

JAMILE FERNANDA SILVA COSSOLIN

**POLIMORFISMO E ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE  
*Euschistus heros* (FABRICIUS, 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

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*.

VIÇOSA-MG  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

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

T

C836p  
2015  
Cossolin, Jamile Fernanda Silva, 1989-  
Polimorfismo e ultraestrutura dos espermatozoides de  
*Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) /  
Jamile Fernanda Silva Cossolin. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 24f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.22-24.

1. *Euschistus heros*. 2. Percevejo - Polimorfismo.  
3. Percevejo - Espermatozóides. 4. Insetos - Taxonomia.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

JAMILE FERNANDA SILVA COSSOLIN

**POLIMORFISMO E ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE  
*Euschistus heros* (FABRICIUS, 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

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:

---

Uyrá dos Santos Zama  
Universidade Federal de Ouro Preto

---

Cláudia Vânia Miranda de Oliveira  
Instituto Federal do Alagoas

---

José Lino Neto  
Universidade Federal de Viçosa  
(Orientador)

**Dedico esta dissertação à  
minha mãe Irenilda e às  
minhas queridas irmãs Cindy  
e Aline.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural pelo ensino de qualidade.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço ao Prof. José Lino Neto, meu orientador. Obrigada por me acolher como orientada, pela oportunidade de trabalho e pela confiança.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Mônica Josene Barbosa Pereira pelo valioso aprendizado, pela convivência, pelos ensinamentos, por toda ajuda que tive durante a graduação na UNEMAT e na pós-graduação na UFV.

Ao Prof. José Eduardo Serrão pelos ensinamentos.

Ao Prof Lúcio Antonio de Oliveira Campos pela amizade e pelas discussões e sugestões no trabalho.

Às professoras Uyrá dos Santos Zama e Cláudia Vânia Miranda de Oliveira por aceitarem participar da banca de defesa dessa dissertação.

Ao Prof. Rui Sutton de Sousa Neves por me ajudar com muita paciência e dedicação na disciplina de estágio em ensino.

Aos colegas do Laboratório de Ultraestrutura celular em especial o Marcelo Silva Barcellos (companheiro de trabalho).

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV em especial a Elizabeth Alves Pena, pela competência.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, em especial Karla Ribeiro, Gilmar Valente, Lourenço e Rosângela pela disponibilidade em ajudar sempre que foi necessário.

Agradeço à minha mãe Irenilda dos Santos Silva Cossolin, por ser a melhor mãe do mundo.

Agradeço às minhas duas irmãs Cindy Silva Cossolin e Aline Silva Cossolin, por serem as melhores do mundo.

Agradeço a Mary e Milaine pelos momentos inesquecíveis em Viçosa.

Aos meus amigos (que mesmo na distância estão sempre presentes): Rafael Bellini, Fernando Oliveira Martins, Vanessa Golin, Leonardo Morais Turchen, Joiciane Gonçalves Farias, Felipe Barbosa Magalhães, Diones Krinski, Marcelly dos Santos, e a todos do laboratório de Entomologia da UNEMAT. Muito obrigada pelo companheirismo!!

À tia Sandra, tia Chichico, tia Valderose, tia Rúbia, tio Zé Ronaldo, tio Feijão, tia Ivanice, tia Ivone, Patrícia e Sandro por todo apoio e carinho.

Aos meus amigos queridos da SFTC pela companhia, conselhos e discussões diárias: Aline, Ana Luiza, Ariel, Chris, Duarte, Fabiano, Gustavo, Josias, Júnio, Lívia, Mackaulin, Marcelo, Miguel, Persí, Renan, Roger e Túlio.

## **BIOGRAFIA**

Jamile Fernanda Silva Cossolin, primeira filha de Irenilda dos Santos Silva Cossolin e José Antônio Cossolin, nasceu na zona rural da cidade de Miranda, Mato Grosso do Sul em 24 de setembro de 1989.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2007 em colégio público. Em março de 2009 iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade do Estado de Mato Grosso (UEMAT), Tangará da Serra – MT, concluindo em 20 de fevereiro de 2012. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica orientada pela professora Mônica J. B. Pereira. Em março de 2013 ingressou no curso de mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo a dissertação em fevereiro de 2015. Ainda em dezembro de 2014 foi aprovada no curso de Doutorado também em Biologia Celular e Estrutural – UFV.

## SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A ordem Hemiptera	1
1.2 Heteroptera	2
1.3 Pentatomidae	2
1.4 Euschistus heros (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)	3
1.5. Sistema reprodutivo masculino em Heteroptera.	3
1.6. Espermatozoides em insetos	4
2. OBJETIVO	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. Insetos	5
3.2. Microscopia de luz (ML)	5
3.2.1. Espermatozoides	5
3.2.2. Histologia dos testículos	6
3.3. Microscopia eletrônica de transmissão – MET	6
3.3.1. Convencional	6
3.3.2. Glutaraldeído e ácido tânico – para microtúbulos	7
3.3.3. Etanol-ácido fosfotúngstico (E-PTA) – para proteínas básicas	7
4. RESULTADOS	7
4.1. Estrutura dos espermatozoides	7
4.2. Ultraestrutura dos espermatozoides	10
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÕES	21
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

## RESUMO

COSSOLIN, Jamile Fernanda Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **POLIMORFISMO E ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Euschistus heros* (FABRICIUS, 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**. Orientador: José Lino Neto. Coorientadora: Mônica Josene Barbosa Pereira.

Nos insetos, os espermatozoides exibem morfologias muito variáveis, porém apresentam alguns caracteres constantes para a espécie e, em geral, somente o tipo responsável pela fertilização é produzido. Entretanto, tem sido observado em vários grupos, espécies que produzem mais de um tipo de espermatozoide, sendo mais comum a ocorrência de dois tipos (dimorfismo). Todavia, em Hemiptera são observadas espécies que produzem três ou mais tipos (polimorfismo). Neste sentido, este trabalho teve como objetivos verificar o número e descrever a morfologia dos tipos de espermatozoides produzidos pelo percevejo marrom da soja *Euschistus heros*. Para isto, testículos e vesículas seminais de 10 indivíduos foram dissecadas e uma parte dessa amostra foi fixada em Karnovsky e processada para microscopia de luz (ML), e uma outra parte foi fixada em glutaraldeído 2,5% acrescido de 2% de sacarose e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, no tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 e processada para microscopia eletrônica de transmissão (MET) convencional e para a técnica de etanol-ácido fosfotúngstico (E-PTA). Ainda, algumas amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% com ácido tânico 1% e processadas para MET. Em *E. heros* cada testículo tem seis folículos os quais foram identificados de 1 a 6. Essa espécie produz três tipos de espermatozoides, aqueles do *tipo 1* são produzidos nos folículos testiculares 1, 2 e 3, os do *tipo 2* no folículo 5 e os do *tipo 3* nos folículos 4 e 6. Os três tipos encontra-se livres na vesícula seminal e, à ML, não é possível diferenciar os espermatozoides dos tipos 1 e 2, pois eles são morfometricamente indistintos, com comprimento total por volta de 190 µm e o núcleo 27 µm. Já o tipo 3 é facilmente diferenciável dos outros dois, pois eles são mais grossos e com 795 µm de comprimento total e 160 µm de núcleo. A MET mostrou que os três tipos de espermatozoides possuem uma região de cabeça, formada pelo núcleo e o complexo acrossomal que apresenta um paracristalino acrossomal ao lado do núcleo, e uma de flagelo, formada pelo axonema com 9+9+2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais simétricos e, na região de transição núcleo-flagelo, um adjunto do centríolo assimétrico. Cada derivado mitocondrial apresenta duas áreas paracristalinas desiguais e uma ponte que o conecta ao axonema, o qual tem os túbulos acessórios e o par central preenchidos por material E-PTA positivo. Embora os três tipos de espermatozoides possuam os mesmos componentes, eles são facilmente reconhecíveis pela ultraestrutura e a associação desses componentes. Por exemplo, na região de cabeça, os formatos do

núcleo e do paracristalino acrossomal são característicos para cada tipo de espermatozoide. Já no flagelo o que facilmente distingue os três tipos são os derivados mitocondriais, especialmente em corte transversal. Eles no tipo 1 são em forma de meia lua e cada um tem área igual a do axonema, no tipo 2 são alongados com área de aproximadamente 1,5 vezes a do axonema e, no tipo 3, são semicircular e cada um com área por volta de seis vezes maior do que a área do axonema. Observando o conteúdo de ovos imediatamente após a postura à ML, encontramos apenas núcleos de espermatozoides com o comprimento daqueles do tipo 1 e 2. Entretanto, como os espermatozoides do tipo 2 são produzidos em pequena quantidade, supomos que os tipo 1 são os que fertilizam os óvulos. Os outros dois tipos, como já propostos por outros pesquisadores, possivelmente são úteis na locomoção e/ou nutrição dos espermatozoides férteis. Considerando que a morfologia dos espermatozoides tem sido utilizada na sistemática dos insetos em geral, nos grupos de Hemiptera, que apresentam o polimorfismo espermático, provavelmente essas células são capazes de oferecer um conjunto de caracteres que poderão ser utilizados para o estudo filogenético e, especialmente, taxonômico destes insetos.

## ABSTRACT

COSSOLIN, Jamile Fernanda Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2015. **Polimorfism and ultrastructure in *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) spermatozoa (Hemiptera: Pentatomidae)**. Adviser: José Lino Neto. Co-adviser: Mônica Josene Barbosa Pereira.

In insects, sperm morphology exhibit variable morphologies, but have some constant character for the specie and, in general, only one type responsible for fertilization is produced. However, it has been observed in several groups, species that produce more than one type of sperm, being more common occurrence of two types (dimorphism). However, in Hemiptera are observed species to produce three or more types (polymorphism). Thus, this study aimed to verify the number and describe the morphology of the types of sperm produced by the stinkbug *Euschistus heros*. For this, testes and seminal vesicles of 10 insects were dissected which a portion of this sample was fixed in Karnovsky and processed for light microscopy (LM) and another part was fixed in 2.5% glutaraldehyde plus 2% sucrose and 5 mM CaCl<sub>2</sub> in sodium cacodylate buffer, pH 7.2 and processed for transmission electron microscopy (TEM) conventional and ethanol to phosphotungstic acid technique (E-PTA). Still, some samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde with tannic acid 1% and processed for TEM. In *E. heros* each has six testis follicles which were identified from 1 to 6. The specie produces three types of spermatozoa, those of the type 1 are produced in the testis follicles 1, 2 and 3, the type in 2 and 5, and the type 3 in the follicles 4 and 6. The three types is free in the seminal vesicle and in LM, it is not possible to differentiate sperm types 1 and 2, as they are morphometrically indistinguishable, with total length around 190 µm and 27 µm nuclei. The type 3 is easily distinguishable from the other two because they are thicker and with 795 µm of total length and 160 µm nuclei. TEM showed that the three types of sperm have a head portion formed by the nuclei and acrosomal complex which has a projection in side of nuclei, and a flagellum formed by axonema with 9+9+2 microtubules, two symmetrical mitochondrial derivatives and, in the transition nuclei-flagella an asymmetric centriole adjunct. Each mitochondrial derivative shows two different paracrystalline areas and a bridge connecting it to the axoneme, which has the tubules accessories and the central pair filled with material E-PTA positive. Although the three types of sperm have the same components, they are easily recognizable by ultrastructure and association of these components. For example, in the head, nuclei shape and acrosomal projection are characteristic for each type of sperm. Since the flagella the feature which easily distinguishes the three types are the mitochondrial derivatives, particularly in cross section. In type 1 they are half-moon shaped it has equal area to the axoneme, in type 2 the mitochondrial derivatives are

stretched with an area of approximately 1.5 times that of the axoneme and in the type 3, they are semicircular and each with an area for about six times greater than the area of the axonema. When we verified the contents of eggs immediately after laying in the LM, we found only nuclei of sperm with the length of those of type 1 and 2. However, since the sperm type 2 are produced in small quantities, we assume that the first type are those who fertilize the eggs. The other two types, as proposed by other researchers, are possibly useful in locomotion and/or nutrition of fertile sperm. Considering the morphology of sperm has been used in systematic of insects, in groups of Hemiptera, the spermatid polymorphism feature probably are able to offer a set of characters that can be used to study phylogenetic and especially taxonomy of these insects.

## 1. Introdução

### 1.1 A ordem Hemiptera

A ordem Hemiptera é a maior e a mais diversa entre os insetos hemimetábolos. São conhecidas cerca de 89 mil espécies em todo o mundo, distribuídas nas quatro subordens reconhecidas atualmente: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha e Heteroptera. O sucesso desta relaciona-se ao corpo mais compacto e o sistema nervoso muito concentrado, que conferiram maior rapidez de resposta e um grau similar de complexidade comportamental. Outra razão para o sucesso é o aparelho bucal especializado, adaptado para picar e sugar (Grazia et al., 2012).

A subordem Sternorrhyncha é conhecida pelos seus representantes moscas-brancas (Aleirodoidea), pulgões (Aphioidea) e cochonilhas (Coccoidea), são fitófagos e muitos de importância agrícola. Os aleirodídeos formam grandes colônias na face inferior das folhas e sugam continuamente a seiva do vegetal, causando danos que pode levar a morte da planta. Já os afídeos preferem as zonas de crescimento do vegetal, como brotações, folhas novas e botões florais e também se alimentam da seiva, causando enfraquecimento generalizado e ainda, por meio de suas picadas podem transmitir vírus às plantas. As formas aladas surgem com o aumento das colônias e tem a função de dividir e disseminar a população em busca de novos recursos. Por fim, as cochonilhas são encontradas em diferentes partes das plantas, locomovendo-se muito pouco. Formam grandes colônias e sugam continuamente a seiva provocando manchas, definhamento e até morte; algumas espécies induzem a formação de galhas (Grazia et al., 2012).

Os Auchenorrhyncha são conhecidos por cigarras, cigarrinhas e soldadinhos, alimentam-se exclusivamente da seiva das plantas. Ocorrem em todas as regiões geográficas e são comuns e abundantes na região tropical. A família mais conhecida é Cicadellidae, onde as espécies alimentam-se do xilema, floema e mesófilo, e são encontrados em gramíneas, arbustos, plantas herbáceas, ornamentais, frutíferas e monoculturas. A maioria das espécies tropicais tem duas gerações por ano. Em regiões temperadas com invernos bem definidos, passam a estação em forma de ovos (Grazia et al., 2012). Os Coelorrhyncha não ocorrem no Brasil, porém já foram descritas cerca de 30 espécies (Grazia et al., 2012).

Os Heteroptera são amplamente distribuídos mundialmente e podem apresentar hábitos terrestres, exclusivamente aquáticas e semi-aquáticas. Existem espécies hematófagas, importantes na entomologia médica por serem vetores de agentes infecciosos, predadoras, muito estudadas pelo seu papel no controle biológico, e finalmente fitófagas, sendo que muitas espécies são pragas atuais ou em potencial de plantas cultivadas (Grazia et al., 2012).

## 1.2 Heteroptera

Os Heteroptera são popularmente conhecidos como percevejos, mas algumas famílias tem nomes específicos, como fede-fede ou maria-fedida para Pentatomidae e barbeiro para Reduviidae. As ninfas assemelham-se morfológicamente aos adultos, e geralmente ocupam o mesmo habitat (Gillott, 2005; Grazia et al., 2012).

A importância econômica dos Heteroptera é devido o dano direto que causam às culturas. Entretanto há muitas espécies entomófagas que se alimentam de outros insetos economicamente prejudiciais. E finalmente, existem espécies ectoparasitas do homem e de animais domésticos, onde algumas poucas espécies são vetores de agente patogênicos que causam sérias doenças para o homem, tais como os triatomíneos, vetores do patógeno causador da doença de Chagas (Gillott, 2005; Grazia et al., 2012).

## 1.3 Pentatomidae

Pentatomidae é a quarta família mais numerosa e diversa entre os heterópteros, com distribuição mundial, e bem representados em todas as regiões faunísticas, com 760 gêneros e 4.100 espécies descritas (Grazia et al., 2012). Membros desta família são redondos ou ovóides, com antenas com cinco segmentos, tarsos com dois segmentos e um curto escutelo mais ou menos triangular. São chamados popularmente de fede-fede ou maria-fedida por produzirem um forte odor através das suas glândulas de cheiro (Panizzi, 1997).

Durante o desenvolvimento, os pentatomídeos geralmente apresentam cinco ninfas até o inseto atingir a fase adulta, sendo as duas primeiras fases jovens ápteras. As ninfas do primeiro ao terceiro instar tem comportamento gregário, já as ninfas de quarto e quinto instar percorrem distâncias maiores quando o comportamento gregário diminui (Panizzi et al., 2012).

Esta família compreende importantes pragas agrícolas, pois seus indivíduos se alimentam, em geral, de sementes e/ou frutos imaturos. Durante a alimentação, eles introduzem seu estilete nas sementes, levando ao caimento ou mal formação das sementes e frutos e ainda, o local da picada pode servir de entrada para patógenos, como o fungo *Nematospora coryli* Peglion, causador da mancha de levedura, entre outras doenças (Corrêa-Ferreira e Azevedo, 2002; Panizzi et al., 2012). Estes percevejos são polípagos, pois podem se alimentar de plantas cultivadas e não cultivadas, sendo capazes de permanecerem no ambiente mesmo quando a cultura de sua preferência não esteja disponível (Panizzi, 1997; Panizzi et al., 2012).

#### **1.4 *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)**

Do complexo de percevejos encontrados na cultura da soja no Brasil, o percevejo marrom da soja *E. heros* é considerado um dos mais importantes economicamente. Ele é nativo da região neotropical e seu primeiro registro nas lavouras brasileiras foi em 1970 no estado de São Paulo (Panizzi et al., 2012). Naquele período, a ocorrência do percevejo marrom da soja era rara, porém atualmente é a espécie mais abundante no Brasil, especialmente na região central (Corrêa-Ferreira e Azevedo, 2002).

A fase adulta do percevejo marrom da soja adulto dura em média 116 dias, e o ciclo biológico (período de ovo-adulto) varia de acordo com a temperatura, sendo 56,02 dias em 20 °C a 20,96 dias em 30 °C e as fêmeas vivem pouco menos que os machos (Cividanes e Parra, 1992). Os ovos são depositados em posturas de cor amarelada, de 5-8 ovos por postura, apresentando mancha rósea próximo a eclosão da ninfa. A espécie apresenta cinco estágios ninfais, sendo que apenas a partir do terceiro instar, passa a causar danos às sementes (Panizzi et al., 2012).

*E. heros* tem como principal fonte de alimentação leguminosas, principalmente a soja (*Glycine max* L.) (Panizzi, 1997), sendo a praga de maior importância nas regiões norte do Paraná, central e oeste do Brasil (Panizzi e Niva, 1994). Entretanto pode se alimentar de plantas de diversas famílias, tais como Solanaceae, Brasicaceae, Compositae, e plantas daninhas associadas à cultura da soja, como o leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) e o carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum* DC.) (Panizzi, 1997), o que dificulta o controle populacional deste percevejo, devido a migração de cultura de acordo com a disponibilidade do alimento.

*E. heros* hibernam durante os meses frios do ano, quando tornam-se menos suscetível à ação de parasitas e predadores (Panizzi e Oliveira, 1998), e sobrevivem a partir de reservas estocadas anteriormente (Panizzi e Vivan, 1997).

Portanto, considerando a importância econômica desta espécie, é necessário conhecer aspectos da sua biologia reprodutiva, para complementar os conhecimentos sobre a espécie.

#### **1.5. Sistema reprodutivo masculino em Heteroptera.**

Os Heteroptera apresentam um par de testículos ligados a um par de vesícula seminais e a um ducto ejacutório comum. Cada testículo é constituído por folículos, que podem variar entre 1 a 7 e apresentar formato oval, forma de leque, ou alongado. Cada testículo pode estar envolto por uma cápsula conjuntiva, cuja coloração pode variar de amarelo a vermelho e seus gradientes ou até ser incolor (Gomes et al., 2013). Nos triatomíneos, os folículos testiculares são em número de sete, não estão

envolvidos pela cápsula, e geralmente apresentam comprimento e largura variáveis (Gonçalves et al., 1987).

Em *E heros*, sabe-se que os seis folículos se dispõem lado a lado e formam um L com o ducto deferente, Souza e Itoyama (2010a) os identificou numericamente, considerando 1 o folículo mais próximo à saída do ducto deferente. No presente estudo propomos investigar a produção individual de cada folículo, para verificar a presença de polimorfismo espermático nesta espécie.

### **1.6. Espermatozoides em insetos**

Os espermatozoides são células especializadas e diversificadas (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999), podendo variar, entre as espécies, em tamanho, formato e organização ultraestrutural (Phillips, 1970). Assim, apresentam um conjunto de caracteres que pode ser usado para a organização sistemática de um grupo, bem como para a determinação de uma espécie. Tais caracteres combinados com dados moleculares e da morfologia externa podem contribuir para a maior compreensão das relações filogenéticas dentro dos insetos.

Os primeiros estudos com Hemiptera foram realizados por (Bowen, 1920; 1922a; b), que descreve, a nível de microscopia de luz, a espermatogênese de algumas espécies e naquela época já ressaltava a presença de polimorfismo em algumas espécies de Pentatomidae. O polimorfismo consiste na produção de mais de um tipo de espermatozoide por indivíduo, e foi relatado em outras ordens, como em Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera e, dentre outras funções, os espermatozoides que não participam da fertilização podem preencher a espermateca da fêmea, impedindo a entrada do ejaculado de outros machos (Araújo et al., 2012).

Os espermatozoides em Hemiptera podem variar de 20 µm (Báo et al., 1997) a 15 mm de comprimento (Taylor et al., 1982). É característica em todos os espermatozoides de Heteroptera apresentarem cabeça contendo acrossoma e núcleo, um adjunto de centríolo que liga os elementos da cabeça ao flagelo, e corpo ou flagelo composto por um longo axonema circundado parcialmente por dois derivados mitocondriais simétricos que são ancorados aos microtúbulos do axonema por duas pontes. Estas pontes tem a função de prender os derivados ao axonema e ainda auxiliar na coordenação do movimento do flagelo. Ainda, em cada derivado mitocondrial estão presentes de duas a três inclusões paracristalinas (Dallai e Afzelius, 1982; Dolder, 1988; Jamieson et al., 1999). O axonema varia nas diferentes subordens de Hemiptera, mas em Heteroptera se apresenta na constituição 9+9+2 (Jamieson et al., 1999).

Vários trabalhos descrevem a ultraestrutura dos espermatozoides de Heteroptera (Dallai e Afzelius, 1980; Itaya et al., 1980; Dallai e Afzelius, 1982; Afzelius et al., 1985; Lee, 1985; Jamieson et al., 1999; Araújo et al., 2011; Araújo et al., 2012), contemplando as famílias Corizidae, Gerridae, Saldidae, Reduviidae, Largidae e Pentatomidae. Dentre os estudos já realizados sobre a ultraestrutura dos espermatozoides de Heteroptera, as famílias Largidae e Pentatomidae apresentam polimorfismo. O polimorfismo consiste na presença de mais de um tipo de espermatozoide encontrados na vesícula seminal. Os espermatozoides podem variar de tamanho, tanto do núcleo como do flagelo, ou ainda apresentarem a ultraestrutura diferenciados (Jamieson et al., 1999).

Neste trabalho nós descrevemos em detalhe a morfologia e ultraestrutura dos espermatozoides de *Euschistus heros* uma espécie da subfamília Pentatominae que pode ser útil para a comparação com outras espécies da família Pentatomidae e assim dar informações para futuras análises sistemática e filogenética.

## **2. Objetivo**

Caracterizar a ultraestrutura dos espermatozoides de *Euschistus heros*.

## **3. Material e métodos**

### **3.1. Insetos**

Indivíduos de *E. heros* foram coletados em campos de soja na cidade de Tangará da Serra – Mato Grosso e criados no Laboratório de Morfologia e Ultraestrutura Celular, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Dez machos adultos tiveram seus sistemas reprodutores dissecados e processados para as microscopias de luz e eletrônica de transmissão.

### **3.2. Microscopia de luz (ML)**

#### **3.2.1. Espermatozoides**

Gotas de suspensão de espermatozoides, extraídos de vesícula seminal de cinco indivíduos adultos, foram espalhadas 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 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e, por último, em água destilada e secas à temperatura ambiente. Para medir os espermatozoides, parte dessas preparações foram coradas com HE e, em seguida,

lavada em água corrente e seca à temperatura ambiente. A análise e fotodocumentação 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 PBS, por 20 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e montadas com sacarose 50%. Estas lâminas foram examinadas e os núcleos fotografados em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60), equipado com filtro BP 360-370 nm. Todas as medidas foram feitas utilizando o programa de análise de imagem *Image Pro-Plus* 4.5.0.29.

### **3.2.2. Histologia dos testículos**

Para análise histológica dos testículos, essas estruturas foram dissecadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixadas, por 24 h, em solução de glutaraldeído a 2,5%. Em seguida, 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 etanol, infiltrado e incluído em historesina Leica. Os cortes semifinos foram feitos em micrótomo automático com navalha de vidro, corados por hematoxilina, eosina e azul de toluidina. O material foi examinado e fotografado em fotomicroscópio (Olympus, BX-60) como uma câmera digital Olympus Q-Color 3 acoplada.

## **3.3. Microscopia eletrônica de transmissão – MET**

### **3.3.1. Convencional**

Testículos e vesículas seminais de cinco indivíduos adultos foram dissecados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixados por 24 h em solução de glutaraldeído a 2,5% acrescido de 2% de sacarose e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, no mesmo tampão cacodilato de sódio. Em seguida, 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 etanol e, posteriormente, acetona, infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila aquosa a 3% e citrato de chumbo a 0,2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **3.3.2. Glutaraldeído e ácido tânico – para microtúbulos**

Testículos e vesículas seminais de três indivíduos adultos, dissecados como acima, foram fixados por cinco dias em solução de glutaraldeído a 2,5% e ácido tânico a 1%, acrescido de 2% de sacarose em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2. Os procedimentos de desidratação, infiltração até a captura das imagens foram os mesmos descritos para a MET convencional.

### **3.3.3. Etanol-ácido fosfotúngstico (E-PTA) – para proteínas básicas**

Testículos e vesículas seminais de três indivíduos adultos, dissecados e fixados como acima, após desidratado até o etanol 90%, foram transferidos para etanol absoluto contendo 1% de ácido fosfotúngstico, onde permaneceram por 1 h. Após esta etapa o material foi processado também da mesma forma que a técnica descrita para MET convencional, com a diferença de que para este os cortes não passaram pela etapa de contrastação.

## **4. Resultados**

### **4.1. Estrutura dos espermatozoides**

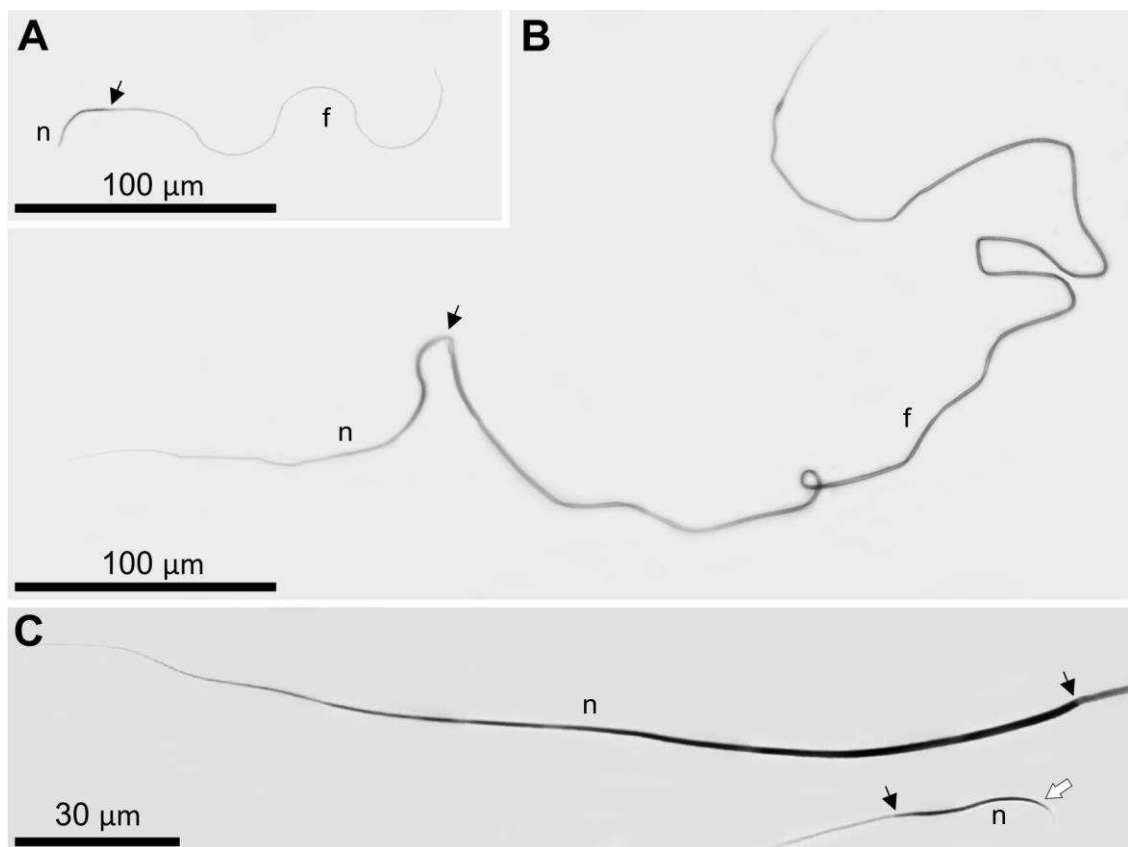
*Euschistus heros* produz três tipos de espermatozoides (Figs. 1 e 7), os quais denominamos *tipo 1*, *tipo 2* e *tipo 3*. Os três tipos de espermatozoides são longos e finos e encontrados livres na vesícula seminal. Neles são facilmente observáveis as regiões de cabeça, que tem o núcleo como estrutura principal, e de flagelo. Nessa microscopia não é possível diferenciar os espermatozoides do tipo 1 (Fig. 1A) daqueles do tipo 2. Pois eles são morfometricamente indistintos, com o comprimento total medindo aproximadamente 190  $\mu\text{m}$  e o núcleo por volta de 27  $\mu\text{m}$  (Fig. 1A). Já os espermatozoides do tipo 3 são facilmente reconhecíveis, pois são mais espessos do que os outros dois tipos e apresentam comprimento total por volta de 795  $\mu\text{m}$  e núcleo de aproximadamente 160  $\mu\text{m}$  (Fig. 1B). Os núcleos dos espermatozoides dos tipos 1 e 2 possuem diâmetro bastante regular, tornando-se afilado apenas na extremidade anterior, já o núcleo dos espermatozoides do tipo 3 é bastante longo e fino, tornando difícil de observar sua extremidade anterior à microscopia de luz (Fig. 1C).

Em *E. heros* estão presentes dois testículos, localizados látero-ventrais no abdômen e com os ductos deferentes voltados para a linha média posterior do inseto. Cada testículo é formado por seis folículos revestidos por uma cápsula conjuntiva avermelhada que emite septos isolando cada folículo. Este termina em um curto ducto eferente, então os seis ductos eferentes desembocam no ducto deferente (Fig. 1A). Os folículos são longos, medindo por volta de 2,8 mm, e aproximadamente achatados em

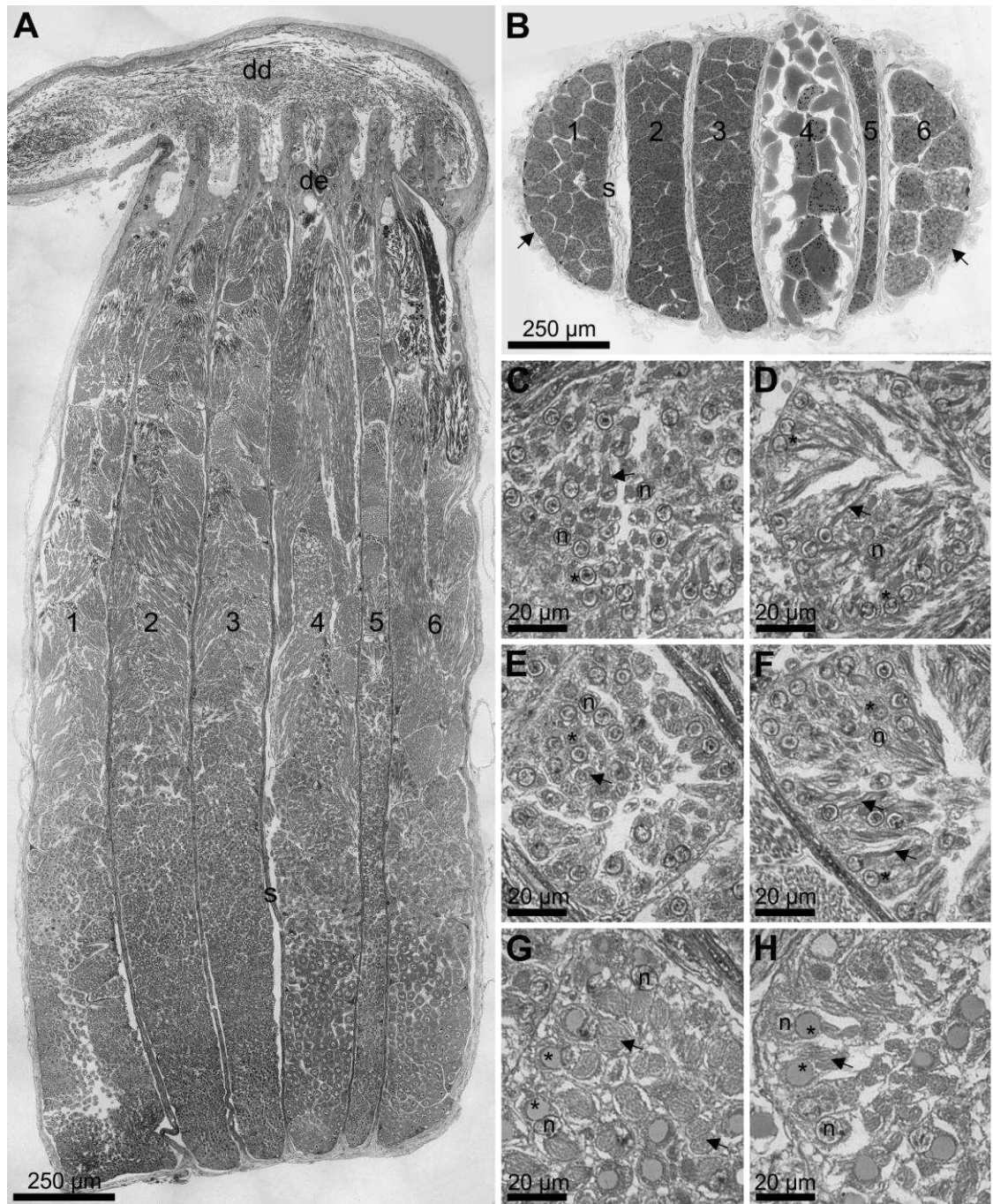
corte transversal, sendo que o folículo 5 tem a menor espessura (Fig. 1A-B). Eles são totalmente preenchidos por células germinativas agrupadas em cistos nas diferentes fases da espermatogênese, com os cistos mais adiantados próximos ao ducto eferente (Fig. 2A).

Os folículos 1, 2 e 3 são morfometricamente idênticos e sem diferença nos tamanhos dos cistos e das células germinativas quando na mesma fase da espermatogênese (Fig. 2A-D). Os folículos 4 e 6 apresentam os cistos e as células germinativas idênticos entre si, mas maiores do que aqueles dos demais cistos, entretanto apenas o folículo 4 é o de maior diâmetro (Fig. 2B,G,H). O folículo 5 é o mais estreito, mas os cistos e as células germinativas são idênticos aqueles dos folículos 1 a 3 (Fig. 2A,C,E,F). Os espermatozoides grandes (tipo 3) são produzidos pelos folículos 4 e 6, como é possível deduzir também pelos volumosos núcleos e complexos mitocondriais (Figs. 1A, 2G,H). Já os espermatozoides menores são produzidos nos folículos 1-3 e 5 e, como veremos mais a frente, a MET mostrou que os espermatozoides do tipo 1 são produzidos nos folículos 1-3, enquanto os do tipo 2 no folículo 5.

No final da espermatogênese, em todos os seis folículos, cada cisto produz até 512 células (Fig. 2B). Portanto, são oito ciclos de divisões celulares, sendo seis ciclos mitóticos e as duas divisões meióticas.



**Figura 1.** Espermatozoides de *E. heros* em microscopia de luz. **A, B)** Observe a grande diferença de espessura e, especialmente, comprimento entre o espermatozoide do tipo 1 (ou 2) (A) e o espermatozoide do tipo 3 (B). **C)** Observe que o núcleo do espermatozoides do tipo 1 ou 2 (seta branca), além de mais delgado, é no mínimo cinco vezes menor do que o núcleo do espermatozoide do tipo 3. (n) núcleo; (f) flagelo; (seta) região de transição núcleo-flagelo;



**Figura 2:** Testículo de *E. heros*. **A)** Secção longitudinal do testículo mostrando os seis folículos isolados por septos (s) terminando no ducto eferente (de) que chegam ao ducto deferente (dd). **B)** Secção transversal mostrando que os folículos têm formato aproximadamente achatados, são separados por septos (s) e os de número 4 e 6 tem

cistos maiores que os demais (setas). **C-F**) Cistos dos folículos 1, 2 e 3 (C, D) e 5 (E, F) com espermatídes jovens que se transformarão nos espermatozoides do tipo 1 e 2, respectivamente. **G-H**). Cistos dos folículos 4 e 6, respectivamente, com espermatídes jovens que se transformarão nos espermatozoides do tipo 3. Observar o grande diâmetro dos núcleos (n), dos complexos mitocondriais (setas) e a presença de uma terceira estrutura (asteriscos) que formará o acrossomo.

#### 4.2. Ultraestrutura dos espermatozoides

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que cada um dos três tipos de espermatozoides é facilmente reconhecível devido às acentuadas diferenças na morfologia de suas estruturas ao longo de todo o comprimento. Entretanto, os três tipos apresentam as mesmas estruturas comuns, como: (1) o paracristalino acrossomal paralela ao núcleo e núcleo com cromatina eletrodensa e compacta; (2) A região de transição núcleo-flagelo composta por um adjunto de centríolo denso que conecta o núcleo aos componentes do flagelo; (3) No flagelo, o axonema apresenta o padrão 9+9+2 microtúbulos, com os túbulos acessórios e o par central preenchidos por material E-PTA positivo (Fig. 6C-D), e contém abundante material intertubular (Fig. 6A, B); (4) Os derivados mitocondriais são simétricos, anteriormente iniciam logo acima da base do núcleo e cada um possui duas áreas paracristalinas e uma estreita ponte que o conecta ao axonema através do material intertubular. (5) No final do flagelo, os derivados mitocondriais terminam juntos e imediatamente antes do término do axonema.

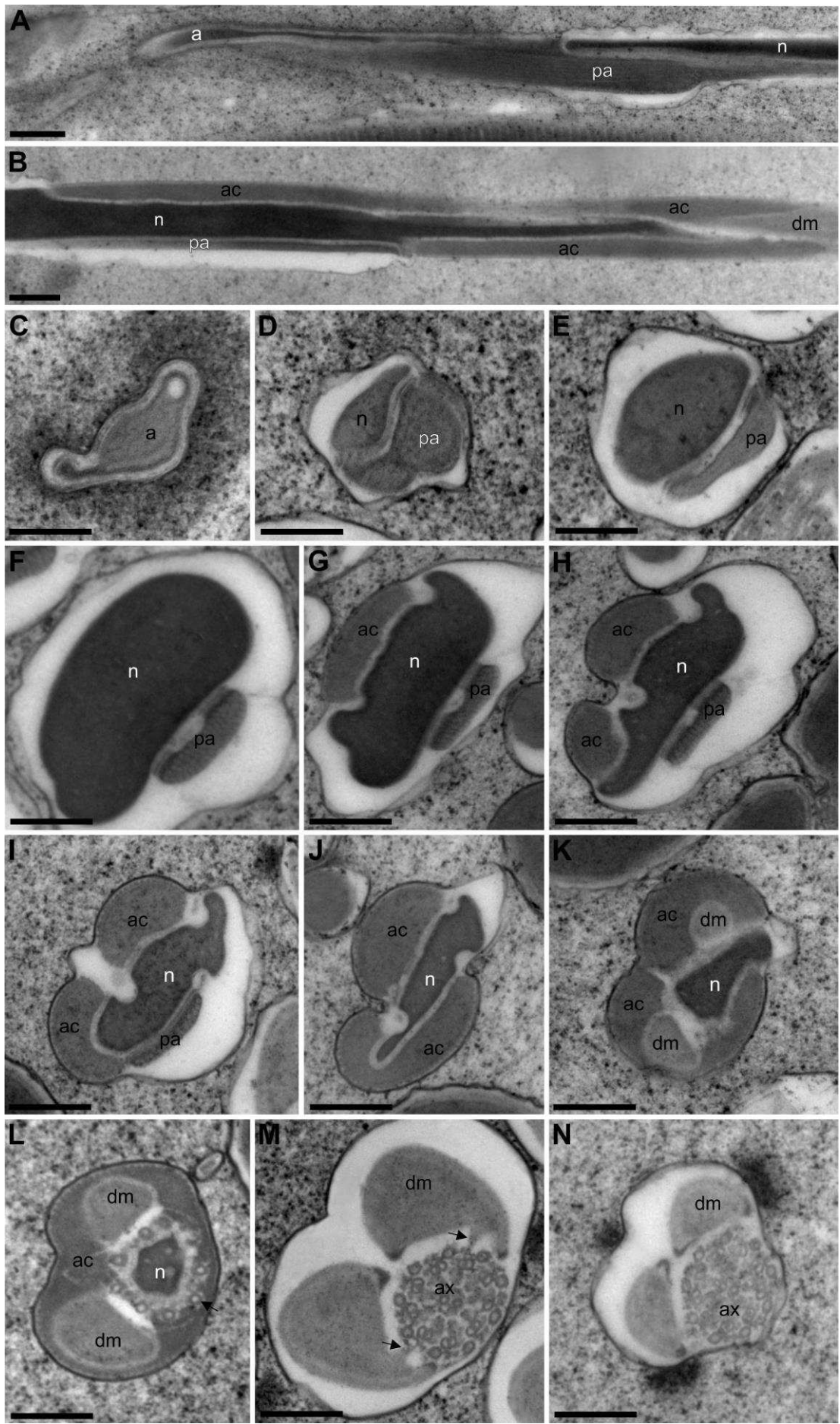
No espermatozoide do tipo 1 o complexo acrossomal é composto pela vesícula acrossomal, localizada à frente do núcleo, e um paracristalino acrossomal (Fig. 3A) que se inicia ao lado da vesícula, onde ela é bem mais espessa do que a vesícula (Fig. 3A). Mas, por volta de 6  $\mu\text{m}$  abaixo da ponta nuclear, essa estrutura reduz bruscamente de diâmetro (sendo bem menor do que o núcleo), torna-se achatada e percorre ao longo de quase todo o núcleo, conectado a ele pelas duas extremidades (Fig. 3F).

O núcleo mostra cromatina eletrodensa e compacta e, em corte transversal, ele é aproximadamente achatado, com um dos lados associado ao paracristalino acrossomal (Fig. 3F). Por volta de 5  $\mu\text{m}$  da sua base, o diâmetro começa a reduzir e, do lado oposto aquele associado ao paracristalino acrossomal, aparecem duas endentações, entre as quais surge adjunto do centríolo (Figs. 1C, 3G). Finalmente, ele termina com sua ponta inserida na extremidade anterior do axonema (Fig. 3L).

A região de transição núcleo-flagelo é marcada pela presença do adjunto do centríolo, o qual tem a extremidade anterior bastante assimétrica tanto longitudinal (Fig. 3B) como transversal (Fig. 3J). Ela começa 5  $\mu\text{m}$  acima da base do núcleo (Fig.

3B) e do lado oposto aquele associado ao paracristalino acrossomal (Fig. 3G). Em corte transversal observa-se que logo após o início ele apresenta uma constrição que praticamente o divide em duas partes também assimétricas (Fig. 3H). A medida que caminha em direção à extremidade posterior, uma dessas partes aumenta lateralmente até ficar lado a lado com o paracristalino acrossomal (Fig. 3I) e, quando a este termina, o adjunto praticamente circunda todo o núcleo (Fig. 3B, J, K). Em seguida, surgem as duas extremidade anteriores dos derivados mitocôndrias, cada uma praticamente circundada por uma das partes do adjunto do centríolo (Fig. 3K). Finalmente, surgem os microtúbulos acessórios do axonema, de modo que nesse nível são observados: a ponta do núcleo circundada pelo microtúbulos acessórios, as extremidade anteriores dos derivados mitocondriais e, todo esse conjunto, envolvido pelo adjunto do centríolo (Fig. 3L), o qual termina praticamente junto a base do núcleo e imediatamente antes do axonema está completo.

Os derivados mitocondriais surgem aproximadamente juntos, entre o núcleo e o adjunto de centríolo, na região de transição núcleo-flagelo (Fig. 3K). Inicialmente eles tem diâmetro bastante reduzido e, em corte transversal, são aproximadamente circular e assimétrico (Fig. 3K). e logo aumentam de diâmetro e tornam-se aproximadamente piriforme (Fig. 3L). No flagelo, os derivados mitocôndriais em corte transversal são simétricos, se posicionam lado a lado e envolve aproximadamente 2/3 do axonema (Fig. 3M). O material paracristalino 1 é irregular e tomada quase metade da área total (p1 na Fig. 6A), a qual é aproximadamente igual a do axonema.

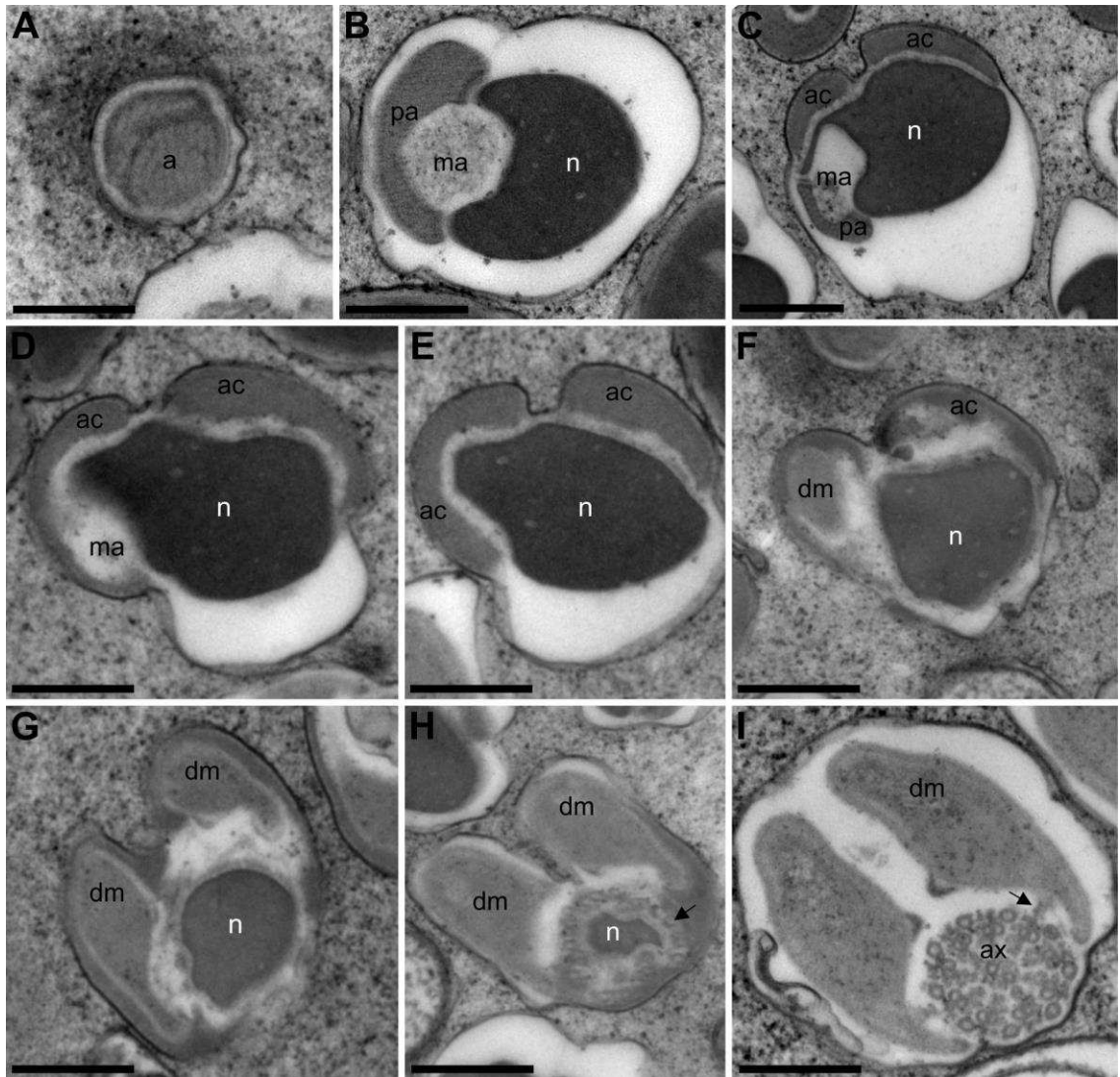


**Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão de espermatozoides do tipo 1 de *E. heros* em cortes longitudinais (A, B) e transversais (C–N). **A)** Extremidade anterior da cabeça mostrando o complexo acrossomal formado pela vesícula acrossomal (a) e o paracristalino acrossomal (pa) que se dispõem ao longo do núcleo (n). **B)** região de transição núcleo-flagelo. Observe o adjunto do centríolo (ac), de um lado, começando bem acima da base do núcleo (n) e do outro imediatamente abaixo da ponta do paracristalino acrossomal (pa). (dm) derivados mitocondriais. **C–E)** Extremidade anterior da cabeça, mostrando a vesícula acrossomal (a) acima da ponta do núcleo (C) e o paracristalino acrossomal (p) imediatamente abaixo (D) e após a redução de diâmetro (E). **F)** Região mediana do núcleo, o qual apresenta-se alongado e, associado a ele, o paracristalino acrossomal (p) pelas duas extremidades. **G–L)** Região de transição-núcleo flagelo. Observe que o adjunto do centríolo (ac) se inicia ao lado do núcleo oposto aquele associado ao paracristalino acrossomal, e que os dois derivados mitocondriais (dm) surgem praticamente juntos e parcialmente envolvido pelo adjunto do centríolo. A seta indica os microtúbulos acessórios. **M, N)** regiões mediana (M) e final (N) do flagelo. Observe as pontes (setas) que conectam os derivados mitocondriais o axonema (ax), o qual apresenta o padrão 9+9+2 microtúbulos. Barras = 0,2 µm.

Nos espermatozoides do tipo 2, assim como no tipo 1, o acrossomo inicia a frente do núcleo com o paracristalino acrossomal se estendendo ao lado de quase todo o núcleo (Fig. 4A-C). Ambas estruturas são formadas por material paracristalino e, em corte transversal, este paracristalino acrossomal tem a forma de C e está associada ao núcleo por suas extremidade (Fig. 4B,C). O núcleo inicialmente tem formato de ferradura, com a cavidade voltada para e associada ao paracristalino acrossomal por suas extremidades (Fig. 4B). Entre estas duas estruturas formam-se um espaço relativamente grande e, em corte transversal, circular que é preenchido por material amorfo (Fig. 4B).

Na região de transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo se inicia junto ao núcleo próximo ao paracristalino acrossomal (Fig. 4C), diferente do espermatozoide do tipo 1, onde adjunto inicia do lado nuclear oposto ao paracristalino acrossomal (ver Fig. 3G). Também como no espermatozoide do tipo 1, o adjunto do centríolo apresenta uma constrição que praticamente o divide em duas partes (Figs. 4C-E), sob as quais surgem os derivados mitocondriais (Fig. 4F). Nesta região, o núcleo, que é oval irregular, afila a medida que o diâmetro dos derivados mitocondriais aumentam (Fig. 4F-H). Neste espermatozoide, quando os primeiros microtúbulos do axonema surgem em volta da ponta do núcleo, o adjunto do centríolo já praticamente desapareceu (Fig. 4H).

No flagelo, os derivados mitocôndrias em corte transversal, como no espermatozoide do tipo 1, são simétricos, se posicionam lado a lado e envolve aproximadamente 2/3 do axonema. Entretanto, eles exibem o formato alongado e a área total é praticamente preenchida pelo material paracristalino 1 (p1 na Fig. 6D) e aproximadamente 1,5 vezes a área do axonema (Fig. 4I).



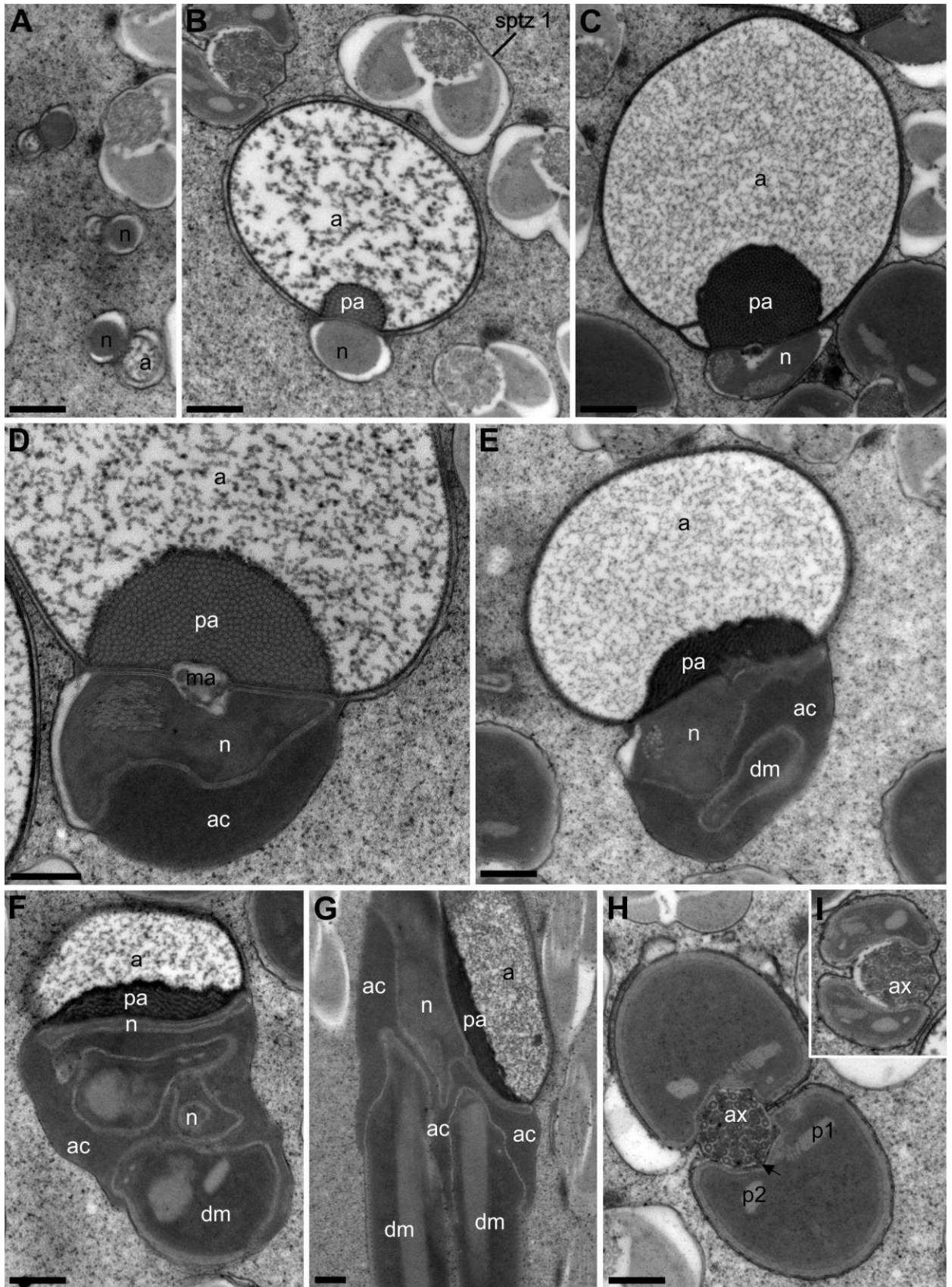
**Figura 4:** Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide do tipo 2 de *E. heros* em cortes transversais. **A)** Acrossomo (a) acima da ponta do núcleo. **B)** Região mediana da cabeça, mostrando que o núcleo (n) tem forma de ferradura e o paracristalino acrossomal (pa) de C, os quais ao se unirem pelas extremidades forma um espaço que é preenchido por material amorfo (ma). **C-H)** Região de transição-núcleo flagelo. Observe que o adjunto do centríolo (ac) se inicia junto ao núcleo e próximo ao paracristalino acrossomal (pa). (dm) derivados mitocondriais; (seta) microtúbulos acessório. **I)** região mediana do flagelo, mostrando que os derivados mitocondriais apresentam formato alongado. (ax) axonema; (seta) ponte ligando um dos derivados ao axonema. Barras = 0,2  $\mu\text{m}$ .

O espermatozoide do tipo 3, além de ser quase seis vezes mais longo do que os espermatozoides dos tipos 1 e 2, é o que apresenta diferenças ultraestruturais mais conspícuas. Nesse espermatozoide, o acrossomo acompanha o núcleo por toda a sua extensão (veja Fig. 5A e G). Na extremidade anterior, o núcleo e acrossomo, que começam juntos, apresentam os diâmetros muito reduzidos (menos de 100 nm) e os formatos circulares (Fig 5A). A medida que o núcleo e, especialmente, o acrossomo aumentam de diâmetro, este passa a ser formado por duas estruturas: uma circular, com diâmetro muito grande (em relação ao do núcleo) e quase totalmente preenchido por material amorfo; Internamente a esta, e na face justaposta ao núcleo, surge uma segunda estrutura semicircular (Fig. 5B) totalmente formada por material paracristalino

(Fig. 5C-F). O núcleo assume o formato semicircular com a face achatada complementar a aquela do paracristalino acrossomal, entre essas duas estruturas aparece um discreto material amorfo (Fig. 5C, D).

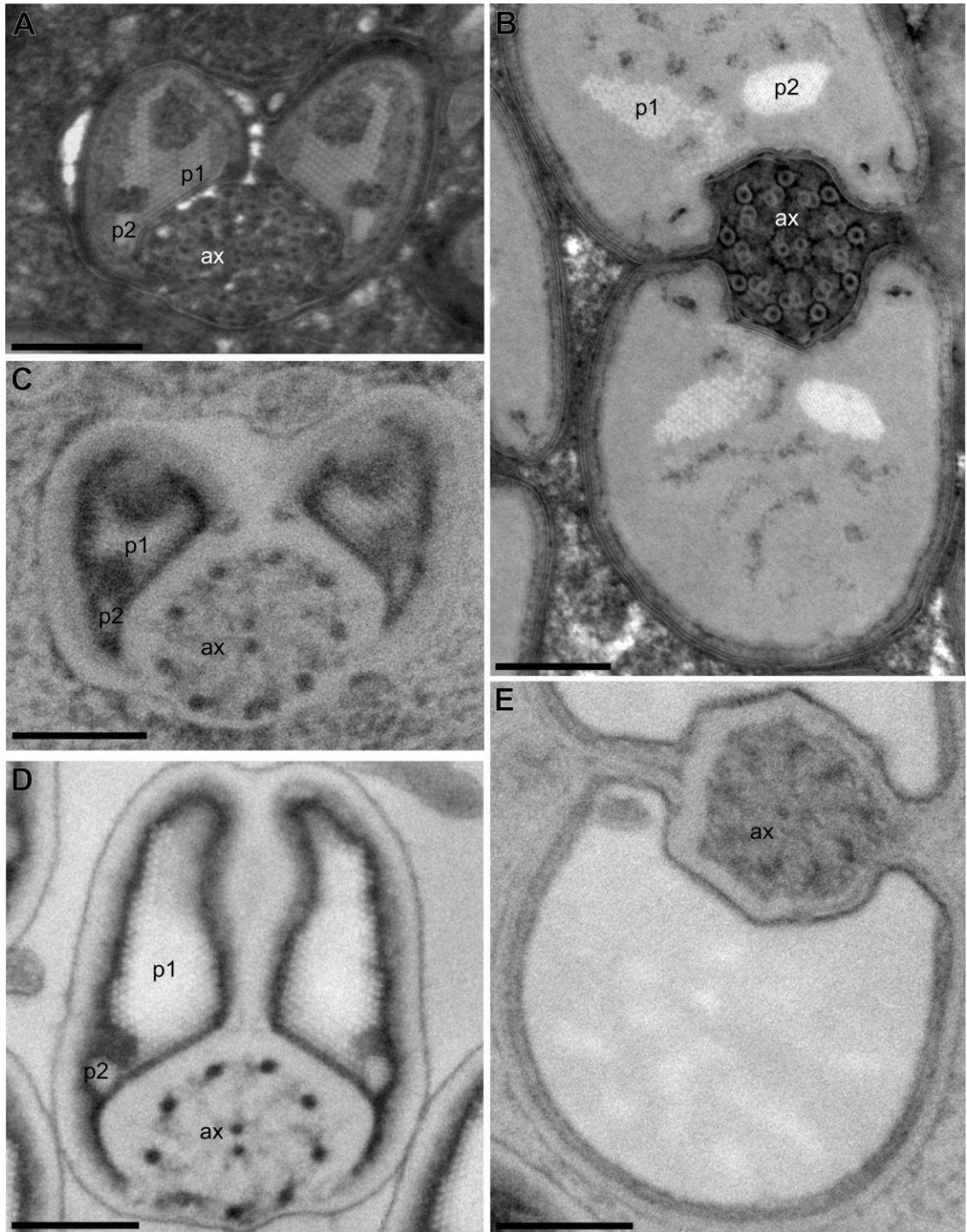
A região de transição núcleo-flagelo neste espermatozoide (que também é delimitada pelo adjunto do centríolo) é muito curta, medindo apenas por volta de 1,5  $\mu\text{m}$  (Fig. 5G). O adjunto do centríolo, que também é assimétrico, começa a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  acima da ponta do núcleo e do lado oposto ao do acrossomo (Fig. 5D, G). Em seguida surge a ponta de um dos derivados mitocondriais inserida nessa região do adjunto (Fig. 5E). Imediatamente abaixo, o adjunto do centríolo se projeta entre as pontas finais do núcleo e do acrossomo, onde se insere o início do outro derivado mitocondrial (Fig. 5F, G). Finalmente, o adjunto do centríolo termina a aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  abaixo da ponta do núcleo (Fig. G), onde se inicia o axonema.

No flagelo, os derivados mitocôndrias em corte transversal, como no espermatozoide dos tipos 1 e 2, são simétricos (Fig. 5H, I). Entretanto, exibem o formato semicircular, se dispõem em linha e circundam completamente o axonema (Fig. 5H). Eles são quase todo preenchido por material compacto, por isso E-PTA negativo (Fig. 6E), e a área de cada um é aproximadamente cinco vezes àquela do axonema. Considerando a área total dos derivados, as regiões paracristalinas 1 (p1) são bastante reduzidas (veja Fig. 6A-D).



**Figura 5:** Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide do tipo 3 de *E. heros* em cortes transversais (A-F, H-I) e longitudinal (G). **A, B** Extremidade anterior da cabeça. Observe que o acrossomo (a) e núcleo (n) começam praticamente juntos (A) e, logo em seguida, surge o paracrystalino acrossomal (pa). **C** Região mediana da cabeça. **D-G** Região de transição-núcleo flagelo. Observe como o adjunto do centríolo (ac) é bastante curto, não apresenta a constrição longitudinal e envolve as pontas final do núcleo e iniciais dos derivados

mitocondriais (dm). Note também que neste espermatozoide o acrossomo termina junto à base do núcleo. **H-I)** Regiões mediana (H) e final (I) do flagelo. Observe o grande diâmetro dos derivados mitocondriais e a disposição deles, inclusive em relação axoneme (ax). A seta indica a ponte que liga um dos derivados ao axonema. (p1 e p2) materiais paracristalinos. Barras = 0,2  $\mu$ m.



**Figura 6:** Flagelos em cortes transversais dos espermatozoides de *E. heros* do tipo 1 (A e C), do tipo 2 (D) e do tipo 3 (B e E), submetidos a técnica de glutaraldeído + ácido tânico (A, B) e E-PTA (C-E). (ax) axonema; (p1 e p2) materiais paracristalinos. Barras = 0,2  $\mu$ m.

## 5. Discussão

Espermatozoides polimórficos ocorre em alguns grupos de insetos e consiste na formação de dois ou mais tipos por um mesmo organismo (Swallow e Wilkinson, 2002). Estes espermatozoides podem variar em comprimento e estrutura (Jamieson et al., 1999). O polimorfismo em espermatozoides está presente nas ordens Diptera e Coleoptera onde são produzidos dois tipos de células germinativas (Sasakawa, 2009). Em alguns Hymenoptera são reportados a presença de espermatozoides com formatos diferentes (Swallow e Wilkinson, 2002) e em Lepidoptera a produção de espermatozoides nucleados e anucleados (Jamieson et al., 1999). Em Hemiptera, o polimorfismo é bastante comum e já foi identificado nas famílias Largidae (Araújo et al., 2012), Pentatomidae (Souza e Itoyama, 2010b; Araújo et al., 2011), Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2006) e Aethalionidae (Araújo et al., 2010).

A ultraestrutura geral dos espermatozoides de *E. heros* é similar ao que é descrito para Hemiptera, como cabeça contendo acrossomo e núcleo sustentado pelo adjunto de centríolo e flagelo composto por derivados mitocondriais simétricos e axonema com formação 9+9+2. A presença de pontes citoplasmáticas entre o axonema e os derivados mitocondriais é uma das sinapomorfias para Heteroptera e também é identificada no presente trabalho. A presença destas estruturas em flagelos são reportados por Araújo et al., (2011) em Pentatomidae, Bao e De Souza, (1994) em Reduviidae e segundo os últimos autores, estas estruturas estabilizam os componentes flagelares e com isso auxiliam na produção do batimento coordenado.

Em *E. heros*, os três tipos de espermatozoide apresentam-se ultraestruturalmente distinto em todas as regiões desde a cabeça até o flagelo, enquanto que no trabalho de Araújo et al., (2011) as espécies *Brontocoris tabidus*, *Podisus nigrispinus* e *Podisus distinctus* (Pentatomidae) produzem espermatozoides com dois comprimentos diferentes, mas foi observado diferença apenas nos diâmetros dos derivados mitocondriais. Assim, o polimorfismo espermático em Hemiptera parece variar muito mesmo entre espécies bastante próximas. Mas é necessário estudar um maior número de espécies para se desenhar com maior precisão a contribuição dessa característica nas análises filogenéticas e taxonômicas desse grupo de insetos.

Quando investigamos, à microscopia de luz (ML), o conteúdo de ovos imediatamente após a postura, observamos apenas a presença de espermatozoides curtos nesses ovos. Ainda, observando o conteúdo da espermateca de fêmeas após algum tempo da cópula, encontramos, dos espermatozoides grandes, apenas os núcleos. Assim, é possível supor que os espermatozoides que fertilizam os ovos são aqueles menores: os do tipo 1 e/ou do tipo 2. Entretanto, se considerarmos que os espermatozoides do tipo 2 são produzidos em apenas um (e no menor) folículo, é provável que os espermatozoides que fertilizam os ovos são aqueles do tipo 1, pois

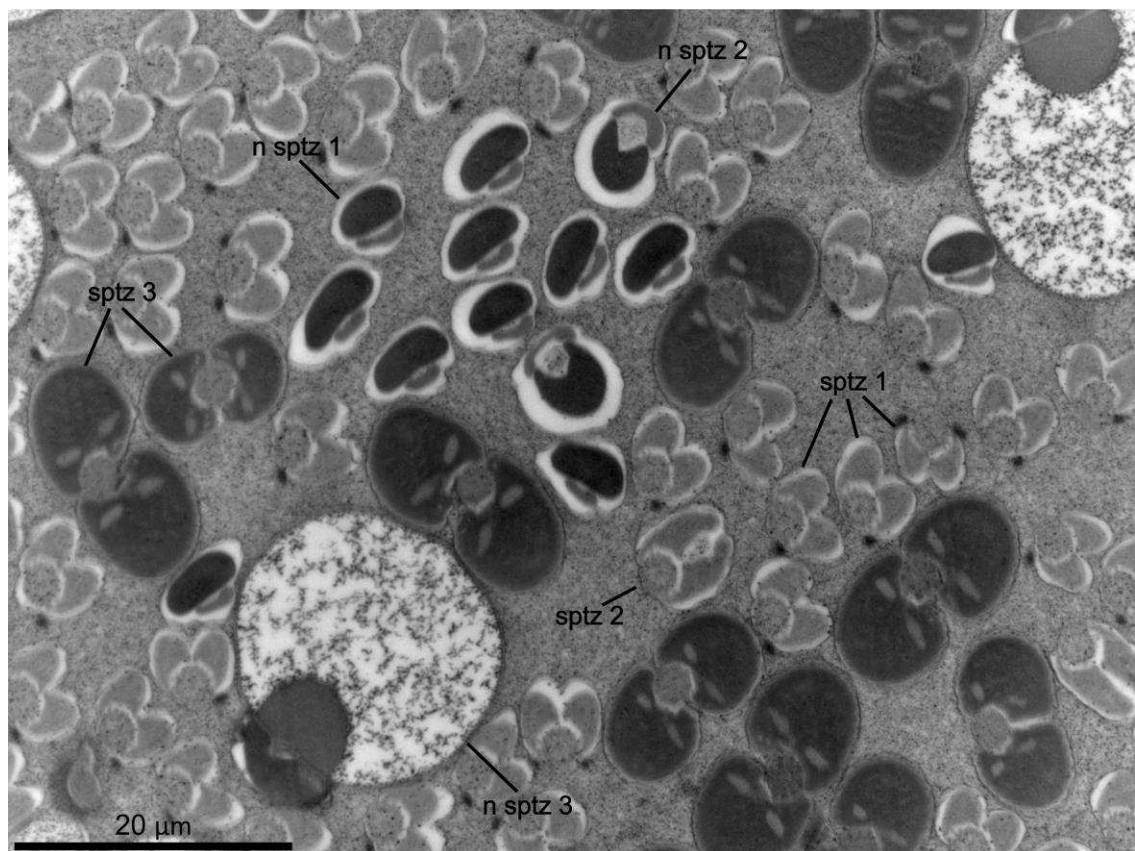
eles são produzidos por três folículos e, por isso, em grande quantidade. (Kubo-Irie et al., 2003), ao estudar o dimorfismo em espermatozoides de *Graptopsaltria nigrofuscata* Motschulsky (Cicadidae), relatam que nos ovos fertilizados foram encontrados somente os espermatozoides longos e atribuiu este resultado a algum gene mutado presente nos espermatozoides menores que impede a realização da fertilização, pois ambos os tipos são ultraestruturalmente iguais. Ainda dentro de Cicadidae, (Chawanji et al., 2006) relacionaram a fertilização dos ovos com espermatozoides longos devido a maior produção deste tipo de gameta. Embora seja necessário mais análises, nós concordamos com Higginson e Pitnick (2011) que propôs que apenas um dos tipos de espermatozoides produzidos é responsável pela fertilização. Portanto, essas alterações morfológicas são resultados de mutações que também tornam os espermatozoides inférteis. Ainda, por serem inférteis esses espermatozoides podem sofrer muito mais variações morfológicas do que aqueles responsáveis pela fertilização dos óvulos. Com isso, dependendo da espécie, eles podem ser menores ou maiores do que os espermatozoides viáveis. Isso explicaria porque em algumas espécies são os espermatozoides maiores que fertilizam os óvulos (Chawanji et al., 2006), já em outras, como *E. heros*, são os menores. Ainda, se por serem inviáveis a morfologia desses espermatozoides pode variar livremente, espera-se que eles apresentem um conjunto de caracteres que, possivelmente, seja espécie específico, tornando-se muito útil à taxonomia.

Várias funções tem sido propostas para os espermatozoides polimórficos (ver (Simmons, 2001; Pitnick et al., 2009): auxílio no deslocamento dos espermatozoides viáveis; estariam relacionados à competição espermáticas e/ou à nutrição dos espermatozoides viáveis, da fêmea ou do zigoto. Assim eles representariam um investimento parental do machos. Em *E. heros* pelo menos as funções deslocamento e nutrição podem ser consideradas, pois eles apresentam grande motilidade já na vesícula seminal e, quando na espermoteca da fêmea, os flagelos são fragmentados. Esta última função também foi proposta por (Schrader, 1960; Kasule, 1986) quando afirmam que em muitas espécies de Heteroptera as fêmeas obtêm nutrientes a partir dos espermatozoides durante a cópula, frequentemente na forma de grandes espermatozoides não-férteis.

A ultraestrutura do acrossomo, da região de transição núcleo-flagelo e dos derivados mitocondriais dos espermatozoides do tipo 1 de *E. heros* (Pentatomoidea) é idêntica àquela observada nos espermatozoides do Pyrrhocoroidea *L. rufipennis* (Araújo et al., 2012). Considerando que estas duas espécies pertencem a grupos filogeneticamente distantes dentro dos Heteroptera, essa correspondência ultraestrutural mostra que o espermatozoide do tipo 1 é bastante conservado,

provavelmente por ser ele o espermatozoide fértil o que confirmaria a nossa suposição acima.

Embora existem alguns trabalhos sobre a espermatogênese em *E. heros* (Fernandes et al., 2001; Souza e Itoyama, 2010b; a), este é o primeiro que identifica três tipos espermatozoides nessa espécie e descreve em detalhe a ultraestrutura de cada um deles. Essa identificação, assim como a origem de cada tipo só foi possível a partir da observação, à MET, dos folículos isolados. Assim, para futuros trabalhos, recomendamos um estudo preliminar em microscopia de luz dos espermatozoides a partir da vesícula seminal e, em seguida, a investigação ultraestrutural detalhada dos folículos separadamente. Ainda, se de fato nas espécies de Heteroptera que apresenta polimorfismo apenas um dos tipos de espermatozoide é viável, e por isso ele é morfológicamente mais conservado, sugerimos que nos trabalhos futuros os espermatozoides férteis sejam comparados entre si e separadamente da comparação entre os espermatozoides não viáveis.



**Figura 7:** Vesícula seminal de *E. heros* em microscopia eletrônica de transmissão. É possível notar os três tipos de espermatozoides em corte transversal. (sptz 1, 2 e 3) espermatozoides tipos 1, 2, e 3, respectivamente, (n sptz 1, 2, e 3) núcleos dos espermatozoides 1, 2 e 3.

## 6. Conclusões

Em *E. heros*:

- é produzido três tipos de espermatozoide (polimorfismo espermático) que os denominamos tipos 1, 2 e 3;
- o tipo 1 é produzido nos folículos de 1-3, o tipo 2 no folículo 5 e o tipo 3 nos folículos 4 e 6;
- os espermatozoides dos tipos 1 e 2 são iguais em comprimento e aproximadamente seis vezes menores do que os do tipo 3;
- o tipo 1 é produzido em maior quantidade e é o responsável pela fertilização dos ovos;
- a produção de três tipos de espermatozoides resulta em um conjunto de caracteres morfológico possivelmente espécie específico;

## 7. Perspectivas futuras

Verificar se:

- em todos os Heteroptera que apresentam polimorfismo as células não viáveis são produzidas a partir do folículo 4;
- nos Heteroptera que tem 3 folículos não apresenta dimorfismo;
- os espermatozoides dos três primeiros folículos são iguais e viáveis;

## 8. Referências Bibliográficas

- AFZELIUS, B. A.; DALLAI, R.; LINDSKOG, P. Spermatozoa of saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). **Journal of Ultrastructure Research**, v. 90, p. 304-312, 1985.
- ARAÚJO, V. A.; BÁO, S. N.; LINO-NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica**, v. 93, n. 2, p. 239-244, 2012. ISSN 1463-6395. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00559.x>>.
- ARAÚJO, V. A. et al. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). **Micron**, v. 41, n. 4, p. 306-11, Jun 2010. ISSN 1878-4291 (Electronic) 0968-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047835>>.
- ARAÚJO, V. A. et al. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). **Micron**, v. 42, n. 6, p. 560-7, Aug 2011. ISSN 1878-4291 (Electronic) 0968-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376606>>.
- BAO, S. N.; DE SOUZA, W. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). **Tissue Cell**, v. 26, n. 3, p. 299-308, Jun 1994. ISSN 0040-8166 (Print) 0040-8166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8073413>>.
- BÁO, S. N. et al. Spermiogenesis in three species of whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). **Acta Zoologica**, v. 78, n. 2, p. 163-170, 1997. ISSN 1463-6395. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6395.1997.tb01135.x>>.
- BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis. I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. **Biological Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 316-362, 1920. ISSN 00063185. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/1536656>>.
- \_\_\_\_\_. Studies on insect spermatogenesis. II. The components of the spermatid and their rôle in the formation of the sperm in Hemiptera. **Journal of Morphology**, v. 37, n. 1, p. 79-193, 1922a. ISSN 1097-4687. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1050370103>>.
- \_\_\_\_\_. Studies on insect spermatogenesis. IV. The phenomenon of polymegaly in the sperm cells of the family pentatomidae. **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**, v. 57, n. 16, p. 391-422, 1922b. ISSN 01999818. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/20025937>>.
- CHAWANJI, A. S.; HODGSON, A. N.; VILLET, M. H. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). **Tissue Cell**, v. 38, n. 6, p. 373-88, Dec 2006. ISSN 0040-8166 (Print) 0040-8166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083954>>.
- CIVIDANES, J. F.; PARRA, J. R. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 29, n. 12, p. 1841-1846, 1992.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 145-150, 2002. ISSN 1461-9563. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1461-9563.2002.00136.x>>.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Characteristics of the sperm structure in heteroptera (Hemiptera, Insecta). **Journal of Morphology**, v. 164, n. 3, p. 301-309, 1980. ISSN 1097-4687. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1051640306>>.
- \_\_\_\_\_. On zipper-lines or particle arrays within the plasma membrane of hemipteran spermatozoa (Heteroptera, Insecta). **J Ultrastruct Res**, v. 80, n. 2, p. 197-205, Aug

1982. ISSN 0022-5320 (Print) 0022-5320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7120538> >.
- DOLDER, H. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, v. 101, n. 2-3, p. 159-164, 11// 1988. ISSN 0889-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0889160588900055> >.
- FERNANDES, A. P. et al. Nuclear changes and acrosome formation during spermiogenesis in *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue and Cell**, v. 33, n. 3, p. 286-293, 6// 2001. ISSN 0040-8166. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816601901740> >.
- GILLOTT, C. **Entomology**. Third. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.: Springer, 2005. 831 ISBN 10 1-4020-3182-3.
- GOMES, M. O. et al. Morphological aspects of the testes of 18 species of terrestrial of Heteroptera from Northwestern São Paulo (Brazil). **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 131-135, 2013. ISSN 1676-0603. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-06032013000300131&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032013000300131&nrm=iso) >.
- GONÇALVES, T. C. M.; LENT, H.; ALMEIDA, J. R. Estudo anatomico e morfometrico dos folículos testiculares de Triatominae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 543-550, 1987.
- GRAZIA, J. et al. Hemiptera. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R., et al (Ed.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 1. Ribeirão Preto: Holos 2012. cap. 28, p.810. ISBN 978-85-86699-72-6.
- ITAYA, P. W.; THOMPSON, S. A.; HEIDGER JR, P. M. Fine structure of late stages of spermiogenesis in *Leptocoris trivittatus* Say (Hemiptera : Corizidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 9, n. 2, p. 135-145, // 1980. ISSN 0020-7322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020732280900495> >.
- JAMIESON, B. G. M. **The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. 1<sup>a</sup>. CUP Archive, 1987. ISBN 0521344417.
- JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. **Insects: their spermatozoa and phylogeny**. Science Publishers, Inc., 1999. ISBN 1578080401.
- KASULE, F. K. Repetitive mating and female fitness in *Dysdercus cardinalis* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 88, n. 2, p. 191-199, 1986. ISSN 1096-3642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-3642.1986.tb01187.x> >.
- KUBO-IRIE, M. et al. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 11, p. 983-991, 11// 2003. ISSN 0022-1910. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191003001616> >.
- LEE, Y. H. Spermatogenesis of the water strider, *Gerris paludum* (Heteroptera, Gerridae). **Journal of Ultrastructure Research**, v. 90, n. 3, p. 235-250, 1985. ISSN 0022-5320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022532085800022> >.
- PANIZZI, A. R. Wild hosts of Pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 99-122, 1997. ISSN 0066-4170 (Print) 0066-4170 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012309> <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.ento.42.1.99> >.
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S., et al (Ed.). **Soja:**

**manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga.** Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap. 5, p.859. ISBN 978-85-7035-139-5.

- PANIZZI, A. R.; NIVA, C. C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 29, n. 3, p. 509-511, 1994.
- PANIZZI, A. R.; OLIVEIRA, É. D. M. Performance and seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (pigeonpea) and soybean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, n. 2, p. 169-175, 1998. ISSN 1570-7458. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00359.x> >.
- PANIZZI, A. R.; VIVAN, L. M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in overwintering sites, and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 82, n. 2, p. 213-217, 1997. ISSN 1570-7458. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00132.x> >.
- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **The Journal of cell biology**, v. 44, n. 2, p. 243, 1970.
- PITNICK, S.; HOSKEN, D. J.; BIRKHEAD, T. R. 3 - Sperm morphological diversity. In: BIRKHEAD, T. R.; HOSKEN, D. J., *et al* (Ed.). **Sperm Biology**. London: Academic Press, 2009. p.69-149. ISBN 978-0-12-372568-4.
- SASAKAWA, K. Marked sperm dimorphism in the ground beetle *Scarites terricola*: a novel type of insect sperm polymorphism. **Physiological Entomology**, v. 34, n. 4, p. 387-390, 2009. ISSN 1365-3032. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.2009.00694.x> >.
- SCHRADER, F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). **Evolution**, v. 14, n. 4, p. 498-508, 1960. ISSN 00143820. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/2405998> >.
- SIMMONS, L. W. **Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects**. Princeton: Princeton university press, 2001. ISBN 0-691-05987-x.
- SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative study of spermatogenesis and nucleolar behavior in testicular lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche**, v. 2010, 2010a. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2010/428673> >.
- \_\_\_\_\_. Study of acrosome formation, interspecific and intraspecific, in the testicular lobes of some pentatomid species. **J Insect Sci**, v. 10, p. 132, 2010b. ISSN 1536-2442 (Electronic) 1536-2442 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883131> >.
- SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in insects. **Biological Reviews**, v. 77, n. 2, p. 153-182, 2002. ISSN 1469-185X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S1464793101005851> >.
- TAYLOR, V. A.; LUKE, B. M.; LOMAS, M. B. The giant sperm of a minute beetle. **Tissue and Cell**, v. 14, n. 1, p. 113-123, // 1982. ISSN 0040-8166. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040816682900118> >.