

SHAIENE MARIA DA SILVA

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS
ESPERMATOZOIDES DE DUAS ESPÉCIES DE MEMBRACIDAE (HEMIPTERA:
AUCHENORRHYNCHA)**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

Orientador: José Lino Neto

Coorientadora: Camila Folly Baptista

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586m
2022
Silva, Shaiene Maria da, 1993-
Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos
espermatozoides de duas espécies de Membracidae (Hemiptera:
Auchenorrhyncha) / Shaiene Maria da Silva. – Viçosa, MG,
2022.

1 dissertação eletrônica (35 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f. 30-35.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.595>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Membracidae - Espermatozoides. 2. Morfologia.
3. Microscopia. I. Lino Neto, José, 1959-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.754

SHAIENE MARIA DA SILVA

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS
ESPERMATOZOIDES DE DUAS ESPÉCIES DE MEMBRACIDAE (HEMIPTERA:
AUCHENORRHYNCHA)**

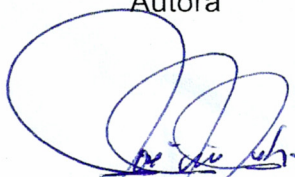
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de junho de 2022.

Assentimento:



Shaiene Maria da Silva
Autora



José Lino Neto
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Biologia Geral, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular por propiciarem a infraestrutura necessária para o desenvolvimento de minha pesquisa.

À Elizabeth Pena, secretária do Programa de Pós-Graduação e ao coordenador professor José Eduardo Serrão, pela ajuda com todas as questões burocráticas, competência e profissionalismo.

Aos professores do Programa de Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos durante as disciplinas.

Ao meu orientador professor José Lino Neto, pelo acolhimento, aprendizado, paciência e confiança.

Aos pesquisadores, Antonio José Creão-Duarte e a Luci Boa Nova Coelho, pela identificação das espécies.

Aos meus pais, Zilda e Edson, por todos os esforços, incentivos e amor! À minha irmã, Thamires, por todo apoio. Aos meus lindos sobrinhos, Vallentyne e Murilo, por todo amor e alegria.

Ao Bruno, meu companheiro e amigo, por todo amor, paciência, por acreditar em mim e por todo suporte nessa trajetória. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus amigos de laboratório, pelo companheirismo e momentos de descontração, principalmente a Glenda e ao Paulo, pelos ensinamentos e por todo suporte.

À técnica de laboratório, Maura Pinheiro, pelo auxílio e amizade.

À minha amiga e coorientadora, Camila Folly, pelos ensinamentos, amizade, confiança, pelos lindos desenhos e pelas horas dedicadas ao meu projeto.

Aos meus amigos, Daniel, Daniela e Isadora, pelo apoio, amizade e força.

À Natália, pelo profissionalismo e por me ensinar a me acolher e lidar com as emoções.

A todos os amigos, que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

SILVA, Shaiene Maria da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de duas espécies de Membracidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha)**. Orientador: José Lino Neto. Coorientadora: Camila Folly Baptista.

Dados da morfologia do sistema reprodutor e dos espermatozoides têm sido utilizados como fonte de caracteres para estudos taxonômicos e análises filogenéticas em inúmeros táxons auxiliando em questões da biologia reprodutiva e sistemática. Porém, em Membracidae, conhecidos popularmente como soldadinhos, esses estudos ainda são escassos. Desse modo, realizamos a descrição da morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de duas espécies de Membracidae, *Campylenchia latipes* (Membracini) e *Calloconophora argentipennis* (Aconophorini). Machos adultos foram dissecados e seus sistemas reprodutores processados sob técnicas de microscopia de luz. O sistema reprodutor masculino nas duas espécies segue um padrão geral observado em outros Auchenorrhyncha, contudo, diferem no número dos folículos testiculares, formato das vesículas seminais e posição das glândulas acessórias. *Cam. latipes*, tem oito folículos testiculares em cada testículo, vesículas seminais fusiformes e emparelhadas na base e glândulas acessórias que se abrem na porção posterior das vesículas seminais. Já *Cal. argentipennis*, tem 14 folículos testiculares em cada testículo, vesículas seminais ovais separadas e as glândulas acessórias se conectam a uma porção curta dos ductos deferentes pós-vesiculares. Em *Cam. latipes*, todos os espermatozoides nas vesículas seminais estavam em feixes, os quais se associavam ao epitélio vesicular pela região das cabeças espermáticas. Para essa espécie, foi descrita a formação dos ductos ejaculatórios laterais e ducto ejaculatório comum. Nas duas espécies, a histologia indica que o modo de liberação das secreções das células epiteliais para o lúmen, nas diferentes porções das glândulas acessórias, ocorre por mais de um tipo de via. Os espermatozoides de *Cam. latipes* e *Cal. argentipennis* mediram 226 µm e 102 µm de comprimento, respectivamente. A porção final flagelar se ramifica em filamentos, os quais mediram 77 µm em *Cam. latipes* e 1,9 µm em *Cal. argentipennis*, característica encontrada até agora em Cicadellidae e Membracidae. Com base nessas considerações, a caracterização morfológica do sistema reprodutor masculino e dos

espermatozoides das espécies deste estudo podem contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva e a sistemática da família, bem como para os Auchenorrhyncha em geral.

Palavras-chave: Caracterização morfológica. Membracídeos. Microscopia.

ABSTRACT

SILVA, Shaiene Maria da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Morphology of the male reproductive system and sperm of two species of Membracidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha)**. Adviser: José Lino Neto. Co-adviser: Camila Folly Baptista.

Morphology data on the reproductive system and sperm have been used as a source of characters for taxonomic studies and phylogenetic analyzes in several taxa, supporting in reproductive and systematic biology issues. However, in Membracidae, popularly known as treehoppers or thorn bugs, these studies are still scarce. Thus, we performed a description of the morphology on the male reproductive system and sperm of two species of Membracidae, *Campylenchia latipes* (Membracini) and *Calloconophora argentipennis* (Aconophorini). Adult males were dissected and their reproductive systems treated under light microscopy. The male reproductive system in both species follows a general pattern observed in other Auchenorrhyncha, however, they differ in number of testicular follicles, shape of the seminal vesicles and the position of the accessory glands. *Cam. latipes*, has eight testicular follicles, fusiform and paired with the seminal vesicles at the base and accessory glands that open in the posterior region of the seminal vesicles. Already *Cal. argentipennis*, has 14 testicular follicles, separated oval seminal vesicles and accessory glands connected to a short region of the post-vesicular "vas deferens". In *Cam. latipes*, all spermatozoa in the seminal vesicles were in bundles, which were associated with the vesicular epithelium by the sperm heads region. For this species, the formation of lateral ejaculatory ducts and common ejaculatory duct was described. In both species, histology indicates that the release of secretions mode from epithelial cells to the lumen, in different parts of the accessory glands, occurs by more than one pathway type. The sperm of *Cam. latipes* and *Cal. argentipennis* measured 226 μm and 102 μm in length, respectively. The final flagellar portion branches into filaments, which measured 77 μm in *Cam. latipes* and 1.9 μm in *Cal. argentipennis*, a characteristic found so far in Cicadellidae and Membracidae. Based on those considerations, the morphological characterization of the male reproductive system and sperm of the above-mentioned species in this study may contribute to the knowledge of reproductive biology and systematics of the family, as well as to Auchenorrhyncha.

Keywords: Morphological characterization. Treehoppers. Microscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Ordem Hemiptera.....	9
1.2. Subordem Auchenorrhyncha.....	9
1.3. Membracidae	10
1.4. Sistema Reprodutor Masculino e espermatozoides em Auchenorrhyncha	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Insetos.....	14
4.2. Microscopia de Luz.....	14
5. RESULTADOS	15
5.1. Anatomia do Sistema Reprodutor Masculino	15
5.2. Histologia do Sistema Reprodutor Masculino	17
5.2.1. <i>Campylenchia latipes</i>	17
5.2.2. <i>Calloconophora argentipennis</i>	22
5.3. Estrutura e Morfometria dos espermatozoides.....	24
6. DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ordem Hemiptera

Os Hemiptera são os únicos insetos hemimetábolos dentre as cinco maiores ordens de insetos (Hodkinson e Parnell, 2007; Rafael et al., 2012). São reconhecidas mais de 97.000 espécies (Li et al., 2017; Bartlett et al., 2018), cuja distribuição global pode ser atribuída a algumas adaptações como: especialidade do aparelho bucal e estratégias reprodutivas que os propiciaram a exploração de diversos habitats e fontes de alimentos (Gillott, 2005; Rafael et al., 2012; Li et al., 2017; Munhoz et al., 2020). Além disso, os hemípteros variam em tamanho, formato do corpo, ciclo de vida e hábitos alimentares (Gillott, 2005; Rafael et al., 2012). Eles são classificados em quatro subordens: Sternorrhyncha, Coleorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera (Cryan e Urban, 2012; Rafael et al., 2012).

1.2. Subordem Auchenorrhyncha

Os Auchenorrhyncha são a segunda subordem mais representativa de Hemiptera, com mais de 43.000 espécies descritas (Bartlett et al., 2018). Dentre seus representantes estão os hemípteros popularmente conhecidos como cigarras, cigarrinhas e soldadinhos (Mao et al., 2017). Eles são terrestres, predominantemente fitófagos e abundantes na região tropical (Rafael et al., 2012, Vitale et al., 2015; Li et al., 2017). Os Auchenorrhyncha são um grupo bastante diverso e com importância econômica, visto que muitas espécies são consideradas pragas agrícolas que, além de causarem danos diretos às plantas das quais se alimentam, são vetores de patógenos causando doenças graves às plantações (Dietrich, 2005; Cryan e Urban, 2012; Vitale et al., 2015, 2016; Zhang et al., 2016). Esta subordem está dividida em duas infraordens: Fulgoromorpha – com 21 famílias em apenas uma superfamília, Fulgoroidea, e Cicadomorpha – com 12 famílias distribuídas nas superfamílias Cercopoidea, Cicadoidea e Membracoidea – (Cryan e Urban, 2012; Song et al., 2017; Bartlett et al., 2018).

As relações filogenéticas de Auchenorrhyncha não são claras e ainda existem discussões a respeito do monofiletismo do grupo. Alguns estudos com base em dados moleculares e morfológicos têm proposto que essa subordem constitui um grupo

natural (p.ex., Cryan e Urban, 2012), enquanto outros suportam sua parafilia, apontando uma relação próxima entre Fulgoromorpha com Heteroptera e Cicadomorpha com Sternorrhyncha (Hamilton, 1981; Goodchild, 1996).

Dentro dessa subordem, os Cicadomorpha apresentam aproximadamente 35.000 espécies descritas distribuídas nas 12 famílias, cinco destas em Cercopoidea (Cercopidae, Aphrophoridae, Clastopteridae, Machaerotidae e Epiygidae), duas em Cicadoidea (Cicadidae e Tettigarctidae) e cinco em Membracoidea (Cicadellidae, Membracidae, Aetalionidae, Melizoderidae e Myerslopiidae) (Cryan, 2005; Dietrich, 2005; Cryan e Urban, 2012; Song et al., 2017).

Os Membracoidea apresentam aproximadamente 3.000 gêneros e 25.000 espécies descritas (Cryan, 2005; Bartlett et al., 2018). Eles são a superfamília mais estudada, principalmente em termos de taxonomia e comportamento (Rafael et al., 2012). Se alimentam de fluidos vegetais, a partir do xilema, floema ou mesófilo, através do aparelho bucal perfurante e sugador, diferente de Cercopoidea e Cicadoidea, que se alimentam preferencialmente da seiva do xilema. Além disso, podem exibir comportamento de cuidado maternal e interações mutualísticas com formigas (Dietrich et al., 2017).

A relação de Membracoidea como grupo-irmão de Cicadoidea + Cercopoidea dentro de Cicadomorpha é bem apoiada por dados moleculares (Cryan, 2005; Cryan e Urban, 2012; Dietrich et al., 2017; Song et al., 2017) e morfológicos (Dmitriev, 2010). Porém, as relações filogenéticas dentro de Membracoidea não estão bem estabelecidas, há estudos sugerindo que Myerslopiidae é irmã dos demais Membracoidea e que Cicadellidae é parafilético em relação Aetalionidae, Melizoderidae e Membracidae (Dietrich et al. 2001b; Cryan, 2005; Dietrich et al., 2017). Apoiando essa parafilia, Song et al. (2017), utilizando dados moleculares, exibiram um cladograma no qual Cicadellidae forma dois ramos separados por Membracidae e Aetalionidae.

1.3. Membracidae

Membracidae é a segunda maior família de Membracoidea, atrás apenas de Cicadellidae (Dietrich et al., 2001a, 2017). Ela apresenta cerca de 441 gêneros e 3.500 espécies descritas, distribuídas em nove subfamílias: Centronodinae Deitz, 1975; Centrotinae Amyot e Serville, 1843; Darninae Amyot e Serville, 1843; Endoiastinae

Deitz e Dietrich, 1993; Heteronotinae Goding, 1926; Membracinae Rafinesque, 1815; Nicomiinae Haupt, 1929; Smiliinae Stål, 1866 e Stegaspidinae Haupt, 1929 (Deitz e Wallace, 2010; Creão-Duarte et al., 2012; Bartlett et al., 2018; Lin et al., 2019).

Os membracídeos são insetos de pequeno porte, com até 1cm de comprimento (Lin et al., 2019), conhecidos popularmente como soldadinhos (Rafael et al., 2012), e que exibem características morfológicas peculiares, tanto em ninfas quanto em adultos (Dietrich, 2001b). Os adultos geralmente possuem um pronoto bem desenvolvido e projetado, na maioria dos gêneros, sobre o dorso do corpo, assumindo uma variedade de formas e coloração (Wood 1993; Creão-Duarte et al., 2017; Peruzzo et al., 2017; Bartlett et al., 2018). Esse caráter morfológico é o mais importante para diferenciação da família (Dietrich et al., 2017). Além dessas características, eles apresentam ampla diversidade comportamentos sociais variando de indivíduos solitários, gregários e subsociais, com cuidado maternal dos ovos e das ninfas e com interações mutualísticas com himenópteros. Dentre essas interações, destaca-se as com formigas, em que estas se alimentam de *honeydew* – substância açucarada excretada pelos membracídeos – e, em troca, fornecem proteção contra predação (Wood, 1993; Lin, 2006; Peruzzo et al., 2017; Lin et al., 2019). Além disso, podem se comunicar por vibração do substrato, para atração de parceiros sexuais, alerta de predadores ou para recrutamento para um novo local de alimentação (Cocroft e Rodríguez, 2005; Bartlett et al., 2018). Outra peculiaridade que pode ser observada em ninfas e adultos de Membracidae é a coloração aposemática (presente em táxons subsociais e agregacionais) ou críptica (nos solitários) (Lin, 2006).

Os membracídeos são considerados um grupo indicador para o monitoramento da biodiversidade e uso sustentável dos ecossistemas devido as relações mutualísticas com outros insetos e por possuírem certo grau de especificidade sobre as plantas que os hospedam, totalizando uma interação com mais de 100 famílias botânicas (Brown Jr., 1997; Deitz e Wallace, 2010).

A taxonomia dos Membracidae é bem estudada e sua monofilia é suportada com base em dados morfológicos das ninfas, genitália dos machos e da venação alar (Dietrich et al., 2001a) e através de dados moleculares (Cryan et al., 2000).

Membracinae é a terceira maior subfamília de membracídeos, composta por cinco tribos (Aconophorini Goding, 1892, Hoplophorionini Goding, 1926, Hypsoprporini Haupt, 1929; Membracini Rafinesque, 1815; Talipedini Deitz, 1975),

aproximadamente 38 gêneros e 523 espécies descritas (Lin, 2006; Bartlett et al., 2018). Tem distribuição predominantemente Neotropical (Lin et al., 2004, 2006).

A tribo Membracini (Membracidae: Membracinae) é composta de espécies solitárias (Bartlett et al., 2018), subsociais, gregárias (Lin, 2006; Flórez-V et al., 2015). Apresenta 17 gêneros e aproximadamente 200 espécies descritas (Sakakibara e Evangelista, 2010), dentre elas, *Campylenchia latipes* Stål, 1869. Adultos do gênero apresentam coloração que variam de marrom claro a escuro ou preto (Lin, 2006), com pronoto em forma de chifre de ápice levemente pontiagudo e as ninfas de branco a castanho claro (últimos instares) com especializações que se assemelham a espinhos no dorso do corpo (observação pessoal em *Camp. latipes*). As fêmeas depositam suas massas de ovos em caules de plantas herbáceas e as cobrem com uma secreção semelhante a cera e exibem cuidado maternal dos ovos (Bartlett, et al., 2018), além de apresentarem interações com formigas.

A tribo Aconophorini (Membracidae: Membracinae) abriga os gêneros *Aconophora*, *Guayaquila* e *Calloconophora*, neste último *Calloconophora argentipennis* Dietrich, 1991 está incluída. Apresenta espécies consideradas subsociais, com cuidado maternal de ovos e ninfas, e as ninfas permanecem agregadas por períodos variados de tempo. Os ovos são depositados na superfície da planta e cobertos por secreção semelhante a cera (Wood, 1993; Lin, 2006; Flórez-V et al., 2015; Bartlett et al., 2018). Algumas espécies exibem mutualismo com himenópteros (Flórez-V et al., 2015). As ninfas apresentam coloração apostemática vermelha e preta, com listras longitudinais brancas (Lin, 2006). A espécie citada acima apresenta projeções que se assemelham a espinhos no dorso do corpo e pronoto com projeção de aspecto peculiar, enquanto os adultos são de tonalidade castanho escuro e pronoto em forma de chifre de ápice arredondado (observação pessoal). Além do Brasil, há registros de *Calloconophora* na Argentina, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Suriname e Venezuela (Flórez-V et al., 2015).

1.4. Sistema Reprodutor Masculino e espermatozoides em Auchenorrhyncha

Nos insetos em geral, o sistema reprodutor é formado por um par de testículos, um par de ductos deferentes, um par de vesículas seminais, um ou mais pares de glândulas acessórias e um ducto ejaculatório (Chapman, 2013). No entanto,

entre os táxons podem ocorrer variações no tamanho, posição, forma e número dessas estruturas, além de características da espermatogênese e o número de espermatozoides por cisto (Chapman, 2013; Vitale et al. 2015; Zhang et al., 2016).

Os espermatozoides são células altamente especializadas e bastante diversificadas (Jamieson et al., 1999) que, em insetos, podem variar tanto na organização ultraestrutural quanto no tamanho e formato, sendo geralmente longos e filiformes (Phillips, 1970). Por essas diferenças, e pelo fato de sua morfologia ser pouco susceptível a variações ambientais, os espermatozoides podem ser considerados espécie específico (Phillips, 1974). Em insetos, os espermatozoides são constituídos por uma região anterior, na qual, usualmente é possível diferenciar o acrossomo e núcleo; além de uma região flagelar contendo em geral o axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Entre essas duas regiões é possível, para a maioria dos insetos, observar um material denso chamado de adjunto do centríolo (Dallai et al., 2016). Em algumas espécies de Membracoidea, especificamente nas famílias Cicadellidae e Membracidae, tem sido observado que os espermatozoides exibem uma característica única, a existência de ramos na extremidade posterior do flagelo, conhecidos como filamentos do flagelo (Phillips, 1969; Vitale et al., 2016; Barcellos et al., 2018).

Dados morfológicos do sistema reprodutor e dos espermatozoides tem sido utilizados como fonte de caracteres para análises taxonômicas e filogenéticas, em inúmeros grupos animais, incluindo em insetos, auxiliando em questões da biologia reprodutiva e sistemática dos grupos (Tsai e Perrier 1996; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto e Dolder, 2001; Dallai, 2014; Dallai et al., 2016).

Na subordem Auchenorrhyncha, a maior parte dos estudos sobre a morfologia dos espermatozoides foram feitos nas famílias Cicadellidae (Cruz-Landim e Kitajima, 1972; Zhang e Dai, 2012; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; Barcellos et al., 2018), Aetalionidae (Araújo et al., 2010), Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006 e 2007; Cui e Wei, 2018), Cercopidae (Hodgson et al., 2016) e Ricaniidae (Jiang e Quin, 2018; Jiang et al., 2019). Enquanto os estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino na subordem são mais escassos, concentrados em algumas famílias, por exemplo, Cicadellidae (Gil-Fernandez e Black, 1965; Bednarczyk, 1993; Tsai e Perrier, 1996; Hayashi e Kamimura, 2002; Vitale et al., 2015; Zhang et al., 2016), Aetalionidae (Araújo et al., 2020) e Achilidae (D'Urso et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos trabalhos que abordam filogenia e taxonomia em Membracidae, estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides são escassos ou incompletos. Deste modo, este é o primeiro estudo mais detalhado sobre a caracterização morfológica do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides neste táxon. Tais estudos fornecem dados, que poderão contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva, dos estudos sobre espermatozoides, bem como para sistemática da família e de Auchenorrhyncha como um todo.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é descrever a morfologia do sistema reprodutor masculino e a estrutura dos espermatozoides de duas espécies de Membracidae, *Campylenchia latipes* (Membracini) e *Calloconophora argentipennis* (Aconophorini).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Insetos

Machos adultos de *Campylenchia latipes* foram obtidos em plantas da família Magnoliaceae, e *Calloconophora argentipennis* em Anacardiaceae, ambas coletadas no campus da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa (20° 45' 17" S, 42° 52' 57" O), Minas Gerais, Brasil, no período entre 2019 e 2021.

4.2. Microscopia de Luz

Para a descrição da morfologia do sistema reprodutor masculino (SRM) das duas espécies, cinco machos (dois de *Cam. latipes* e três de *Cal. argentipennis*) foram dissecados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (PBS) e fixados por 24 h em glutaraldeído 2,5% no mesmo tampão. Em seguida, os SRM foram lavados por 1 h, também em PBS, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 h, lavados novamente e desidratados em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Por fim, foram infiltrados e os órgãos emblocados separadamente em historesina (Leica

Historesin). Cortes semifinos de 0,5 a 1,0 μm foram obtidos com um micrótomo automático Leica RM 2255 com navalhas de vidro. Estes cortes foram montados em lâminas histológicas, corados com solução filtrada de Giemsa 1:15 em água destilada por 30 minutos.

Para as medidas totais dos espermatozoides e de suas respectivas regiões, as vesículas seminais de três dos cinco indivíduos (um de *Cam. latipes* e dois de *Cal. argentipennis*), dissecados foram imediatamente transferidas para lâminas histológicas onde os espermatozoides foram espalhados e fixados com solução de paraformaldeído 4%, no tampão fosfato, por 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e secas à temperatura ambiente e, então, coradas com Giemsa por 15 min, lavadas novamente em água corrente e secas à temperatura ambiente. Para medir o comprimento dos núcleos, algumas lâminas foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ em PBS) por 30 minutos, lavadas em água corrente e montadas com lamínulas usando sacarose a 50%.

As imagens dos sistemas reprodutores e espermatozoides foram obtidas em um microscópio Olympus BX-60 com uma câmera digital Q-Color3 acoplada. As lâminas coradas com DAPI foram examinadas com o mesmo microscópio, equipado com filtro excitação BP 360-370 nm. As imagens histológicas do SRM foram capturadas com a objetiva de 40x ou 100x e montadas em imagens panorâmicas usando o comando *Photomerge* do software Adobe Photoshop. As análises morfométricas foram obtidas através do software *Image-J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) a partir de 30 espermatozoides para cada espécie.

5. RESULTADOS

5.1. Anatomia do Sistema Reprodutor Masculino

Em *Campylenchia latipes* o sistema reprodutor masculino consiste de um par de testículos, dois ductos deferentes que se dilatam formando as respectivas vesículas seminais, um par de glândulas acessórias, dois ductos ejaculatórios laterais que desembocam em um ducto ejaculatório comum (Fig. 1A). Os testículos são simétricos, formados cada um por oito folículos testiculares elipsoides individualizados. Os ductos eferentes, na base de cada folículo, se conectam a uma

porção mais anterior do respectivo ducto deferente. Estes são, anteriormente, longos e delgados, mas logo se dilatam, formando vesículas seminais fusiformes e emparelhadas na base, onde os espermatozoides ficam armazenados até a cópula. As glândulas acessórias são tubulares: anteriormente, sinuosas e calibrosas, com uma porção mediana mais delgada e linear e, posteriormente, se tornam levemente dilatadas (Fig. 1A). Elas se conectam a região posterior das vesículas seminais, formando os ductos ejaculatórios laterais que, em seguida, desembocam de ambos os lados em uma região discretamente alargada do ducto ejaculatório comum, seguido pelo edeago.

Em *Calloconophora argentipennis*, o sistema reprodutor masculino consiste de um par de testículos, dois ductos deferentes (pré-vesiculares e pós-vesiculares), um par de vesículas seminais, um par de glândulas acessórias, dois ductos ejaculatórios laterais, um bulbo ejaculatório (Fig. 1B). Cada testículo é formado por 14 folículos elipsoides individualizados, opacos e amarelados. Os ductos deferentes pré-vesiculares são estreitos e curtos, as vesículas seminais são ovais e densas, totalmente separadas uma da outra. As glândulas acessórias são estruturas tubulares longas, anteriormente sinuosas e levemente dilatada, com uma porção mediana calibrosa e, posteriormente, se torna levemente dilatada e linear. Elas se conectam a uma porção curta dos ductos deferentes pós-vesiculares, formando os ductos ejaculatórios laterais. Esses, desembocam em um bulbo ejaculatório (Fig. 1B), seguido pelo ducto ejaculatório comum e, então, o edeago.

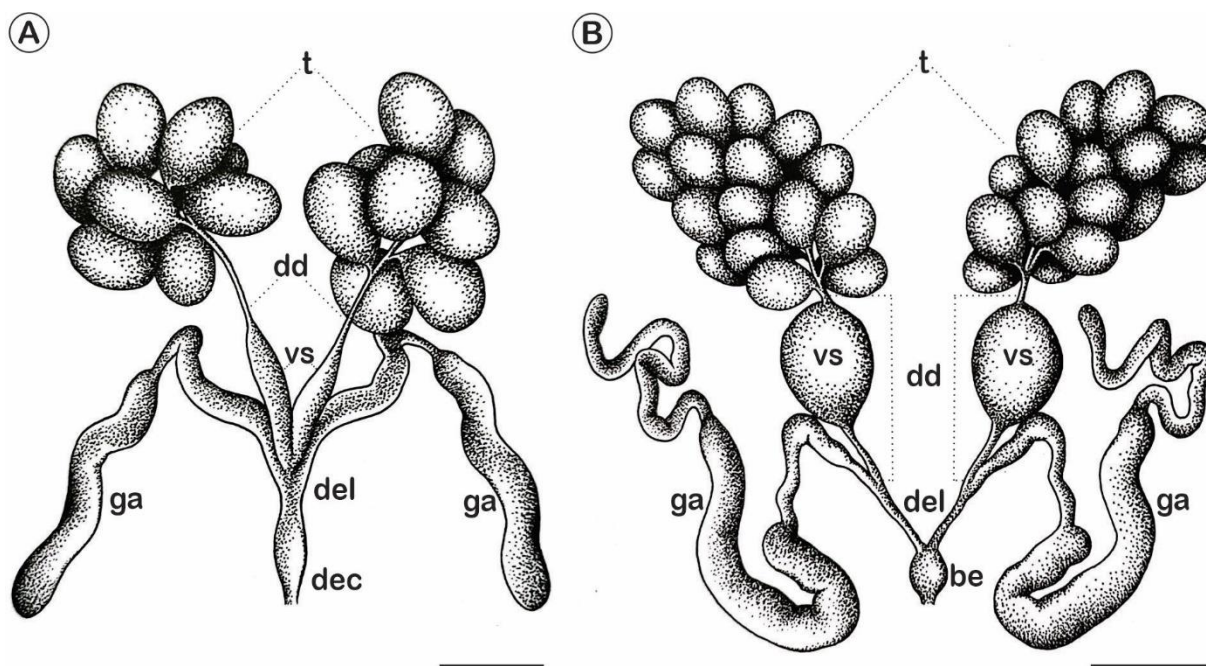


Figura 1 – Desenhos esquemáticos dos sistemas reprodutores masculinos de *Campylenchia latipes* (A) e *Calloconophora argentipennis* (B). Testículos (t), ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs), glândulas acessórias (ga), ductos ejacutórios laterais (del), ducto ejacutório comum (dec), bulbo ejacutório (be). Barra: A, B = 0,5 mm. Desenho esquemático: Camila Folly Baptista.

5.2. Histologia do Sistema Reprodutor Masculino

5.2.1. *Campylenchia latipes*

Cada folículo testicular é preenchido de cistos com células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 2A). A organização dos cistos se dá de forma sequencial do ápice para a base do folículo, de modo que os cistos em estágios iniciais de diferenciação, zona de crescimento (c1), se encontram na porção apical do folículo, e aqueles em estágios mais avançados de diferenciação, zona de maturação e redução (c2) e zona de transformação (c3), se encontram mais próximo da região basal do folículo (Fig. 2A). Durante a espermiogênese, as espermatídes estão orientadas nos cistos com as cabeças voltadas para região do epitélio folicular à medida que se alongam e reduzem seu citoplasma. Durante esse processo, ocorre o

deslocamento dos cistos ao longo do folículo em direção ao ducto eferente e, ao final, os cistos se rompem e os espermatozoides são liberados ainda em feixes. Em seguida, são armazenados nas vesículas seminais até a cópula. Os ductos deferentes são constituídos por um epitélio simples cúbico, suas células possuem núcleos esféricos com regiões de heterocromatina e no citoplasma vesículas irregulares e claras. Seu lúmen é preenchido por espermatozoides agrupados em pequenos feixes (Fig. 2B).

As vesículas seminais também são formadas por apenas uma camada de células epiteliais cúbicas com núcleos esféricos e com porções de heterocromatina e, no citoplasma, presença de vesículas secretoras (Fig. 2C). Uma membrana basal separa o epitélio de uma bainha conjuntiva, que circunda individualmente as duas vesículas emparelhadas (Fig. 2C). Os espermatozoides são encontrados em pequenos feixes, com as cabeças inseridas no epitélio vesicular (Fig. 2C e C').

As glândulas acessórias possuem epitélio simples, formado por células colunares (Fig. 2D e E). Na porção anterior das glândulas (Fig. 2D), as células são altas com núcleos volumosos, basais e com cromatina descondensada. Nessas células é possível observar muitos grânulos e vesículas secretoras de diferentes tamanhos preenchendo quase todo o citoplasma. Na região apical celular é possível observar o acúmulo de secreção a ser liberada para o lúmen (Fig. 2D). Na porção posterior das glândulas acessórias (Fig. 2E), as células epiteliais possuem núcleos volumosos e com porções heterocromáticas. A região apical das células varia de levemente arredondado a irregular, e no citoplasma é possível observar grânulos e vesículas secretoras de diferentes tamanhos. No lúmen é possível observar dois tipos de secreções: uma homogênea e clara com aspecto semelhante àquela das vesículas nas células epiteliais, e outra com formato bem definido, que parece ser liberada junto com porções da região apical das células epiteliais (Fig. 2E).

Na região posterior da vesícula, em corte transversal, é possível identificar quatro estruturas (ver Fig. 3A): as duas externas correspondem aos ductos das glândulas acessórias, e as duas internas às vesículas seminais. Os ductos das glândulas acessórias correm em paralelo com a porção posterior das vesículas seminais até se juntarem (Fig. 3A-C). Nessa região, cortes transversais mostram dois túbulos, cada um formado pela junção dos ductos de uma glândula acessória e de uma vesícula seminal, formando assim os ductos ejaculatórios laterais (Fig. 3D e E) que recebem secreções das duas estruturas. Esses dois ductos ejaculatórios juntos

são envolvidos por uma espessa camada muscular (Fig. 3D). Possuem epitélio simples colunar com núcleos volumosos, além de poucas vesículas secretoras em seu citoplasma. Em seguida, os ductos ejacutórios laterais diminuem de diâmetro e a camada muscular se espessa, então eles desembocam lateralmente na porção anterior do ducto ejacutório comum, o qual possui um epitélio colunar com núcleos volumosos e basais (Fig. 3E-G).

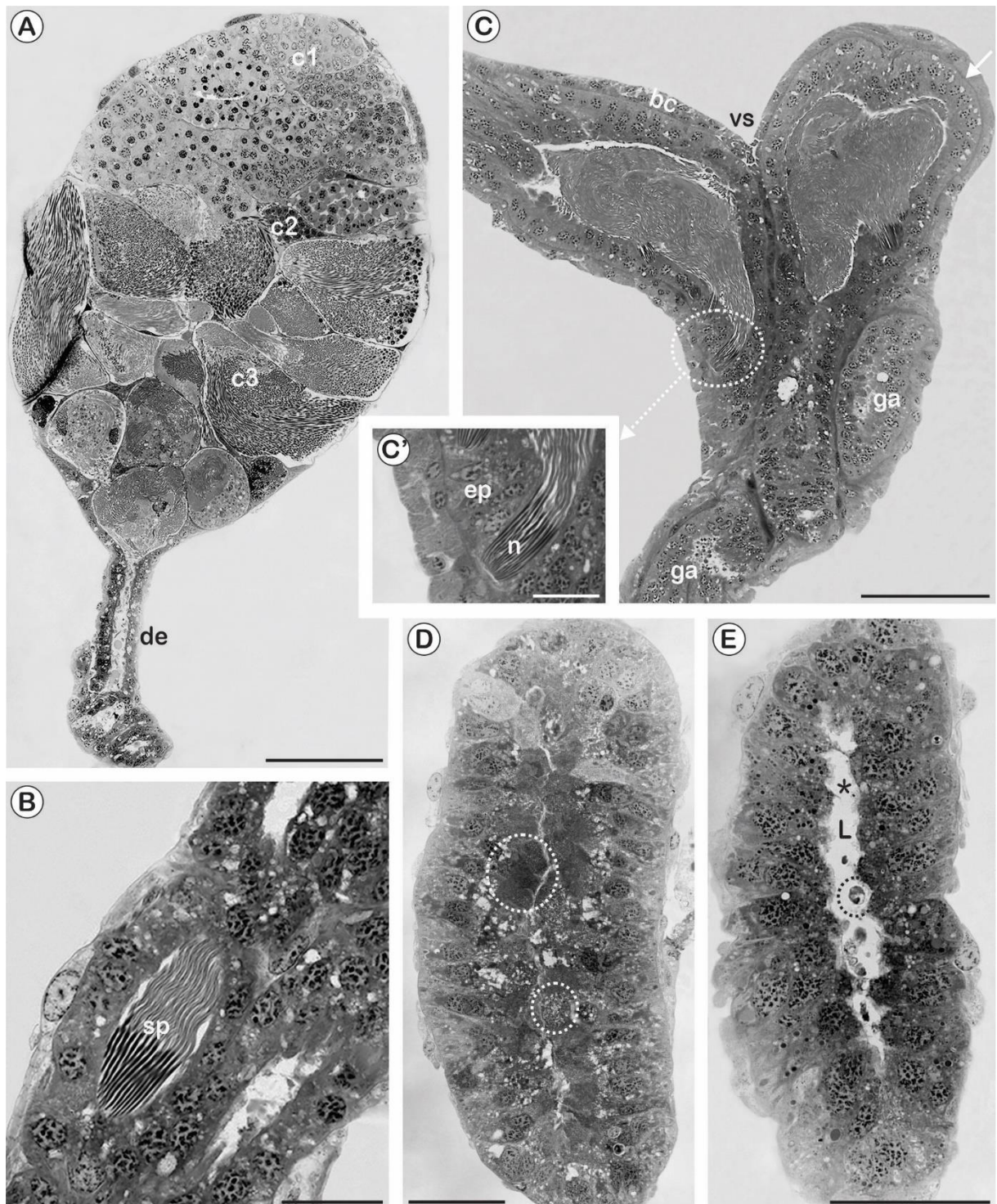


Figura 2 – Histologia do sistema reprodutor masculino de *Campylenchia latipes*. A- Folículo testicular totalmente preenchido por cistos nas diferentes fases da espermatogênese (c1, c2 e c3) e ducto eferente (de). B- Detalhe do ducto deferente mostrando que os espermatozoides estão em feixe (sp). C- Vesículas seminais (vs) preenchidas por espermatozoides em feixes. Membrana basal (seta); bainha conjuntiva (bc); glândulas acessórias (ga). C'- Detalhe da vesícula seminal mostrando um feixe de espermatozoides com os núcleos (n) inseridos no epitélio (ep). D- Porção anterior da glândula acessória mostrando muitos grânulos e vesículas secretoras no citoplasma das células epiteliais. Na região apical celular é possível observar o acúmulo de secreção a ser liberada para o lúmen (círculo pontilhado branco). E- Porção posterior da glândula acessória mostrando dois tipos de secreções (* e círculo pontilhado preto) no lúmen (L). Barras: A, C = 100 μm ; B, C' = 20 μm , D, E = 50 μm .

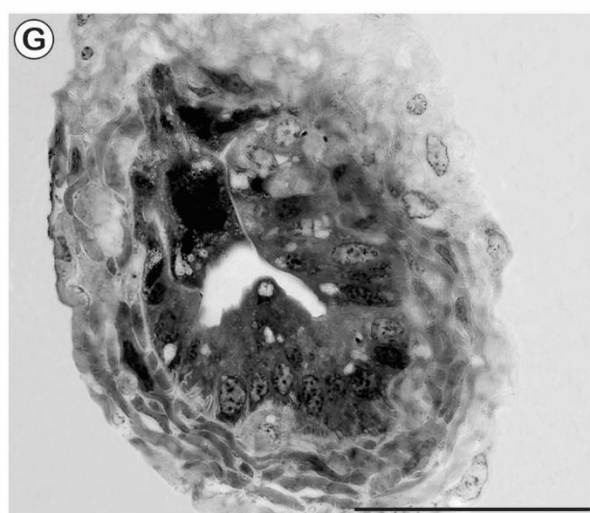
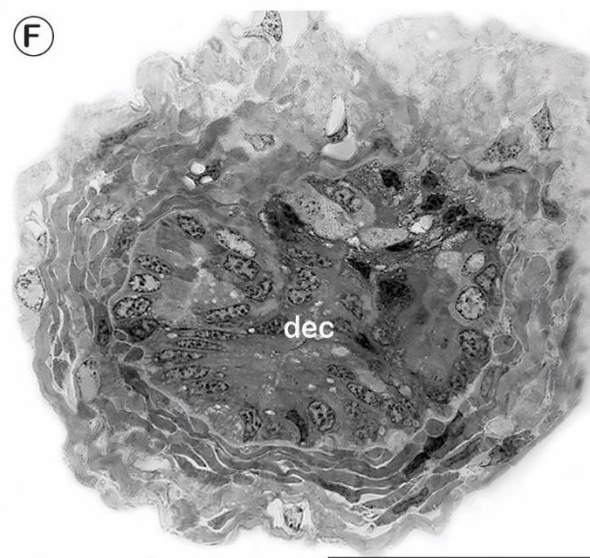
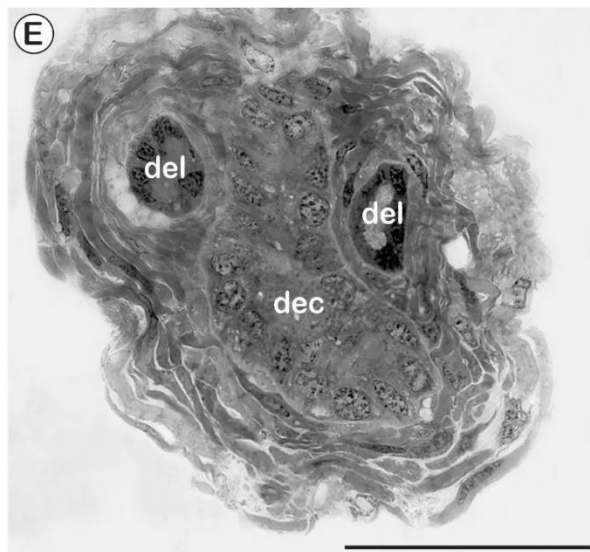
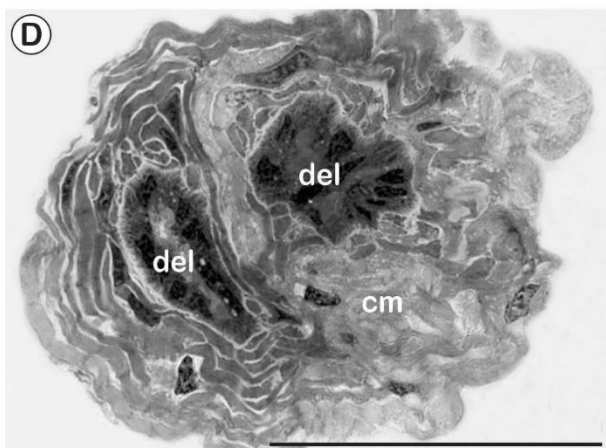
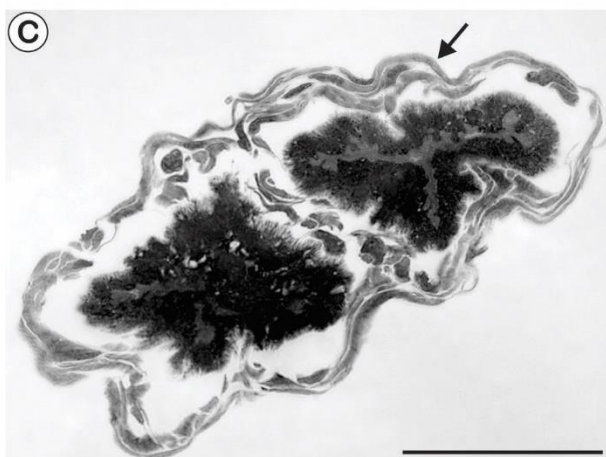
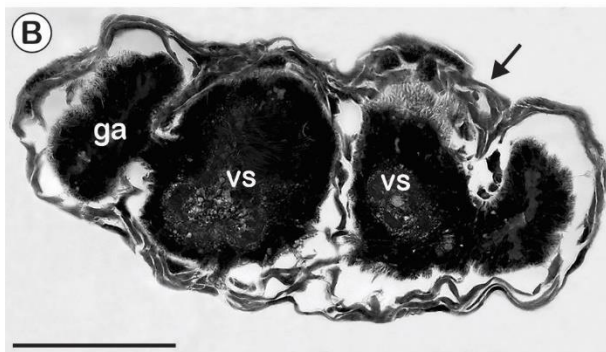
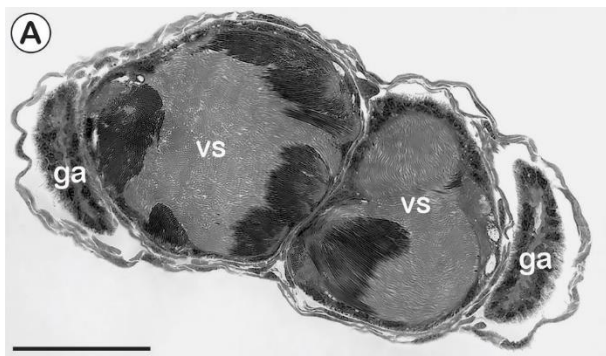


Figura 3 – Formação dos ductos ejacutórios laterais e comum em *Campylenchia latipes*. A- Corte transversal da região posterior das vesículas seminais evidenciando quatro estruturas, duas externas referentes aos ductos das glândulas acessórias (ga) e duas internas, as vesículas seminais (vs). B e C- Fusão dos ductos das glândulas acessórias (ga) e das vesículas seminais (vs). Bainha conjuntiva (seta). D- Corte transversal dos ductos ejacutórios laterais (del) em nível mais posterior quando os mesmos já estão envolvidos por uma espessa camada muscular (cm). E- Início da fusão dos ductos ejacutórios laterais (del) ao ducto ejacutório comum (dec) e F- Ductos ejacutórios laterais (del) desembocando no ducto ejacutório comum (dec). G- Ducto ejacutório comum. Barras: 50 µm.

5.2.2. *Calloconophora argentipennis*

Os folículos são preenchidos por cistos nas diferentes fases da espermatogênese e, dentro dos cistos, os núcleos das espermátides em alongamento estão orientados para a periferia do folículo (Fig. 4A). A distribuição dos cistos é bastante ordenada, de modo que aqueles nas fases iniciais da espermatogênese são encontrados no ápice e os mais adiantados estão na base dos folículos (Fig. 4A).

Os ductos deferentes pré-vesiculares são constituídos por epitélio simples, formado por células colunares com núcleos bem volumosos e cromatina descondensada e, no citoplasma, estão presentes vesículas secretoras (Fig. 4B). No lúmen são observados feixes de espermatozoides (Fig. 4B). As vesículas seminais possuem epitélio simples com células pavimentosas de núcleos achatados (Fig. 4C e C') e são circundadas por uma bainha conjuntiva. No lúmen os espermatozoides estão em feixes, alguns dos quais se associam ao epitélio pela região de cabeça dos espermatozoides.

As glândulas acessórias possuem epitélio simples, formado por células colunares (Fig. 4D e E). Sua porção anterior exhibe células bem mais altas de, pelo menos, dois tipos. Os núcleos são mais alongados com cromatina descondensada e, no citoplasma, há pequenas vesículas secretoras. Vesículas secretoras também foram observadas no lúmen, além de muitas células epiteliais com sinais de degeneração (Fig. 4D). Na porção mediana, o epitélio se apoia em uma membrana basal envolta por uma camada muscular espessa (Fig. 4E). Nessa região, as células epiteliais são altas, com ápice mais arredondado projetando-se para o lúmen estreito,

com secreção de aspecto granuloso. Os núcleos volumosos estão em posição mediana a basal e apresentam cromatina descondensada. No citoplasma, são observados grânulos e poucas vesículas secretoras.

O bulbo ejaculatório é envolvido por uma camada muscular e por um epitélio simples formado por células colunares de núcleo com cromatina descondensada e, no citoplasma, vesículas claras, principalmente na região apical. O lúmen é preenchido por espermatozoides em feixe geralmente associados ao epitélio (Fig. 4F).

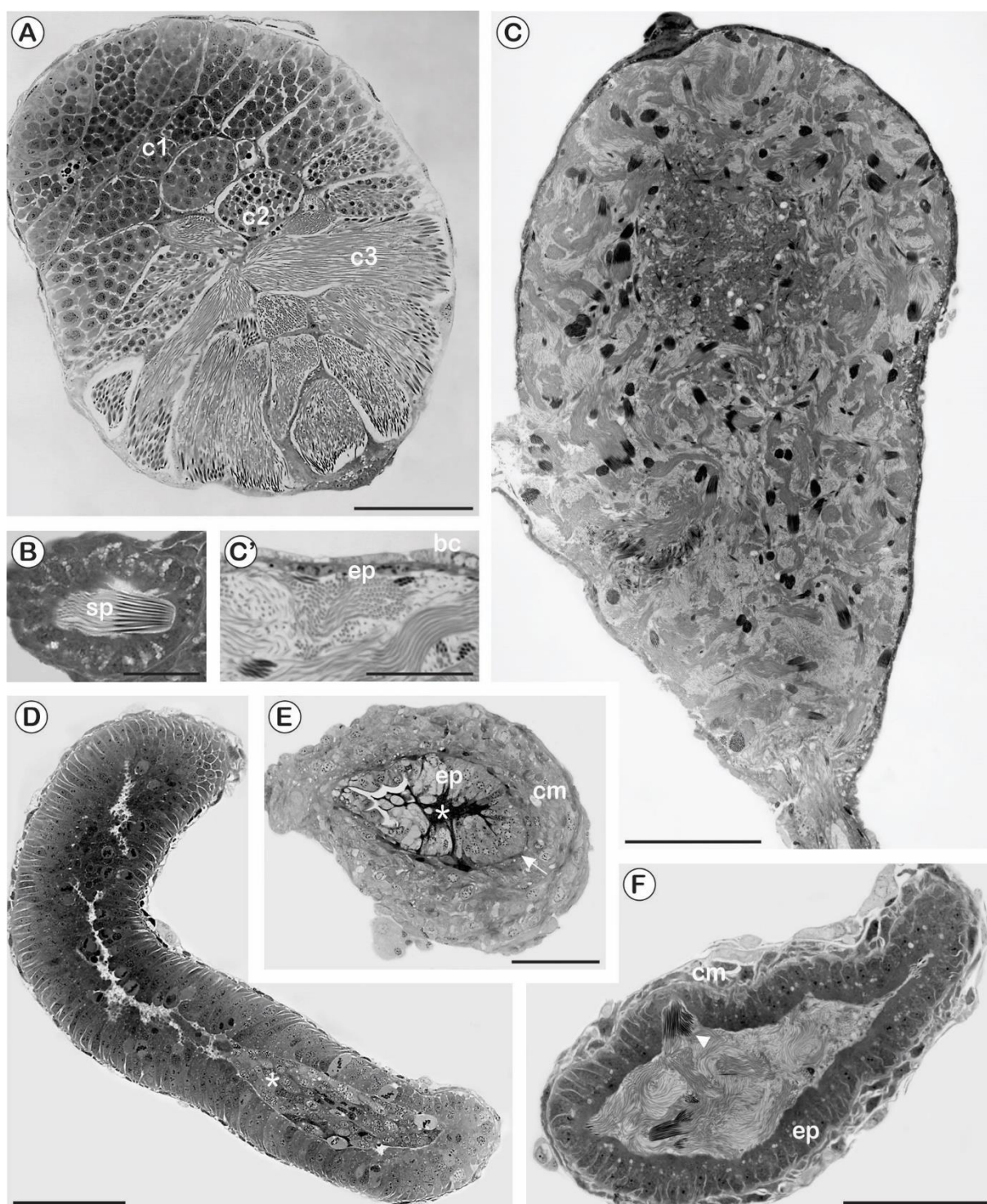


Figura 4 – Histologia do sistema reprodutor masculino de *Calloconophora argentipennis*. A- Corte longitudinal de um folículo testicular exibindo cistos em diferentes estágios da espermatogênese (c1, c2 e c3). B- Ducto deferente pré-vesicular mostrando um feixe de espermatozoides (sp). C- Vesícula seminal preenchida por espermatozoides. C'- Detalhe do epitélio vesicular (ep) composto por células pavimentosas. Bainha conjuntiva (bc). D- Porção anterior de uma glândula acessória com presença de células epiteliais no lúmen aparentando degeneração (*). E- Porção mediana da glândula acessória exibindo epitélio colunar (ep), membrana basal (seta), camada muscular espessa (cm) e lúmen com secreção de aspecto granuloso (*). F- Bulbo ejaculatório envolvido por uma camada muscular (cm) e epitélio colunar (ep). Observe o lúmen preenchido por espermatozoides em feixes, muitos dos quais associados ao epitélio (cabeça da seta). Barras: A, C-E, G = 100 μm ; B, C' = 20 μm .

5.3. Estrutura e Morfometria dos espermatozoides

Os espermatozoides nas vesículas seminais de ambas espécies formam feixes unidos pela região das cabeças por uma matriz extracelular amorfa, formando espermatodesmata. Nestas células duas regiões são facilmente distinguíveis: a região da cabeça, na qual também é possível reconhecer o acrossomo e o núcleo, e a região flagelar, que se ramifica em sua porção final em quatro ou, menos comum, cinco filamentos (Fig. 5A e B). Em *Cam. latipes*, os espermatozoides mediram 226,4 μm de comprimento. O núcleo também é delgado e longo, com 20,4 μm , e afila gradativamente, a partir de aproximadamente a sua metade, para a ponta anterior, onde se insere o acrossomo que tem por volta de 3,4 μm de comprimento. A extremidade posterior também é afilada, mas é lateralmente e bem mais curta (Fig. 5A'). O comprimento total do flagelo é 202,7 μm e sua porção final ramificada 77,4 μm (Fig. 5A). Os espermatozoides de *Cal. argentipennis* são menores do que aqueles da espécie anterior, com comprimento total de 102,9 μm , dos quais 1,3 μm corresponderam ao acrossomo e 13,5 μm ao núcleo (Fig. 5B'). Este diferencia daquele da espécie anterior também pelo formato, pois seu diâmetro praticamente constante ao longo de todo ele, afinando apenas nas extremidades (Fig. 5B'). O comprimento

total do flagelo é de 87,6 μm , estreitando-se em sua porção final e ramificando-se em filamentos de apenas 1,9 μm (Fig. 5B).

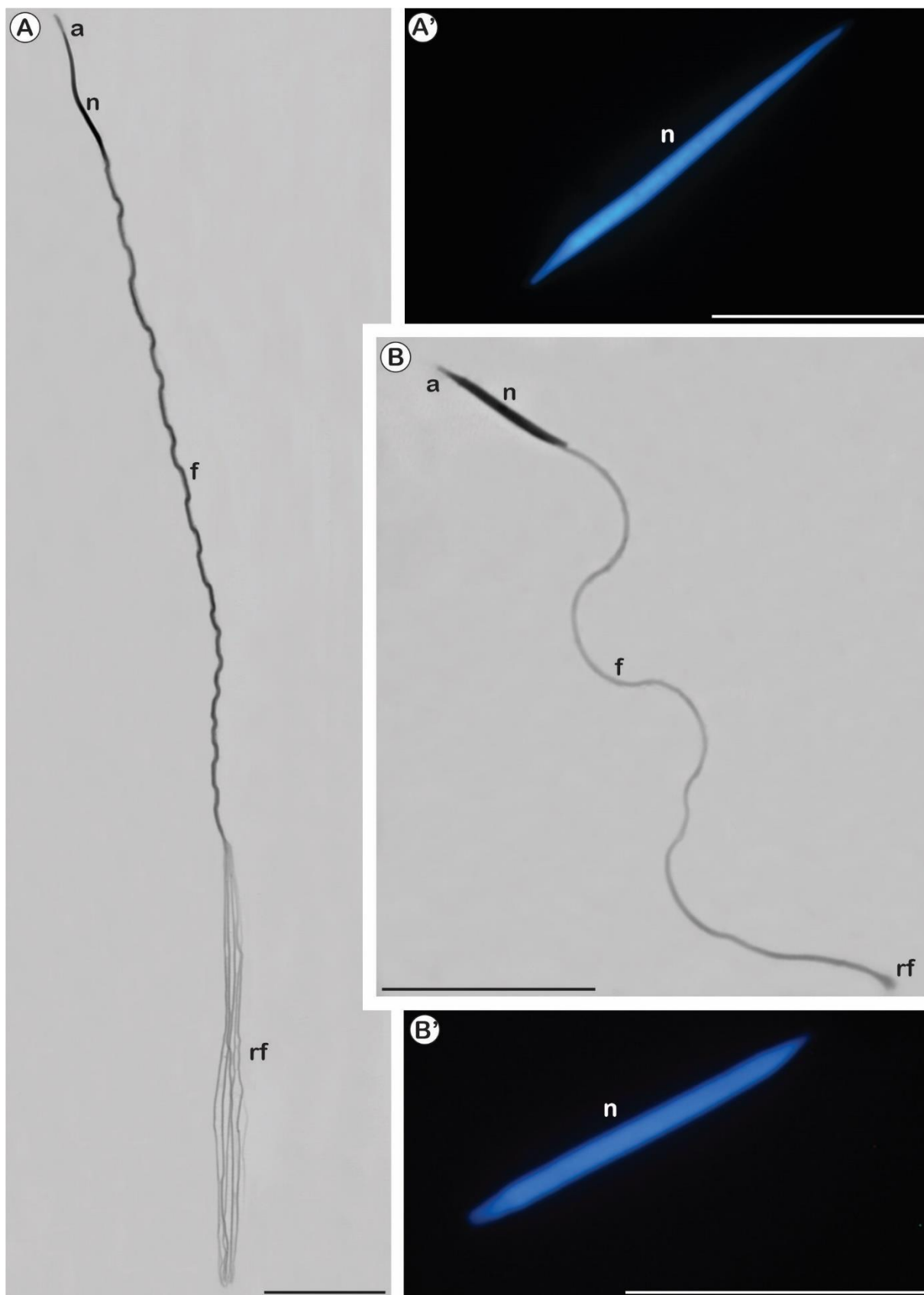


Figura 5 – Espermatozoides de *Campylenchia latipes* (A) e de *Calloconophora argentipennis* (B) corados com Giemsa. Acrossomo (a), núcleo (n), flagelo (f) e ramificação flagelar (rf). A' e B' - Núcleos dos espermatozoides das respectivas espécies corado com DAPI. Barras: A, B = 20 µm; A', B' = 10 µm.

6. DISCUSSÃO

Anatomicamente, os sistemas reprodutores masculinos de *Cam. latipes* e *Cal. argentipennis* seguem uma organização morfológica geral como observada em outros Auchenorrhynchas. São formados por dois de testículos, dois ductos deferentes, duas vesículas seminais, duas glândulas acessórias, dois ductos ejaculatórios laterais que desembocam em um ducto ejaculatório comum (Gil-Fernandez e Black, 1965; Ammar, 1985; Tsai e Perrier, 1996; Hayashi e Kamimura 2002; Vitale et al. 2015; Zhang et al., 2016). Porém com algumas variações, especialmente em relação ao tamanho, número e forma dos folículos testiculares, das vesículas seminais e glândulas acessórias (Gil-Fernandez e Black, 1965; Vitale et al. 2015; Zhang et al., 2016).

O número de folículos testiculares nas espécies *Cam. latipes* (8) e *Cal. argentipennis* (14) está entre o observado em outros representantes de Cicadomorpha, que varia de três em *Cicadella spectata* (Membracoidea: Cicadellidae) a 17 em *Clovio puncta* (Cercopoidea: Aphrophoridae) (Ammar, 1985, Vitale et al., 2015). Deve-se ressaltar que o número de folículos é geralmente constante no grupo (ver Golub et al., 2014) e essas variações encontradas, não somente em Auchenorrhyncha, mas também em Sternorrhyncha, (Vitale et al., 2011; Vitale et al., 2015). Tem sido proposto que essa redução corre por fusão dos folículos e, além disso, essa redução poderia estar relacionada com a simplificação das estruturas corporais (Vitale et al., 2015).

Nos insetos em geral, a espermatogênese ocorre dentro de cistos delimitados por células císticas e, no mesmo cisto, as células germinativas se encontram na mesma fase da espermatogênese (Phillips, 1974; Jamieson et al. 1999; Klowden 2013; Dallai 2014). Os folículos testiculares das duas espécies aqui estudadas mostraram-se completamente preenchidos por cistos em diferentes fases da espermatogênese, indicando a produção contínua de espermatozoides ao longo de toda a vida adulta, característica comum daqueles insetos que tem vida adulta longa e que copulam durante esta fase, típico para a maioria dos hemípteros (Moreira et al., 2008; Araújo et al., 2020; Rezende et al., 2021). Durante toda a espermatogênese, ocorrem

sucessivas divisões mitóticas, seguidas por duas divisões meióticas e esse número de divisões por cisto é geralmente espécie específico (Phillips 1974; Chapman, 2013; Klowden 2013).

Quanto às vesículas seminais, em *Cam. latipes* são fusiformes, situadas na porção posterior dos ductos deferentes e emparelhadas na base. Já em *Cal. argentipennis*, elas são ovais, situadas na região mediana dos ductos deferentes e completamente separadas uma da outra. Em *Cicadella viridis* (Cicadellinae) as vesículas seminais são cilíndricas e emparelhadas, em *Kolla paulula* (Cicadellinae), emparelhadas formato balão (Zhang et al., 2016), em *Balclutha brevis* (Deltocephalinae), levemente elipsoide e anatomicamente independentes (Vitale et al., 2015) e *Aethalion reticulatum*, são ovais (Araújo et al., 2020), mostrando o quanto é variável a morfologia em Cicadomorpha.

Em *Cam. latipes*, os feixes de espermatozoides estavam comumente associados pelas cabeças ao epitélio vesicular. No entanto em *Cal. argentipennis*, essa característica foi observada de forma esporádica. Nessa espécie, a vesícula se encontrava dilatada, com epitélio fino e lúmen repleto de feixes de espermatozoides. Novais (2017) observou a associação, pelas cabeças, de praticamente todos os espermatozoides, porém de forma individualizada, ao epitélio vesicular do hematófago *Ornithocoris pallidus* (Cimicidae). Em geral, o mais relatado é a associação de apenas alguns espermatozoides isolados no epitélio vesicular, como ocorre em *B. brevis* (Vitale et al., 2015, 2016) e em *C. viridis* e *K. paulula* (Zhang et al., 2016), além de várias espécies de Orthoptera, nos quais foram observados espermatozoides associados ao epitélio vesicular tanto isolados quanto em feixes (Viscuso et al. 1999, 2015). Estes autores sugerem que essa associação indique atividade espermiófaga nas vesículas seminais, resultando na eliminação de espermatozoides que se isolaram acidentalmente dos feixes durante o trajeto até as vesículas, portanto não seriam viáveis para a fertilização. Contudo, pelo menos para *Cam. latipes*, essa associação não parece indicar atividade espermiófaga, pois são os feixes, e praticamente todos os feixes, associados, o que é bem diferente da eliminação de apenas alguns espermatozoides defeituoso. Dessa forma, é possível supor que essa associação em quantidade poderia ter o papel de passar nutriente ou outros compostos químicos para os espermatozoides através do (ou secretados pelo) epitélio. Ainda, é também possível que essa associação seja uma forma de regular o deslocamento dessas células das vesículas para o bulbo ejaculatório, como proposto por Novais (2017).

Ductos ejaculatórios laterais foram descritos em Cicadomorpha e no Fulgoromorpha *Cixidia sikaniae* (D' Urso et al., 2005; Vitale et al., 2015; Zhang et al., 2016). Em *Cam. latipes*, eles são formados pela junção dos ductos das glândulas acessórias a região posterior das vesículas seminais, já em *Cal. argentipennis* pela junção das glândulas a uma porção curta dos ductos deferentes pós-vesiculares. Utilizamos essa terminologia considerando a fusão das estruturas e suas respectivas secreções, não a origem embrionária que provavelmente é mesodérmica, visto que não são revestidos internamente por cutícula como em *C. sikaniae* (D' Urso et al., 2005). Em *Balclutha brevis*, *Cicadella viridis*, *Kolla paulula* e *Cixidia sikaniae*, os ductos ejaculatórios laterais começam na região posterior de cada vesícula seminal, e as glândulas acessórias se abrem nesses ductos (D' Urso et al., 2005; Vitale et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Nos insetos, as glândulas acessórias variam em tamanho, número, forma e origem embrionária (Tsai e Perrier 1996; Chapman, 2013; Zhang et al., 2016). Elas podem desembocar no ducto ejaculatório, quando de origem ectodérmica, ou nos dos ductos deferentes, de origem mesodérmica (Chapman, 2013; Klowden 2013), como é o caso de ambas as espécies deste estudo. Dentre os Auchenorrhyncha, glândulas acessórias foram descritas em Cicadomorpha (Gil-Fernandez e Black, 1965; ver Ammar, 1985; Tsai e Perrier, 1996; Hayashi e Kamimura, 2002; Vitale et al., 2015; Zhang et al., 2016; Araújo et al., 2020) e ausentes em Fulgoromorpha (D'Urso et al., 2005). Além disso, as glândulas apresentam uma variedade de funções, dentre elas a contribuição para produção do fluido seminal, ativação e proteção dos espermatozoides e modificação do comportamento e da fisiologia das fêmeas (Gillot, 2005; Chapman, 2013; Klowden 2013).

Nas espécies estudadas, *Cam. latipes* e *Cal. argentipennis*, o conteúdo encontrado no lúmen nas diferentes porções das glândulas acessórias, é de aspecto diferente, apontando que apresentam natureza química e funcional distintas. A histologia indica que o modo de liberação das secreções das células epiteliais para o lúmen nas porções anterior e posterior das glândulas, em *Cam. latipes*, ocorre por via merócrina-apócrina, pois é possível observar que alguns produtos são liberados através de vesículas secretoras e outros juntamente com pedaços das células. Mecanismo semelhante tem sido observado em outras espécies de insetos (Freitas et al. 2007, 2010; Zhang et al., 2016). Em *Cal. argentipennis*, o modo de liberação das secreções, na porção anterior da glândula, é por via holócrina, pois há presença de células inteiras

com sinais de degeneração no lúmen, assim como ocorre em *B. brevis* (Vitale et al., 2015).

A espessa camada muscular observada no ducto ejaculatório comum em *Cam. latipes* e no bulbo ejaculatório em *Cal. argentipennis* pode estar relacionado com a função de bombear, de forma a regular a quantidade de espermatozoides a ser liberada pelo macho.

A morfometria dos espermatozoides, bem como de suas partes, se mostrou característica para cada espécie. O comprimento total do espermatozoide nas espécies *Cam. latipes* (226,4 μm) e *Cal. argentipennis* (102,9 μm) segue padrão encontrado em outros Cicadomorpha (Cruz-Landim e Kitajima 1972; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006 e 2007; Araújo et al. 2010; Zhang e Dai 2012; Su et al. 2014, Vitale et al., 2016, Barcellos et al., 2018). Flagelos com quatro, ocasionalmente cinco, filamentos na porção final foram observados em outras quatro espécies de Membracidae (Phillips, 1969), e em Cicadellidadae nas espécies *B. brevis* (Vitale et al., 2016), *Dalbulus maidis* (Barcellos et al., 2018). Porém, essas ramificações não foram observadas no Aetalionidae *Aethalion reticulatum* (Araújo et al., 2010), nem nas espécies das superfamílias Cercopoidea (Hodgson et al., 2016) e Cicadoidea (Chawanji et al., 2005, 2006, 2007), indicando que podem estar presentes apenas nas famílias de Membracoidea, Cicadellidae e Membracidae, já que não há dados sobre os espermatozoides das famílias Melizoderidae e Myerslopiidae.

As vesículas seminais com feixes de espermatozoides unidos pelas cabeças em uma matriz extracelular (espermatodesmata) também foi observado em Cercopoidea (Hodgson et al., 2016) e Membracoidea (Araújo et al., 2010; Zhang e Dai, 2012; Su et al., 2014; Vitale et al., 2016; Zhang et al., 2016; Barcellos et al., 2018), mas não em Cicadoidea (Chawanji et al. 2005, 2006, 2007).

Com base nessas considerações, a caracterização morfológica do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides das espécies *Cam. latipes* e *Cal. argentipennis* são os primeiros registros da família Membracidae e são dados que contribuirão para o conhecimento da biologia reprodutiva, dos estudos sobre espermatozoides, bem como para sistemática da família e dos Auchenorrhyncha.

REFERÊNCIAS

- Ammar, E.D., 1985. Internal morphology and ultrastructure of leafhoppers and planthoppers. In: Nault L.R., Rodriguez J.G. (Eds), *The leafhoppers and planthoppers*, Wiley-Interscience Publications, USA, pp.127–162.
- 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., Bacca, T., Dias, L. G., 2020. Estructura histológica del sistema reproductor masculino de la cigarrita *Aethalium reticulatum* (Hemiptera: Aethalionidae). *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*, 24(2), 127–137.
- Barcellos, M.S., Dias, G., Lino-Neto, J., 2018. Re-description of the sperm morphology of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Tissue and Cell*, 51, 56–61.
- Bartlett, C.R., Deitz, L.L., Dimitriex, D.A., Saborn, A.F., Perkins, A.S., Wallace, M.S., 2018. The Diversity of the True Hoppers (Hemiptera: Auchenorrhyncha). In: Footitt, R. G., Adler, P. H. (Eds), *Insect Biodiversity: Science and Society*, vol. II. Wiley-Blackwell, pp. 501–590.
- Bednarczyk, J., 1993. The structure of male reproductive system in species of the family Cicadellidae (Homoptera, Auchenorrhyncha). *Acta Biologica Silesiana*, 22 (39), 126–143.
- Brown Jr., K.S., 1997. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. *Journal of Insect Conservation*, 1, 25–42.
- Chapman, R.F., 2013. *The Insects: Structure and Function*. 5th edition. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 929.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2005. Sperm morphology in four species of *African platypleurine* cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue and Cell*, 37 (4), 257–267.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue and Cell*, 38 (6), 373–388.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2007. Spermiogenesis in three species of cicadas (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 88, 337–348.
- Cocroft, R.B., Rodríguez, R.L., 2005. The behavioral ecology of insect vibrational communication. *BioScience*, 55, 323–334.

- Creão-Duarte, A.J., Sakakibara, A.M., 1998. Análise cladística dos gêneros de Membracinae (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Membracidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 15 (4), 823–846.
- Creão-Duarte, A.J., Anjos, U.U., Santos, W.E., 2012. Diversidade de membracídeos (Hemiptera, Membracidae) e sobreposição de recursos tróficos em área do semi-árido. *Iheringia, Série Zoologia*, 102(4), 453–458.
- Creão-Duarte, A.J., Pereira-Colavite, A., Santos, W.E., Barbosa, S.A., Cabral, V.A., Lourenço, A., Braga, I.S., Silva, W.R., 2017. Membracidae diversity (Hemiptera: Auchenorrhyncha) in the Atlantic Forest area, Paraíba, Brazil, with preliminary comments on collection methods, spatial distribution and estimated species richness. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, 12 (1), 11–21.
- Cryan, J.R., B.M., Wiegmann, L.L. Deitz, Dietrich, C.H., 2000. Phylogeny of the treehoppers (Insecta: Hemiptera: Membracidae): Evidence from two nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17, 317–334.
- Cryan, J.R., 2005. Molecular phylogeny of Cicadomorpha (Insecta: Hemiptera: Cicadoidea, Cercopoidea and Membracoidea): adding evidence to the controversy. *Systematic Entomology*, 30, 563–574.
- Cryan, J.R., Urban, J.M., 2012. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology*, 37, 7–21.
- Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1972. The ultrastructure of male spermatozoa of corn leafhopper *Dalbulus maidis* Del. and W. (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 4, 75–82.
- Cui, B., Wei, C., 2018. Ultrastructure of spermatozoa in three cicada species from China (Hemiptera, Cicadomorpha, Cicadidae). *ZooKeys*, 776, 61–80.
- Dallai, R., 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Structure & Development*, 43, 257–290.
- Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R.G., 2016. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. *Annual Review of Entomology*, 61, 1–23.
- Deitz, L.L., Wallace, M.S., 2010. Treehoppers: Aetalionidae, Melizoderidae, and Membracidae (Hemiptera). Disponível em: <<http://treehoppers.insectmuseum.org>>. Acesso em: 05/10/2021.
- Dietrich, C.H., Mckamey, S.H., Deitz, L.L., 2001a. Morphology-based phylogeny of the treehopper family Membracidae (Hemiptera: Cicadomorpha: Membracoidea). *Systematic Entomology*, 26, 213–239.
- Dietrich, C.H., Rakitov, R.A., Holmes, J.L., Black, W.C., 2001b. Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18, 293–305.

Dietrich, C.H., 2005. Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist*, 88 (4), 502–517.

Dietrich, C.H., Allen, J.M., Lemmon, A.R., Lemmon, E.M., Takiya, D.M., Evangelista, O., Walden, K.K.O., Grady, P.G.S., Johnson, K.P., 2017. Anchored hybrid enrichment-based phylogenomics of leafhoppers and treehoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Membracoidea). *Insect Systematics and Diversity*, 1(1), 57–72.

Dmitriev, D.A., 2010. Homologies of the head of Membracoidea based on nymphal morphology with notes on other groups of Auchenorrhyncha (Hemiptera). *European Journal of Entomology*, 107, 597–613.

D'Urso, V., Guglielmino, A., Mauceri, A., 2005. The internal male and female reproductive apparatus in *Cixidia sikaniae* D'Urso & Guglielmino, 1995 (Fulgoromorpha, Achilidae). *Zootaxa*, 1077, 25–36.

Freitas, S.P.C., Gonçalves, T.C.M., Serrão, J.E., 2007. Fine Structure of the Male Accessory Glands of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Triatominae). *Microscopy Research Technique*, 70, 355–360.

Freitas, S.P.C., Gonçalves, T.C.M., Serrão, J.E., 2010. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron*, 41, 518–525.

Flórez-V, C., Wolff, M.I., Cardona-Duque, J., 2015. Contribution to the taxonomy of the family Membracidae Rafinesque (Hemiptera: Auchenorrhyncha) in Colombia. *Zootaxa*, 3910 (1), 1–261.

Gil-Fernandez, C., Black, L.M., 1965. Some Aspects of the Internal Anatomy of the Leafhopper *Agallia constricta* (Homoptera: Cicadellidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 58 (3), 275–284.

Gillott, C., 2005. *Entomology*. Springer. 3th edition. Dordrecht, Holanda, p. 831.
Goodchild, A.J.P., 1966. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biology Reviews*, 41, 97–139.

Golub, N.V., Kuznetsova, V., G., Rakitov, R.A., 2014. First karyotype data on the family Myerslopiidae (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadomorpha). *Comparative Cytogenetics*, 8(4), 293–300.

Hamilton, K.G.A., 1981. Morphology and evolution of the rhynchotan head (Insecta: Hemiptera, Homoptera). *The Canadian Entomologist*, 113, 953–974.

Hayashi, F., Kamimura, Y., 2002. The potential for incorporation of male derived proteins into developing eggs in the leafhopper *Bothrogonia ferruginea*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 153–159.

- Hodgson, A.N., Ridgeway, J.A., Villet, M.H., 2016. Sperm ultrastructure and spermatodesm morphology of the spittle bug *Locris transversa* (Tunberg, 1822) (Hemiptera, Cercopidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 60, 87–94.
- Hodkinson, T.R.; Parnell, J.A.N., 2007. *Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa*. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 368.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*, 1th edition. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, p. 555.
- Jiang, Z., Qin, D., 2018. Sperm ultrastructure of *Euricania clara* Kato (Hemiptera: Fulgoroidea: Ricaniidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(2), 246–254.
- Jiang, Z., Liu, J. Qin, D., 2019. Sperm ultrastructure of *Pochazia shantungensis* (Chou y Lu) and *Ricania speculum* (Walker) (Hemiptera, Ricaniidae) with phylogenetic implications. *ZooKeys*, 880, 43–59.
- Klowden, M.J., 2013. *Physiological systems in insects*.3th edition. Academic Press, United States of America, p.682.
- Kubo-Irie, M., Nakazawa, M., Mohri, H., 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology*, 49, 983–991.
- Li, H., Leavengood, J.M., Chapman, E.G., Burkhardt, D., Song, F., Jiang, P., Liu, J., Zhou, X., Cai, W., 2017. Mitochondrial Phylogenomics of Hemiptera reveals adaptive innovations driving the diversification of true bugs. *Proceedings of the Royal Society*, 284, 20171223.
- Lin, C.P., Danforth, B.N., Wood, T.K., 2004. Molecular phylogenetics and evolution of maternal care in membracine treehoppers. *Systematic Biology*, 53(3), 400–421.
- Lin, C.P., 2006. Social behavior and life history of membracine treehoppers. *Journal of Natural History*, 40, 1887–1907.
- Lin, C.P., Maruyama, M., Wang, J.F., Miller, P.E., Chaboo, C.S., 2019. Treehoppers (Hemiptera: Aetalionidae and Membracidae) of the Madre de Dios region, Peru. *Revista peruana de biología*, 26(4), 429–442.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*, 30(2), 89–96.
- Mao, M., Yang, X., Poff, K., Bennett, G., 2017. Comparative Genomics of the Dual-Obligate Symbionts from the Treehopper, *Entylia carinata* (Hemiptera: Membracidae), Provide Insight into the Origins and Evolution of an Ancient Symbiosis. *Genome Biology Evolution*, 9, 1803–1815.
- Moreira, P.A., Araújo, V.A., Zama, U., Lino-Neto, J., 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (Trypargilum) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotropical Entomology*, 37(4), 429–435.

- Munhoz, I.L.A., Serrão, J.E., Dias, G., Lino-Neto, J., Melo, A.L., Araújo, V.A. 2020. Anatomy and histology of the male reproductive tract in giant water bugs of the genus *Belostoma* Latreille, 1807 (Heteroptera, Belostomatidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(3), 303–311.
- Novais, A.M. 2017. Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides em *Nepomorpha* e *Cimicomorfa* (Heteroptera). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 42.
- Peruzzo, D.R.L., Filho, W.S.A., Palma, M.A., 2017. Flutuação populacional de *Entyllia carinata* (Hemiptera: Membracidae) na cultura da videira nos municípios de Bento Gonçalves e Pinto Bandeira, RS. *Caderno de Pesquisa*, 29(1), 19–27.
- Phillips, D.M., 1969. Exceptions to the prevailing pattern of tubules (9 + 9 + 2) in the sperm flagella of certain insect species. *The Journal of Cell Biology*, 40, 28–43.
- Phillips, D.M., 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 44, 243–277.
- Phillips, D.M., 1974. *Spermiogenesis*. New York, NY. Academic Press, p. 68.
- Rafael, J.A., Melo, G.A.R., Carvalho, C.J.B., Casari, S.A., Constantino, R. (eds.), 2012. *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto, SP. Holos Editora. p. 810.
- Rezende, P.H., Dias, G., Folly, C., Lino-Neto, J., 2021. Male reproductive system and sperm morphology of *Eccritotarsini* plant bugs (Heteroptera: Miridae). *Zoomorphology*, 140, 257–267.
- Tsai, J. H., Perrier, J. L., 1996. Morphology of the Digestive and Reproductive Systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae). *The Florida Entomologist*, 79 (4), 563–578.
- Sakakibara, A.M., Evangelista, O., 2010. *Membracis foliata* (Linnaeus) (Hemiptera: Membracidae: Membracinae) and allied species: an effort towards their correct determination. *Journal of Natural History*, 44, 2131–2148.
- Song, N., Cai, W., Li, H., 2017. Deep-level phylogeny of Cicadomorpha inferred from mitochondrial genomes sequenced by NGS. *Scientific Reports*, 7, 10429.
- Strümpel, V.H., Strümpel, R., 2014. Revision der amerikanischen Membracidengattung *Enchenopa* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha: Membracidae) mit Beschreibungen neuer Arten. *Entomologische Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Hamburg*, 17, 1–137.
- Su, M., Dietrich, C., Zhang, Y., Dai, W., 2014. Ultrastructure of the spermatozoa of *Psammodettix striatus* (Linnaeus) and *Exitianus nanus* (Distant) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Arthropod Structure & Development*, 43, 559–570.

- Viscuso, R., Narcisi, L., Sottile, L., 1999. Structure and function of seminal vesicles of Orthoptera Tettigonioidae. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 28, 169–178.
- Viscuso, R., Brundo, M.V., Marletta, A., Vitale, D.G.M, 2015. Fine structure of male genital tracts of some Acrididae and Tettigoniidae (Insecta: Orthoptera). *Acta Zoologica*, 96, 418–427.
- 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 and Cell* 43, 271–282.
- Vitale, D.G.M., Viscuso, R., D'Urso, V., Gibilras, S., Sardella, A., Marletta, A., Pappalardo, A.M., 2015. Morphostructural analysis of the male reproductive system and DNA barcoding in *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Homoptera, Cicadellidae). *Micron*, 79, 36–45.
- 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.
- Wood, T.K., 1993. Diversity in the New World Membracidae. *Annual Reviews of Entomology*, 38, 409–435.
- 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). *Annals of the Entomological Society of America*, 109 (3), 447–462.