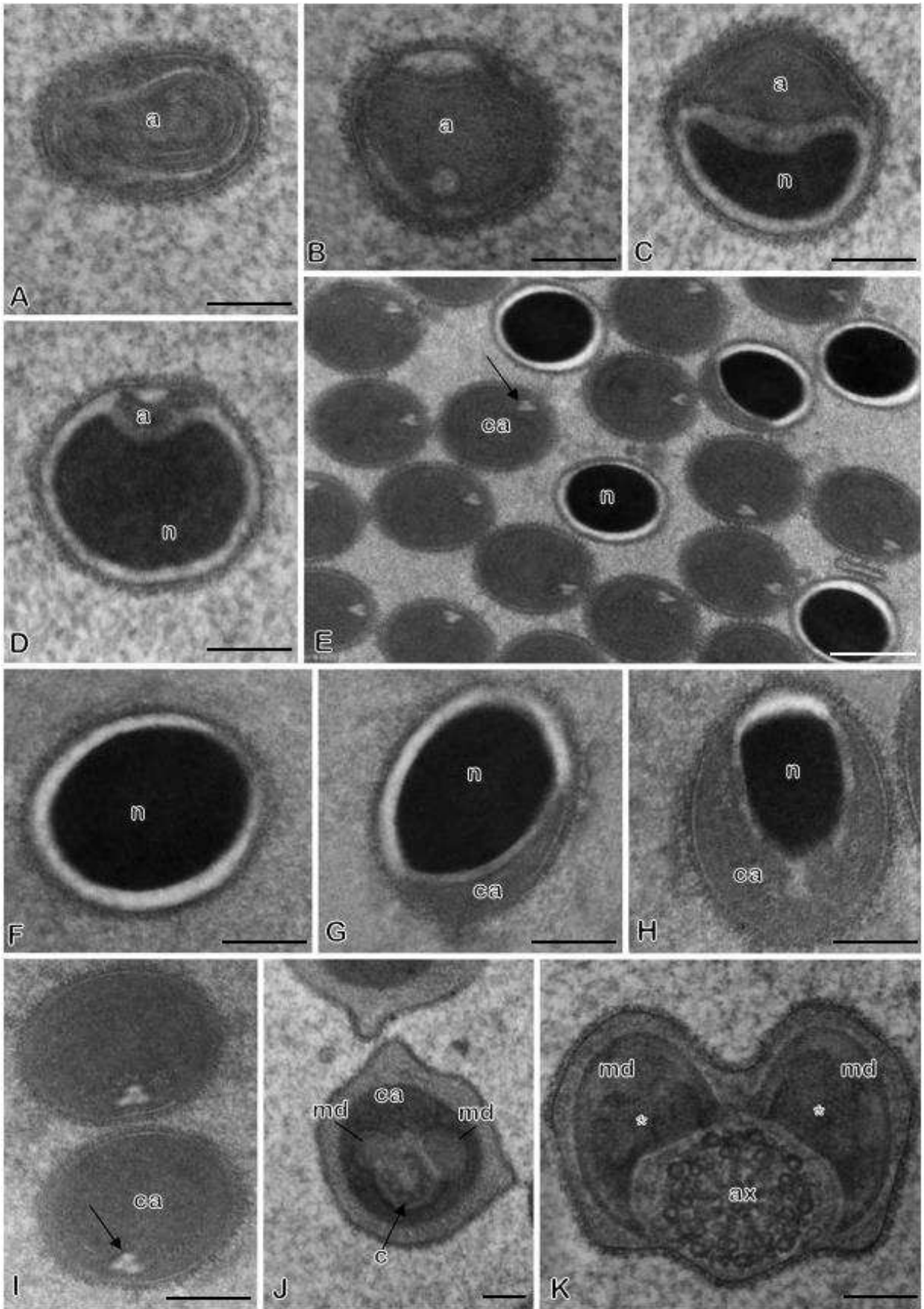


Fig. 3. Espermatozoides de *P. zettertedti* sobre MET em secção transversal (**A-K**). (**A e B**) Região do acrossomo (a) totalmente preenchido com material paracristalino. (**C e D**) Região de transição acrossomo (a) núcleo (n). (**E-I**) Região de transição núcleo-flagelo mostrando o núcleo (n) com formato circular e o adjunto do centríolo (ca) com uma pequena região periférica em forma de “trevo” (setas). Note o adjunto do centríolo (ca), em (**G e H**), abraçando a ponta posterior do núcleo e em (**J**) envolvendo a ponta anterior dos dois derivados mitocondriais (dm) e do axonema (ax) (centríolo (c)). (**K**) Região do flagelo mostrando o axonema (ax) e os dois derivados mitocondriais (dm) simétricos. Observe a região de material paracristalino nos derivados mitocondriais (asterisco). Barras: E = 0,2 μm ; A-D e F-K= 0,1 μm .

4. Discussão

Essa é o primeiro trabalho sobre a caracterização estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides de percevejos representantes duas tribos da família Miridae, Cimicomorpha, e, sendo assim, já podemos observar que nessa infraordem, assim como nos insetos em geral, o comprimento total dos espermatozoides, bem como de suas partes principais (núcleo e flagelo), pode variar bastante entre espécies, até mesmo proximamente relacionadas. Enquanto em *C. oleosa* e *P. zetterstedti* os espermatozoides exibiram respectivamente 171 (núcleo 25) μm e 276 (núcleo 27) μm de comprimento, nos Anthocoridae *Amphiareus constrictus* e *Blaptostethus pallescens* eles mediram 216 (núcleo 37) μm e 181 (núcleo 12) μm , respectivamente (Santos e Lino-Neto, 2017). Já no Cimicidae *Ornithocoris pallidus* essas células mediram 450 (núcleo 97) μm (Novais, 2017). É interessante notar que o comprimento nuclear e o comprimento total dos espermatozoides não têm qualquer relação. Por exemplo, ao dividir comprimento do núcleo por aquele dos espermatozoides tem-se para *C. oleosa* $\sim 0,15$; *P. zetterstedti* $\sim 0,10$; *A. constrictus* $\sim 0,17$; *B. pallescens* $\sim 0,07$; *O. pallidus* $\sim 0,22$. Isso aumenta o potencial de utilização de todos esses valores para discriminar espécies muito próximas, como foi feito para ‘*vespas do figo*’ (Chalcidoidea, Pereira et al., 2008).

A produção de apenas uma classe de espermatozoides (monomórficos), como observado nas duas espécies desse trabalho, foi também reportada em Anthocoridae (*A. constrictus* e *B. pallescens*, Santos e Lino-Neto, 2017) e Cimicidae (*O. pallidus*, Novais, 2017), duas famílias consideradas mais derivadas entre os Cimicomorpha (Schuh e Štys, 1991). A produção de apenas um morfotipo de espermatozoides parece ser uma condição comum entre os Hemiptera, pois tem sido observada em Sternorrhyncha (Psylloidea, Barcellos et al., 2017; Aleyrodoidea, Bào et al., 1997; Coccoidea, Paoli et al., 2015 e Aphidoidea, Mazzini, 1970), em Auchenorrhyncha (Membracoidea, Araújo et al., 2010; Vitale et al., 2016, Cercopoidea Hodgson et al., 2016) e, em Heteroptera, Pentatomidae (*Eurydema ventralis*, Trandaburu, 1973; *Acrosternum aseedum* e *Nezara viridula*, Fernandes e Bão, 1998; *Coptosoma scutellatum*, Dias et al., 2016), Reduviidae (*Rhodnius prolixus*, Bão, 1994), Belostomatidae (*Muljarus japonicus* e *Diplonychus esakii* Lee e Lee, 1988 e 1992), Notonectidae (*Martarega bentoi*, Novais et al., 2017). Entretanto, a presença de mais de um tipo de espermatozoide em uma mesma espécie (polimorfismo) já foi observada em Auchenorrhyncha (apenas Cicadidae, Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006) e nos Heteroptera: Pentatomidae (Bowen, 1920; Schrader e Leuchtenberger, 1950; Araújo et al., 2011; Mercati e Dallai, 2016), Largidae (Araújo et al., 2012), e Reduviidae (Baffa et al., 2017). Esta última é a única família da infraordem Cimicomorpha na qual foi, até agora, observado polimorfismo espermático. Considerando a proposta de Schuh e Štys (1991), que Reduviidae tem

uma condição mais basal dentro da infraordem, é possível supor que o polimorfismo espermático é uma característica que foi perdida ao longo da história evolutiva dos Cimicomorpha.

Espermatozoides livres na vesícula seminal, como observado nas duas espécies desse estudo, é uma característica reportada para todas as espécies já estudadas de Heteroptera (*q.v.*), Sternorrhyncha (Vitale et al., 2011; Barcellos et al., 2017) e no Auchenorrhyncha *Peregrinus maidis* (Fulgoromorpha, Barcellos et al., dados não publicados). Entretanto, em todos os Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) estudados os espermatozoides são mantidos em feixe nas vesículas seminais (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006; Araújo et al., 2010; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; Hodgson et al., 2016; Barcellos et al., 2018), indicando que possivelmente, esta deve ser uma condição derivada para Hemiptera.

À MET mostrou que os espermatozoides de *C. oleosa* e *P. zetterstedti* são similares aqueles descritos para toda a subordem Heteroptera, isto é: um acrossomo sem perforatorium e um núcleo na região de cabeça e, especialmente a região flagelar, com apenas um axonema de 9+9+2 microtúbulos e dois derivados mitocondriais. Portanto, sem nenhuma das duas estruturas ditas corpos acessórios, observadas na maioria dos insetos. Ainda como nos Heteroptera em geral, os derivados mitocondriais exibem duas áreas de material paracristalino e pontes ligando eles ao axonema e, na transição núcleo-flagelo, um material relativamente denso denominado adjunto do centríolo. As características observadas na região flagelar podem ser consideradas sinapomórficas para a subordem Heteroptera.

Apesar dos espermatozoides dessas duas espécies exibirem as mesmas estruturas que são observadas nos Heteroptera em geral, quando consideramos comprimentos (discutidos acima), formatos e arranjos entre as estruturas é possível distinguir facilmente uma espécie de outra, bem como as duas dos demais Heteroptera. Por exemplo, espermatozoides com acrossomo revestido externamente por uma espessa camada de material denso, como ocorre *C. oleosa*, ainda não foi observado em qualquer outro Hemiptera, incluindo *P. zetterstedti*. Assim, é possível que essa condição seja única para *C. oleosa* ou talvez para o gênero *Collaria*. Acrossomo igualmente revestido também ocorre em alguns Coleoptera, por exemplo, Coccinellidae (Dallai et al., 2017). Contudo neste último grupo de insetos o acrossomo exhibe perforatorium, como em muitos outros insetos, e é incomumente posicionado à frente do axonema.

O arranjo entre núcleo, adjunto do centríolo e os componentes flagelares, na região de transição núcleo-flagelo, por enquanto é único para Miridae. Em Anthocoridae (Santos e Lino-Neto, 2017) e Cimicidae (Novais, 2017) o adjunto do centríolo é também cilíndrico e envolve a porção final do núcleo e as extremidades anteriores dos derivados mitocondriais e do axonema. Contudo nessa duas famílias essa porção final do núcleo é bastante delgada e, as vezes, muito

longa (~ 45 µm em *O. pallidus*) e, diferente das duas espécies desse estudo, a ponta dessa porção nuclear sobrepõem lateralmente às extremidades anteriores dos derivados mitocondriais e está em linha com o axonema. Assim, pode-se dizer que em Anthocoridae e Cimicidae o adjunto do centríolo reveste o final do núcleo e as pontas dos derivados mitocondriais e axonema, já em Miridae ele literalmente constituiu uma ponte entre estas estruturas. Em Reduviidae o adjunto do centríolo é curto, bifurcado e paralelo à base do núcleo (Maia, 2009; Baffa et al., 2017). Como essas mesmas características são observadas nos espermatozoides dos Pentatomomorpha em geral (ver Dias et al., 2016), elas apoiam a condição basal dos Reduviidae dentro de Cimicomorpha, como proposto por Schuh e Štys (1991) e difere da hipótese de Kerzhner (1981).

No núcleo dos espermatozoides de ambas espécies desse estudo a cromatina se mostrou completamente compactada e não observamos qualquer partícula densa semelhante a vírus (*virus-like*) entre ela, como foi observado por Santos e Lino-Neto (2017) nas duas espécies de Anthocoridae, por Bão et al. (1997) em *Bemisia tabaci* (Sternorrhyncha) e por Araújo et al. (2010) no Auchenorrhyncha *Aethalion reticulatum*. O núcleo dos espermatozoides do Cimicidae *O. pallidus* (Novais, 2017) também difere do núcleo dos espermatozoides das duas espécies desse estudo por apresentar um estreito ‘canal’ eletriluciente.

A simetria nos dois derivados mitocondriais flagelares, quando em corte transversal, é uma característica observada na maioria dos Heteroptera (ver Dallai e Afzelius, 1980). Incluindo as duas espécies de Miridae estudados nesse trabalho e *O. pallidus*, Cimicidae (Novais et al, 2017). Contudo nas duas únicas espécies de Anthocoridae já estudadas eles são assimétricos (Santos e Lino-Neto, 2017). Essas características são interessantes e podem ser úteis em estudos filogenéticos dentro de Cimicomorpha, pois de acordo com Gottardo et al (2016) a assimetria nos derivados mitocondriais de espermatozoides de insetos, é considerada uma condição derivada.

Em conclusão, nos espermatozoides de *C. oleosa* e *P. zetterstedti* a ausência de corpos acessórios, a presença pontes ligando os derivados mitocondriais ao axonema, duas regiões de material paracristalino nos derivados mitocondriais e acrossomo sem perforatorium são características compartilhadas com os demais Heteroptera; o adjunto do centríolo como um bastão longo e cilíndrico é característico de Miridae, Cimicidae e Anthocoridae; o adjunto do centríolo formando uma ponte entre a base nuclear e os componentes do flagelo até agora é característico de Miridae e Finalmente o acrossomo revestido por uma camada espessa de material denso é uma característica que, por hora, distingue *C. oleosa* de *P. zetterstedti*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Paulo Sérgio Fiuza Ferreira pela coleta e identificação dos espécimes e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa. Esta pesquisa foi apoiada pelas agências brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências

- Araújo, V.A., Bão, S.N., Moreira, J., Neves, C.A., Lino-Neto, J., 2010. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). *Micron* 41, 306–311.
- Araújo, V.A., Lino-Neto, J., de Sousa Ramalho, F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron* 42, 560–567.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Acta Zool.* 93(2), 239–244.
- Bão, S.N., Souza, W., 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue Cell* 26, 299–308.
- Bão, S.N., Kitajima, E.W., Callaini, G., Lupetti, P., Dallai, R., 1997. Spermiogenesis in three species of whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). *Acta Zool.* 78, 163–170.
- Baffa, A.F., Camara, D.C.P., Santos-Mallet, J.R., Dasilva, E.R., Costa, J., Freitas, S.P.C., 2017. Sperm dimorphism in the *Triatoma brasiliensis* species complex and its applications. *Med. Vet. Entomol.* 31, 192–199.
- Barcellos, M.S., Cossolin, J.F.S., Dias, G., Lino-Neto, J., 2017. Sperm morphology of the leafhopper *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Sternorrhyncha: Psylloidea: Liviidae). *Micron* 99, 49–55.
- Barcellos, M.S., Dias, G., Lino-Neto, J., 2018. Re-description of the sperm morphology of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Tissue Cell* 51, 56–61.
- Birkhead, T.R., Hosken, D.J., Ptinick, S., 2009. *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Academic Press, Oxford, UK. pp. 22–23.
- Bowen, R.H., 1920. Studies on insect spermatogenesis I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. *Biol. Bull.* 39, 316–362.
- Carlesii, L., Corseuil, E., Salvador, J., 1999. Aspectos Biológicos e Morfométricos de *Collaria scenica* (Stal) (Hemiptera: Miridae) em Trigo. *An. Soc. Entomol. Bras.* 28, 65–73.

- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2005. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 37, 257–267.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell*. 38, 373–388.
- Da Silva, D., Alves, R., Ferreira, P., Camargo, A., 1994. *Collaria oleosa* (Distant, 1883) (Heteroptera: Miridae) uma praga potencial na cultura do trigo na região dos Cerrados. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 29, 2007–2012.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *J. Morphol.* 164, 301–309.
- Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R.G., 2016. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 1–23.
- Dallai, R., Mercati, D., Lino-Neto, J., Dias, G., Lupetti, P., 2017. Evidence of a procentriole during spermiogenesis in the coccinellid insect *Adalia decempunctata* (L): An ultrastructural study. *Arthropod. Struct. Dev.* 46, 815–823.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., Dallai, R., 2016. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. *Micron.* 82, 33–40.
- Dolder, H., 1988. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Ultra. Mol. Struct. R.* 101, 159–164.
- Fernandes, A.P., Bão, S.N., 1998. Spermiogenesis in phytophagous bug (Hemiptera, Pentatomidae): an ultrastructural study. *J. Submicrosc. Cytol Pathol.* 30, 485–493.
- Ferreira, P.S.F., Silva, E.R., Coelho, L.B.N., 2001. Miridae (Heteroptera) fitófagos e predadores de Minas Gerais, Brasil, com ênfase em espécies com potencial econômico. *Iheringia, Série Zoologia.* 91, 159-169.
- Goellner, C.I., Floss, E.L., 2001. Insetos-pragas da cultura da aveia: biologia, manejo e controle. Universidade de Passo Fundo.
- Gottardo, M., Dallai, R., Mercati, D., Hörnschemeyer, T., Beutel, R.G., 2016. The evolution of insect sperm an unusual character system in a megadiverse group. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 54, 237–325.
- Hodgson, A.N., Ridgeway, J.A., Villet, M.H., 2016. Sperm ultrastructure and spermatodesm morphology of the spittle bug *Locris transversa* (Thunberg 1822) (Hemiptera: Cercopidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* 60, 87–94.

- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. Insect: their spermatozoa and phylogeny. Science, Enfield, NH.
- Kerzhner, I.M., 1981. Fauna of the USSR. Heteroptera of the Family Nabidae. Academy of Sciences, Leningrad (pp. 326).
- King, A.B., Saunders, J.L., 1984. The invertebrate pests of annual food crops in Central America: A guide to their recognition and control. Overseas Development Administration. London. 166pp.
- Kubo-Irie, M., Irie, M., Nakazawa, T., Mohri, H., 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). J. Insect. Physiol. 49, 983–991.
- Lee, H.S., Lee, Y.H., 1988. Ultrastructure of spermatogenesis in *Diplonychus esakii* (Heteroptera; Belostomatidae). Korean. J. Appl. Entomol. 18, 49–63.
- Lee, Y.H., Lee, C.E., 1992. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny (cell biology). Zool. Sci. 9, 971–981.
- Maia, M.C., 2009. Morfologia dos espermatozoides em Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Mazzini, M., 1970. Lo spermatozoo di un afide: *Megoura viciae* Kalt. Atti Accad Fisiocrit. 2, 14.
- Mercati, D., Dallai, R., 2016. A peculiar new virus-spermatozoon association in the bug *Raphigaster nebulosa* (Poda) (Heteroptera-Insecta). Arthropod. Struct. Dev. 45, 64–68.
- Morales, I., Ferreira, P.S.F., D, Forero., 2016. Taxonomic revision of *Collaria* Provancher, 1872 (Hemiptera: Miridae) with the description of a new species from the Afrotropical region. Zootaxa 4138, 201–246.
- Novais, A.M., Dias, G., Lino-Neto, J., 2017. Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera: Notonectidae). Arthropod. Struct. Dev. 46, 635–643.
- Novais, A.M., 2017. Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides em Nepomorpha e Cimicomorpha (Heteroptera). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural)–Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Paoli, F., Roversi, P.F., Benassai, D., Squarcini, M., Mercati, D., Dallai, R., 2015. The sperm of *Matsucoccus feytaudi* (Insecta, Coccoidea): can the microtubular bundle be considered as a true flagellum? Arthropod Struct. Dev. 44, 142–156.
- Pereira, R.A.S., Lino-Neto, J., Prado, A.P.D., 2008. Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. Symbiosis (Rehovot), 45, 143.

- Santos, A.B.R., Lino-Neto, J., 2018. Sperm morphology of predatory pirate bugs *Amphiareus constrictus* and *Blaptostethus pallescens* (Heteroptera: Anthocoridae) with phylogenetic inferences. *Micron*. 105, 18–23.
- Saunders, J.L., 1998. Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central (Vol. 52). Turrialba, Costa Rica, 305p.
- Schrader, F., Leuchtenberger, C., 1950. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Exp. Cell. Res.* 1, 421–452.
- Schuh, R.T., Štys, P., 1991. Phylogenetic analysis of Cimicomorphan family relationships (Heteroptera). *J. N.Y. Entomol. Soc.* 99, 298–350.
- Schuh, R.T., 2013. On-line systematic catalog of plant bugs (Insecta: Heteroptera: Miridae). Retrieved from: <http://research.amnh.org/pbi/catalog/>
- Su, M., Dietrich, C.H., Zhang, Y., Dai, W., 2014. Ultrastructure of the spermatozoa of *Psammotettix striatus* (Linnaeus) and *Exitianus nanus* (Distant) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Arthropod. Struct. Dev.* 43, 559–570.
- Wheeler, A.G., J.R., 2001. *Biology of the plant bugs (Hemiptera: Miridae): pests, predators, Opportunists*. Ithaca: Cornell University Press. 507 p.
- Tian, Y., Zhu, W., Li, M., Xie, Q., Bu, W., 2008. Influence of data conflict and molecular phylogeny of major clades in Cimicomorphan true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 581–597
- Trandaburu, V., 1973. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera: Pentatomidae). *Trav. Mus. Hist. Nat.* 13, 137–145, “Grigore Antipa”.
- Vitale, D.G.M., Brundo, M.V., Viscuso, R., 2011. Morphological and ultrastructural organization of the male genital apparatus of some Aphididae (Insecta, Homoptera). *Tissue Cell* 43, 271–282.
- Vitale, D.G., D’Urso, V., Viscuso, R., 2016. Morphostructural investigation on spermatozoa and sperm bundles of the leafhopper *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Hemiptera: Deltocephalinae). *Zoomorphology*. 135, 441–451.

4. Conclusões gerais

A ultraestrutura dos espermatozoides de *D. maidis* (Cicadellidae); *Collarea oleosa* e *Prepops zettertedti* (Miridae) demonstraram vários caracteres comuns aos Auchenorrhyncha e Heteroptera em geral. Entretanto, há outros caracteres que são compartilhados somente com as famílias à qual pertencem, e ainda, alguns caracteres foram exclusivos da espécie ou, possivelmente dos gêneros. Dessa forma, características derivadas da ultraestrutura dos espermatozoides constituem uma fonte de informações promissoras para estudos de sistemática dentro da ordem Hemiptera em geral bom como nas subordens Auchenorrhyncha e Heteroptera.