

ANA PAULA DE ALMEIDA CAIXEIRO

**CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE QUATRO ESPÉCIES DE
ODONATA (INSECTA)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C138c
2012

Caixeiro, Ana Paula de Almeida, 1973-
Características espermáticas de quatro espécies de Odonata
(Insecta) / Ana Paula de Almeida Caixeiro. – Viçosa, MG,
2012.
x, 61f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Lino Neto
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Libélula. 2. Libélula - Morfologia. 3. Libélula -
Espermatozóides. 4. Inseto. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.733

ANA PAULA DE ALMEIDA CAIXEIRO

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE QUATRO ESPÉCIES DE
ODONATA (INSECTA)

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

APROVADA: 13 de agosto de 2012.

Irani Quagio Grassiotto

Lúcio Antônio de Oliveira Campos

Mariana Machado Neves

Uyrá dos Santos Zama

José Lino Neto
(Orientador)

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.

Mahatma Gandhi

Aos meus pais, Luiz Geraldo Caixeiro e Sônia M. de Almeida Caixeiro.
Ao meu companheiro, Pedro Franco de Oliveira.
Aos meus irmãos, Luiz Gustavo (Guto), Luiz Fernando (Nando) e Ana Elisa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sônia Maria de Almeida Caixeiro e Luiz Geraldo Caixeiro, que sempre me apoiaram, pelo amor e carinho. Aos meus irmãos: Ana Elisa, Luiz Gustavo (Guto), Luiz Fernando (Nando), pelo apoio e amizade. Amo vocês!

A meu companheiro e amado Pedro, pelo amor, companheirismo, carinho, amizade e apoio. Pela enorme paciência nos momentos em que estive ausente e nos momentos de tensão e angústia.

Aos meus sogros, José Teixeira de Oliveira (*in memoriam*) e Mírian d'Arc Franco de Oliveira, cunhados e concunhados, pelo apoio e incentivo.

Ao professor José Lino Neto, orientador e amigo, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio, pelo incentivo, pelas longas conversas, pelos momentos de descontração e pela hospitalidade.

A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural, Cláudia, Luiz Fernando, Edalton, Vinícius, Jane, Patrícia, Max, Glenda e Helen, pela troca de conhecimento, pelos momentos compartilhados e pela amizade.

Agradeço especialmente à Cláudia Vânia Oliveira (Claudinha) e Luiz Fernando Gomes (Fernandinho), pela amizade e pelo enorme apoio sempre que necessário, vocês foram essenciais para a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao professor Lúcio A. O. Campos, pelos ensinamentos, pelas sugestões, pelos conselhos e pela amizade. Às Professoras Mariana

Machado Neves e Juliana Silva Rocha pela amizade e pelo apoio. Mary muito obrigada pela hospitalidade!

Aos meus amigos do UnilesteMG, Tania, Cleber, Flávia, Isabela, Alice, Bianca, Simone, Edmar, Trycia, Michele, Sandra, Ana Cristina (Kiki), Ana Laura, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelo incentivo e pelo apoio nas minhas ausências. Tania, muito obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelo apoio e pela ajuda nos momentos em que precisei me ausentar.

Às pessoas e instituições que colaboraram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral (UFV-DBG) e ao Centro Universitário do Leste de Minas - unilesteMG pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, em especial o coordenador, professor José Eduardo Serrão, e a secretária, Elizabeth Alves Pena (Beth), pela atenção, competência e educação com que sempre trabalham para o bom funcionamento do Curso e atendimento as necessidades dos estudantes.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, pelo ensino de qualidade, pelas trocas de conhecimentos e pela amizade.

Aos membros da banca de qualificação, professores José Lino Neto, Lucio Antonio de Oliveira Campos, Clóvis Andrade Neves, Uyrá dos Santos Zama e Mariana Machado Neves, pelas avaliações e sugestões.

Aos membros da banca da tese, professores José Lino Neto, Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Irani Quagio Grassiotto, Uyrá dos Santos Zama e Mariana Machado Neves pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, nas pessoas de Cláudia Vanetti, Karla Ribeiro, Gilmar Valente e Patrícia Fonseca, pela atenção e ajuda sempre que solicitadas.

À professora Sílvia Pompolo, pelo livre acesso permitido no uso do fotomicroscópio.

À Karina Schmidt Furieri, pelo auxílio nas coletas e na identificação das espécies.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, em especial Alex Bhering e José Luís Monteiro, pela atenção e ajuda sempre que requisitadas.

Às amigas de “república”, Hiara, Gisele e Fabiana pelo ótimo convívio e pela amizade.

Às companheiras de estrada, Gisele, Gláucia, Daniele, Carol, Pâmela e outras que me fizeram companhia nessas idas e vindas a Viçosa.

BIOGRAFIA

ANA PAULA DE ALMEIDA CAIXEIRO, filha de Luiz Geraldo Caixeiro e Sônia Maria de Almeida Caixeiro, nasceu em 01 de março de 1973, em Ipatinga, Estado de Minas Gerais.

Em setembro de 1996, graduou-se em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 1999, concluiu o mestrado em Genética e melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em agosto de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. A Ordem Odonata	1
1.2. Morfologia Geral dos Espermatozoides de insetos.....	3
2. OBJETIVOS	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
3. CAPÍTULOS	12
3.1. Capítulo 1: Estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de <i>Ischnura fluviatilis</i> Selys, 1876 (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae).....	12
Resumo.....	13
1. Introdução.....	14
2. Material e Métodos.....	15
3. Resultados.....	16
4. Discussão.....	24
5. Referências Bibliográficas.....	26
3.2. Capítulo 2: Estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de Libellulidae (Odonata, Anisoptera).....	30
Resumo.....	31
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	33
3. Resultados.....	34
4. Discussão.....	52
5. Referências Bibliográficas.....	55
4. CONCLUSÕES GERAIS	59

RESUMO

CAIXEIRO, Ana Paula de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Características espermáticas de quatro espécies de Odonata (Insecta)**. Orientador: José Lino Neto.

A ordem Odonata compreende cerca de 5500 espécies e é atualmente dividida em três subordens: Zygoptera, que compreende 19 famílias; Anisozygoptera, contendo táxons fósseis e apenas um gênero vivente com duas espécies; e Anisoptera, que compreende 9 famílias e apresenta a maior riqueza em espécies na ordem. Eles estão entre os insetos alados mais basais. Os mais antigos registros fósseis datam do Carbonífero médio, sendo, provavelmente, o grupo que apresenta o maior número de representantes extintos. A monofilia das subordens ainda é discutida, assim como as relações filogenéticas entre as famílias que as constituem. As características ultraestruturais dos espermatozoides tem se mostrado promissoras para análises filogenéticas em muitos grupos de insetos, porém trabalhos deste tipo ainda são inexistentes para Odonata. Assim, este trabalho teve como objetivo descrever a estrutura e a ultraestrutura dos espermatozoides de espécies de duas subordens de Odonata: Zygoptera e Anisoptera, buscando informações que possam auxiliar na compreensão da sistemática deste grupo de insetos. Para isso, espermatozoides de vesículas seminais e testículos de machos adultos de *Ischnura fluviatilis* (Zygoptera), *Pantala flavescens*, *Tramea abdominalis* e *Micrathyria hesperis* (Anisoptera) foram preparadas para microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides dessas espécies possuem algumas características semelhantes às aquelas apresentadas pelos espermatozoides da maioria dos Pterygota. No entanto, algumas características diferenciais se destacam: ausência de perforatorium no acrossomo e de material paracristalino nos derivados mitocondriais; flagelo extremamente curto, possivelmente imóvel, com derivados mitocondriais pequenos nas espécies de Libellulidae (Anisoptera); e ausência de corpos acessórios e arranjo microtubular 9+9+0 nas espécies da subfamília Trameinae. A análise da ultraestrutura dos espermatozoides permitiu a diferenciação das duas subordens de Odonata, assim como das espécies das duas subfamílias de Libellulidae estudadas.

ABSTRACT

CAIXEIRO, Ana Paula de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012. **Sperm characteristics of four species of Odonata (Insecta)**. Adviser: José Lino Neto.

The order Odonata includes about 5500 species and is currently divided into three suborders: Zygoptera, comprising 19 families; Anisozygoptera containing fossil taxa and only one living genus with two species, and Anisoptera, which comprises nine families and has the highest wealth species in order. They are among the most basal winged insects. The oldest fossil records of Odonata dating from the Middle Carboniferous, and probably is the group that presents the greatest number of representatives extinct. The monophyly of the suborders is still discussed as well as the phylogenetic relationships among families that constitute them. The ultrastructural features of the sperm has shown promise for phylogenetic analyzes in many insect groups, but such studies are still lacking for Odonata. Thus, this study aimed to describe the structure and ultrastructure of spermatozoa of species of Odonata suborders: Zygoptera and Anisoptera, searching for information that would assist in understanding the systematics of this group of insects. For this, sperm from seminal vesicles and testes of adult males of the *Ischnura fluviatilis* (Zygoptera), *Pantala flavescens*, *Tramea abdominalis* e *Micrathyria hesperis* (Anisoptera) were prepared for light and transmission electron microscopy. The sperm of these species have some characteristics similar to those presented by the sperm of most Pterygota. However, some differential characteristics stand out: lack of perforatorium in the acrosome and of paracrystalline material in the mitochondrial derivatives; flagellum very short, possibly immobile with small mitochondrial derivatives inspecies of Libellulidae (Anisoptera); and lack of accessories bodies and microtubule arrangement 9+9+0 in species of the Trameinae subfamily. The analysis of the ultrastructure of spermatozoa enabled the differentiation of the two suborders of Odonata, as well as, the species of two Libellulidae subfamilies studied.

1. Introdução Geral

1.1. Ordem Odonata

A ordem Odonata compreende cerca de 5500 espécies e é atualmente dividida em três subordens (Corbet, 1962 e 1999; Silsby, 2001): Zygoptera, com cerca de 2.600 espécies distribuídas em 19 famílias, Anisozygoptera, contendo táxons fósseis e apenas um gênero vivente com duas espécies, e Anisoptera, com aproximadamente 2.900 espécies distribuídas em 9 famílias (International Dragonfly fund, 2003; Rehn, 2003). No Brasil, foram identificadas 654 espécies pertencentes às subordens Zygoptera (famílias Dicteriadidae, Amphypterigidae, Polythoridae, Megapodagrionidae, Protoneuridae, Lestidae, Coenagrionidae, Perilestidae e Pseudoestigmatidae) e Anisoptera (famílias Aeshnidae, Gomphidae, Corduliidae e Libellulidae) (Garrison, 2000; Paulson, 2002; Hamada e Oliveira, 2003). As afinidades entre as superfamílias de Odonata estão representadas na figura 1.

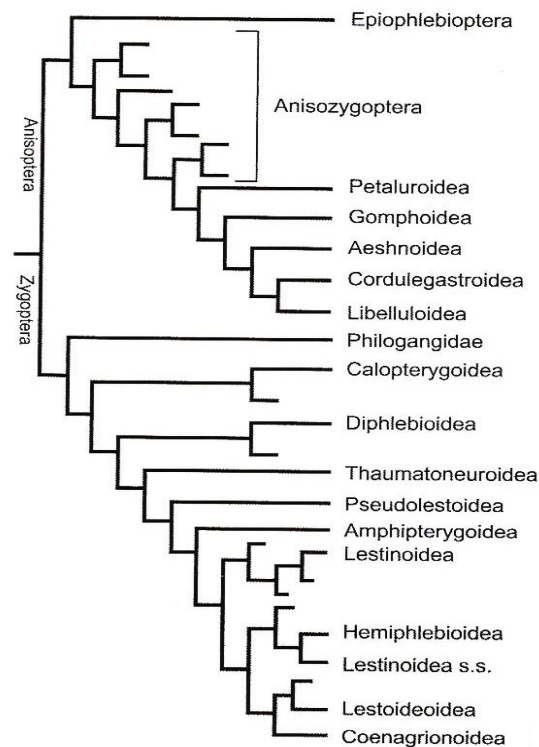


Figura 1. Cladograma representando as afinidades entre as superfamílias de Odonata. Fonte: modificado de Rehn (2003) por Grimaldi & Engel (2005).

Segundo Triplehorn e Johnson (2005), insetos pertencentes às três subordens apresentam olhos compostos grandes e multifacetados, que ocupam a maior parte da cabeça, antenas curtas, aparelho bucal do tipo mastigador e asas alongadas e membranosas. A subordem Zygoptera é composta por odonatos tipicamente pequenos e esbeltos, com abdômen delgado, cabeça achatada anterolateralmente e olhos amplamente separados. Possuem asas anteriores e posteriores pecioladas e semelhantes em relação à forma (Corbet, 1999; Hovmöller, 2006). A subordem Anisoptera é composta tipicamente por insetos grandes e robustos, possuindo asas anteriores e posteriores com formato diferente. Em algumas espécies desta subordem a asa anterior apresenta uma base muito expandida em direção à asa posterior, o que facilita o ato de planar e assim a migração por longas distâncias (Corbet, 1999). Na subordem Anisozygoptera, as duas espécies de *Epiophlebia* descritas apresentam características morfológicas e comportamentais intermediárias entre aquelas dos Zygoptera e dos Anisopteras (Rueppell e Hilfert, 1993).

Os estágios imaturos são aquáticos e os adultos são normalmente encontrados próximos da água. Todos os estágios são predadores e se alimentam de vários insetos e de outros organismos, como insetos transmissores de doenças. Dentre estes são presas os Culicidae (Diptera) *Aedes* L. e *Anopheles* Meigen, que transmitem agentes patogênicos causadores da dengue e da malária, respectivamente, podendo ser usados para o controle biológico destes. Além disso, certos grupos também são úteis como indicadores da qualidade do ambiente (Sebastian et al., 1990; Triplehorn e Johnson, 2005; Costa et al., 2012).

Os insetos desta ordem são peculiares por apresentarem algumas características associadas ao comportamento copulatório especializado. Os machos possuem dois conjuntos de estruturas reprodutivas separadas, um aparelho copulatório secundário na face ventral dos segmentos abdominais II e III, onde se localiza o pênis ou edeago, e um aparelho reprodutor primário nos últimos segmentos abdominais, onde se encontra o par de testículos e dutos espermáticos e a vesícula seminal, que estoca os espermatozoides até que estes sejam transferidos para o aparelho

copulatório secundário antes da cópula (Triplehorn e Johnson, 2005; Hovmöller, 2006; Gullan e Cranston, 2010; Costa et al., 2012).

A cópula, por sua vez, é caracterizada pela posição em *tandem*, na qual o macho segura a fêmea pela parte de trás da cabeça ou do protórax utilizando os apêndices do final do abdômen, e esta, então, dobra seu abdômen ventralmente para frente e ajusta o orifício genital no segmento II do abdômen do macho, onde se encontra o aparelho copulador, permitindo a transferência dos espermatozoides (Triplehorn e Johnson, 2005; Gullan e Cranston, 2010; Costa et al., 2012).

Os Odonata estão entre os insetos voadores mais basais (Kristensen, 1991, Kjer, 2004). Os mais antigos registros fósseis datam do Carbonífero médio (350 milhões de anos atrás), sendo, provavelmente, o grupo que apresenta o maior número de representantes extintos (Grimaldi e Engel, 2005; Costa et al., 2012).

Vários estudos tentam explicar as relações filogenéticas dentro de Odonata utilizando dados moleculares (Artiss et al., 2001; Weekers et al., 2001; Jordan et al., 2003; Misof e Fleck, 2003; Saux et al., 2003; Kjer, 2004; Dumont et al., 2005; Hasegawa e Kasuya, 2006; Ware et al., 2007 e 2008; Bybee et al., 2008; Fleck et al., 2008) e de morfologia externa (May, 2002; Rehn, 2003). Porém, ainda existem muitas controvérsias a cerca da sua posição filogenética. Segundo Bybee *et al.* (2008), a monofilia das subordens de Odonata ainda é discutida, assim como as relações filogenéticas entre as superfamílias e famílias que as constituem (Costa et al., 2012).

1.2. Morfologia geral dos espermatozoides em insetos

Os espermatozoides na maioria dos insetos são muito longos e finos, podendo variar de 1,7 μm de comprimento, como no térmita *Reticulitermes lucifugus* (Baccetti et al., 1981), a 58.000 μm , como em *Drosophila bifurca* (Pitnick et al., 1995). Na maioria das vezes, distingue-se a região da cabeça e do flagelo, que apresentam aproximadamente o mesmo diâmetro.

A cabeça é formada, anteriormente, pelo acrossomo e, posteriormente, pelo núcleo. O acrossomo, em grande parte dos insetos, é uma estrutura glicoproteica cônica ou em forma de bastão, composto por uma vesícula acrossomal e um perforatorium, o qual tem a base inserida em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo. O perforatorium é uma estrutura observada no acrossomo de vários pterigotas (Jamieson et al., 1999). Entretanto em alguns insetos esta estrutura não é observada, como Plecoptera e Diptera (Jamieson et al., 1999), assim como em Grylloblattodea (Dallai et al., 2005) e Ephemeroptera (Baccetti et al., 1969; Gaino e Mazzini, 1991; Brito, 2012).

O núcleo, que frequentemente é alongado e ocupa a maior parte da região da cabeça, geralmente apresenta a cromatina muito eletrondensa e compacta. Na região de transição núcleo-flagelo encontra-se o adjunto do centríolo, uma estrutura eletrondensa, cilíndrica e compacta, localizada paralelamente ao flagelo entre a base do núcleo e a extremidade anterior dos derivados mitocondriais (Chapman, 1998; Jamieson et al., 1999; Landim, 2009).

O flagelo dos espermatozoides de insetos varia grandemente em comprimento e em detalhes de sua organização, sendo formado pelo axonema e, geralmente, por dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. O axonema apresenta uma estrutura microtubular básica constituída por nove pares de microtúbulos que circundam dois microtúbulos simples e centrais, associados, na maioria das espécies, a nove microtúbulos acessórios periféricos, que podem apresentar um número variado de protofilamentos em diferentes espécies (Baccetti, 1972; Chapman, 1998; Jamieson et al., 1999)

Os derivados mitocondriais são estruturas alongadas, paralelas ao axonema, que geralmente contém inclusões paracristalinas, podendo ou não ser iguais em diâmetro e comprimento. Segundo Baccetti (1972), Chapman (1998) e Jamieson et al. (1999), a presença de dois derivados mitocondriais é uma característica da maioria dos insetos com algumas exceções, como em espécies de Ephemeroptera (Brito, 2012) e Scelionidae (Hymenoptera) (Lino-Neto e Dolder, 2001), nas quais apenas um derivado está presente.

Os corpos acessórios são estruturas alongadas situadas entre o axonema e os derivados mitocondriais, de origem e função ainda não determinadas (Baccetti, 1972; Chapman, 1998; Jamieson et al., 1999). Na maioria dos insetos são observados dois corpos acessórios, de acordo com Jamieson et al. (1999), mas pode-se observar apenas um, como em algumas espécies de Ephemeroptera (Brito, 2012) ou nenhum, como em algumas vespas Parasíticas (Lino-Neto et al., 2000a; Lino-Neto e Dolder, 2001a, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009) e em alguns dipteras (Jamieson et al., 1999; Dallai et al., 2007; Name et al., 2010).

Na maioria das espécies de insetos, os espermatozoides são alongados e móveis. Entretanto, Siva-Jothy (1997) observou, em microscopia de luz, dois tipos de espermatozoides em espécies de diferentes famílias de Odonata: espermatozoides curtos, lanceolados e imóveis em Libellulidae, Cordulidae e Macromiidae (Anisoptera), e espermatozoides longos, com flagelo evidente e móveis em Epiophlebiidae, Gomphidae, Petaluridae, Cordulegastridae e Aeshnidae (Anisoptera), e em Platycnemididae, Coenagrionidae, Lestidae e Calopterygidae (Zygoptera).

Os poucos estudos envolvendo a ultraestrutura dos espermatozoides de Odonata mostram que estes seguem àquela organização considerada básica para os Pterygota, como observado nos Zygoptera *Enallagma cheliferum* (Gama et al., 1976), *Calopteryx haemorrhoidalis* (Rosati et al., 1976) e *Calopteryx* sp. (Dallai e Afzelius, 1990) e nos Anisoptera *Aeschna grandis* (Kessel, 1966 e 1970) e *Libellula depressa* (Rosati et al., 1976). No entanto, estes trabalhos não fornecem uma descrição completa da ultraestrutura dos espermatozoides dessas espécies.

Características estruturais e ultra-estruturais dos espermatozoides vêm sendo largamente utilizadas em estudos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Dallai e Afzelius, 1990, 1995; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto e Dolder, 2001; Dallai et al., 2002, 2004 e 2006; Alves et al., 2006; Mancini et al., 2006 e 2009).

Apesar de existirem trabalhos utilizando dados morfológicos tradicionais e de biologia molecular, ainda há dúvidas em relação à taxonomia e filogenia da ordem Odonata. A morfologia dos espermatozoides tem sido usada como dado complementar para a análise filogenética em

muitos grupos de insetos, porém ainda não há trabalhos utilizando esse tipo de dado para Odonata. Dessa forma, estudos sobre a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de espécies desta ordem poderão fornecer dados importantes, que, juntamente com dados morfológicos e moleculares, contribuirão para uma melhor compreensão da filogenia do grupo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Descrever a morfologia dos espermatozoides de diferentes espécies de duas subordens de Odonata, visando contribuir com informações que possam auxiliar na compreensão da filogenia e sistemática deste grupo de insetos.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Ischnura fluviatilis* (Zygoptera: Coenagrionidae),
- Descrever a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides das seguintes espécies da subordem Anisoptera: *Mycrathiria hesperis*, pertencente à subfamília Brachydiplacinae, *Tramea abdominalis* e *Pantala flavescens*, ambas pertencentes à subfamília Trameinae.

Referências Bibliográficas

- Artiss T, Schultz T R, Polhemu, D A, Simon C. 2001. Molecular phylogenetic analysis of dragonfly genera *Libellula*, *Ladona* and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I and 16S rRNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18, 348-361.
- Alves I, Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H. 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 87, 131-139.
- Baccetti B. 1972. Insect sperm cells, *Advances in insect physiology*, 9, 315-397.
- Baccetti B, Dallai R, Callaini G. 1981. The spermatozoa of arthropoda, *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 3, 87-99.
- Bybee S M, Ogden T H, Branham M A, Whiting M F. 2008. Molecules, morphology and fossils: a comprehensive approach to odonate phylogeny and the evolution of the odonate wing. *Cladistics*, 24, 477-514.
- Chapman R F. 1988. *The insects: structure and function*. 4. ed. New York: Cambridge University Press. 770pp.
- Conrad K F. & Pritchard G. 1992. An ecological classification of odonate mating systems: The relative influence of natural, inter- and intra-sexual selection on males. *Biological Journal of the Linnean Society*, 45, 255-269.
- Corbet P S. 1962. *A Biology of Dragonflies*. London: Witherby.
- Corbet P S. 1999. *Dragonflies: Behavior and Ecology of Odonata*. Ithaca, NY: Comstock Publ. Assoc.
- Dallai R. & Afzelius B A. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *Journal of Structural Biology*, 103, 164-179.
- Dallai R, Lupetti P, Carapelli A, Frati F, Afzelius B A. 2002. Sperm structure and spermiogenesis in *Atelura formicaria* Heyden (Zygentoma, Insecta). *Acta Zoologica*, 83, 245-262.
- Dallai R, Carapelli A, Nardi F, Fanciulli P P, Lupetti P, Afzelius B A, Frati F. 2004. Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletidae, Zygentoma, Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in Zygentoma. *Tissue & Cell*, 36, 233-244.

- Dallai R, Lombardo B M, Lupetti P. 2007. Sperm ultrastructure in Chironomoidea (Insecta, Diptera). *Tissue & Cell*, 39, 179-194.
- Fleck G, Ullrich B, Brenk M, Wallnisch C, Orland M, Bleidissel S, Misof B. 2008. A phylogeny of anisopterous dragonflies (Insecta, Odonata) using mtRNA genes and mixed nucleotide/doublet models. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(4), 310-322.
- Gama V, Zaha A, Cruz-Landim C, Ferreira A. 1976. Ultraestrutura da espermiogênese e do espermatozóide de *Enallagma cheliferum* Selys, 1875 (Coenagrionidae: Odonata). *Anais da Academia brasileira de Ciências*, 48, 313-324.
- Garrison R W. 2000. A synonymic list of the New World Odonata. <http://www.calopteryx.de/idf/index.html>.
- Grimaldi D. & Engel, M S. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, New York, NY.
- Gullan P J. & Cranston P S. 2010. *The insects: an outline of entomology*. 4.ed. Wiley-Blackwell: Oxford.
- Hamada N. & Oliveira S J. 2003. Food items of larvae of *Rimanella arcana* (Needham, 1933) (Odonata: Amphipterygidae) in Central Amazonia, Brazil. *Entomotropica*, 18, 153-155.
- Hovmöller R. 2006. *Molecular phylogenetics and taxonomic issues in dragonfly systematics (Insecta: Odonata)*. Department of zoology, Stockholm University. 59pp.
- International Dragonfly Fund. 2003. World species list. www.iori/idf.org.
- Jamieson B G M, Dallai R, Afzelius B A. 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. New Hampshire: Science Publishers, Inc. 555pp.
- Jordan S, Simon C, Polhemus D. 2003. Molecular systematics and adaptive radiation of Hawaii's endemic damselfly genus *Megalagrion* (Odonata: Coenagrionidae). *Systematic Biology*, 52, 89-109.
- Kessel R G. 1966. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. *Journal of Ultrastructure Research*, 16, 293-304.
- Kessel R G. 1970. Spermiogenesis in the dragonfly with special reference to a consideration of the mechanisms involved in the development of cellular asymmetry, in: *Comparative spermatology*, Ed. B. Baccetti, New York: Academic Press, 531-554.
- Kjer K M. 2004. Aligned 18S and insect phylogeny. *Systematic Biology*, 53, 506-514.

- Landim C C. 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP. 408pp.
- Mancini K, Lino-Neto J, Campos L A O, Dolder H. 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insects Sociaux*, 53, 333-338.
- Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H, Dallai R. 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Structure & Development*, 38, 54-59.
- May M L. 2002. Phylogeny and taxonomy of the damselfly genus *Enallagma* and related taxa (Odonata: Zygoptera; Coenagrionidae). *Systematic Entomology*, 27, 387-408.
- Misof B. & Fleck G. 2003. Comparative analysis of mt LSU rRNA secondary structures of Odonates: structural variability and phylogenetic signal. *Insect Molecular Biology*, 12, 535-547.
- Paulson D R. 2002. List of the Odonata of South America, by country. <http://www.ups.edu/biology/museum/ODofSA.html>.
- Pitnick S, Spicer G S, Markow T A. 1995. How long is a giant sperm? *Nature*, 375, 109-109.
- Rehn A C. 2003. Phylogenetic analysis of higher-level relationship of Odonata. *Systematic Entomology*, 28, 181-239.
- Rueppell G. & Hilfert D. 1993. The flight of the relict dragonfly *Epiophlebia superstes* (Selys) in comparison with that of the modern odonata (Anisozygoptera: Epiophlebiidae). *Odonatologica*, 22, 295-309.
- Rosati F, Selmi G, Mazzini M. 1976. Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 8, 51-67.
- Saux C, Simon C, Spicer G S. 2003. Phylogeny of the dragonfly and damselfly order Odonata as inferred by mitochondrial 12s ribosomal RNA sequences. *Annals of the Entomological Society of America*, 96, 693-699.
- Sebastian A, Sein M M, Thu M M, Corbet P S. 1990. Suppression of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) using augmentative release of dragonfly larvae (Odonata: Libellulidae) with community participation in Yangon, Myanmar. *Bulletin of Entomological Research*, 89, 223-232.
- Siva-Jothy M T. 1997. Odonate ejaculate structure and mating systems. *Odonatologica*, 26(4), 415-437.

Silsby J. 2001. Dragonflies of the World. Washington: Smithsonian Institution Press. 216pp.

Triplehorn C A & Johnson N F. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the study of insects. 7. ed. Thomson Brooks/Cole, USA.

Weekers P H H, De Jonckheere J F, Dumont H J. 2001. Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. Molecular Phylogenetics and Evolution, 20, 89-99.

Capítulo 1

3.1. Estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Ischnura fluviatilis* Selys, 1876 (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae)

Resumo

A ultraestrutura de espermatozoides tem sido usada em análises filogenéticas de muitos grupos de insetos, porém em Odonata apenas poucas espécies tiveram alguns caracteres ultraestruturais descritos. Assim, neste trabalho geramos dados estruturais dos espermatozoides de *Ischnura fluviatilis* (Odonata, Zygoptera), buscando contribuir em análises filogenéticas desse grupo de insetos. Para isso, espermatozoides de machos adultos foram extraídos das vesículas seminais, espalhados em lâminas histológicas e fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2. Para análise da ultraestrutura, vesículas seminais foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. As medidas do núcleo e do comprimento total dos espermatozoides foram feitas usando o programa "Image-Pro Plus". Os espermatozoides de *I. fluviatilis* são alongados e espiralados, medindo em torno de 50 µm de comprimento, com as regiões de cabeça e flagelo facilmente diferenciadas. A região de cabeça compreende o acrossomo e o núcleo. O acrossomo é coniforme em corte longitudinal e circular em corte transversal. Ele é em monocamada e eletrondenso, principalmente em sua periferia basal. No centro é preenchido por áreas amorfas e eletrólucidas que, possivelmente, representam invaginações da membrana a partir da região basal do acrossomo e dispostas helicoidalmente. O núcleo, com 8 µm de comprimento, é circular em corte transversal e alongado em corte longitudinal e tem a cromatina homogeneamente condensada e eletrondensa. Um adjunto do centríolo conecta o núcleo às estruturas flagelares. O flagelo é composto pelo axonema, de padrão microtubular 9+9+2, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Os derivados mitocondriais possuem a região periférica com cristas bem regulares e a região central bem heterogênea, com estruturas globulares eletrondensas, áreas mais elétrón lúcidas e áreas com a mesma densidade das cristas. Em corte transversal eles são aproximadamente simétricos em diâmetro e formato. Ambos se iniciam na base do núcleo e flanqueiam o axonema ao longo de quase todo o flagelo. Os corpos acessórios exibem o formato de meia lua, envolvem parcialmente o axonema em lados opostos, e são aproximadamente tão longos quanto os derivados mitocondriais. A morfologia geral dos espermatozoides de *I. fluviatilis* é semelhante àquela observada na maioria dos Pterygota e nas espécies de Odonata já estudadas. Algumas características observadas nesta espécie, como a ausência de perforatorium e derivados mitocondriais sem material paracristalino, que também foram observadas em Ephemeroptera, podem ser atribuídas aos Palaeoptera.

Palavras-chave: Libélula, morfologia, Palaeoptera, inseto.

1. Introdução

Os Odonata, que compreendem as subordens Zygoptera, Anisoptera e Anisozygoptera, estão entre os insetos pterigotos mais basais. Os mais antigos registros fósseis datam do Carbonífero (360-290 milhões de anos atrás), sendo, provavelmente, o grupo que apresenta o maior número de representantes extintos (Grimaldi e Engel, 2005).

As relações filogenéticas dentro de Odonata têm sido recentemente estudadas com base em dados moleculares (Artiss et al., 2001; Weekers et al., 2001; Jordan et al., 2003; Misof e Fleck, 2003; Saux et al., 2003; Kjer, 2004; Hasegawa e Kasuya, 2006; Bybee et al., 2008; Fleck et al., 2008) e morfológicos (May, 2002; Rehn, 2003). Porém, ainda existem muitas controvérsias a cerca de sua sistemática. Segundo Bybee et al. (2008), a monofilia das subordens ainda é discutida, assim como as relações filogenéticas entre as famílias que as constituem.

A morfologia dos espermatozoides tem sido usada como dado complementar para a análise filogenética em muitos grupos de insetos (Dallai e Afzelius, 1990 e 1995; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto e Dolder, 2001a e 2001b; Alves et al., 2006; Mancini et al., 2006 e 2009; Zama et al., 2007; Dallai et al., 2007, 2010a e 2010b; Oliveira et al., 2010; Araújo et al., 2011; Lupetti et al., 2011; Brito et al., 2011; Moreira et al., 2012), porém ainda não há esse tipo de dado disponível para Odonata. Por isso, a importância de se estudar a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de espécies desta ordem, buscando fornecer dados que, juntamente com aqueles de morfologia externa e moleculares, possam contribuir para estudos filogenéticos do grupo.

Os poucos estudos envolvendo a ultraestrutura dos espermatozoides de Odonata mostram que estes seguem àquela considerada básica para os Pterygota, como observado no Zygoptera *Enallagma chelifera* (Gama et al., 1976), *Calopteryx haemorrhoidalis* (Rosati et al., 1976), *Calopteryx* sp. (Dallai e Afzelius, 1990) e nos Anisoptera *Aeschna grandis* (Kessel, 1966 e 1970) e *Libellula depressa* (Rosati et al., 1976). No entanto, estes trabalhos não fornecem uma descrição completa da ultraestrutura dos espermatozoides dessas espécies.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo gerar dados estruturais e ultraestruturais dos espermatozoides de *Ischnura fluviatilis* (Odonata, Zygoptera), buscando contribuir em análises filogenéticas desse grupo de insetos.

2. Material e métodos

Machos adultos de *Ischnura fluviatilis* foram coletados, com o auxílio de rede entomológica, nas proximidades de corpos d'água localizados no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

2.1. Microscopia de luz

Vesículas seminais foram dissecadas e os espermatozoides foram espalhados em lâminas histológicas e fixados com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 15 minutos à temperatura ambiente. Para medir o comprimento total dos espermatozoides, parte das preparações foi corada com Giemsa por 15 min. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em fotomicroscópio Olympus BX-50. Para a medição dos núcleos, algumas preparações foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão PBS por 20 minutos e examinadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX-50, equipado com um filtro de excitação BP360-370 nm. As medidas de 50 espermatozoides e 50 núcleos foram feitas usando o programa *Image-Pro Plus*, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA).

2.2. Microscopia eletrônica

Ductos espermáticos e vesículas seminais foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5% nesse mesmo tampão, acrescido de 3% de sacarose e 0,2% ácido pícrico por 24 h a 4 °C. O material, após lavado em tampão, foi

pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, por 2 h, à temperatura ambiente. Em seguida foi desidratado usando soluções com concentrações crescentes de acetona e incluído em resina Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 2% em solução de hidróxido de sódio 1N e observados com um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 906.

3. Resultados

Tanto nos ductos quanto nas vesículas seminais foram observados espermatozoides individualizados, não agrupados em feixes. Eles são alongados e espiralados, medindo em torno de 50 μm de comprimento, com as regiões de cabeça e de flagelo facilmente diferenciáveis (Fig. 1 A e B). A região da cabeça é composta pelo acrossomo e núcleo e a do flagelo pelo axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios.

O acrossomo encontra-se conectado a extremidade anterior do núcleo e tem o formato cônico (Fig. 1 C) e circular em corte transversal (Fig. 1 D). Ele é em monocamada, sem perforatorium, e eletrondenso, principalmente em sua periferia basal. No centro é preenchido por áreas amorfas e eletrólucidas que, possivelmente, representam invaginações da membrana a partir da região basal do acrossomo e dispostas helicoidalmente (Fig. 1 C e D).

O núcleo mede 8 μm de comprimento e é alongado (Fig. 1 A e B) e circular em corte transversal (Fig. 1 E). Ele se mostra eletrondenso, com a cromatina homogênea e condensada (Fig. 1 C, E e G), e termina abruptamente tanto em sua extremidade anterior quanto na posterior (Fig. 1 C, F, G e H), na qual observa-se uma pequena projeção lateral que se conecta à ponta anterior do axonema (Fig. 1 G, seta).

O adjunto de centríolo, que conecta o núcleo às estruturas flagelares, é eletrondenso e se inicia logo abaixo da extremidade posterior do núcleo (Fig. 1F-H). Ele envolve a região do centríolo (Fig. 1 F) e projeta-se entre os derivados mitocondriais e o axonema na porção inicial do flagelo (Figs. 1 H e 2 D) e, em seguida, entre os derivados mitocondriais (Fig. 2 C e

E), terminando antes destes (Fig. 2 F). Em secção transversal, esta estrutura parece estar conectada aos componentes do flagelo por meio de discretas pontes, possivelmente, proteicas (Fig. 2 D, setas).

O axonema apresenta o padrão microtubular 9+9+2, com nove microtúbulos acessórios mais externos, seguidos de nove duplas e um par central (Fig. 2 F e G). Entre os microtúbulos acessórios observa-se um material eletrondenso (Fig. 2 G, cabeça de seta). Observa-se também a presença dos elementos radiais, que associam os microtúbulos centrais às duplas. O axonema inicia-se junto à base do núcleo (Fig. 1 G) e se estende helicoidalmente ao longo de todo flagelo (Fig. 2 A), sendo o último componente a terminar na extremidade posterior do flagelo.

Os derivados mitocondriais são bem desenvolvidos, com diâmetro cerca de três vezes maior que o do axonema (Fig. 2 E). Ambos os derivados se iniciam na base do núcleo (Fig. 1 H) e flanqueiam o axonema ao longo de quase todo o flagelo (Fig. 2 A, D-F e H). Em secções transversais eles são ovais e aproximadamente simétricos, com o diâmetro diminuindo gradativamente ao longo do flagelo (Fig. 2 D-F e H). As cristas mitocondriais, que ocupam a região periférica dos derivados, são bem regulares que, em secções longitudinais, apresentam-se organizadas paralelamente umas às outras e perpendiculares ao eixo longitudinal do derivado, com uma periodicidade de cerca de 43 nm (Fig. 2 B, setas). A região central dos derivados é heterogênea, com estruturas globulares eletrondensas, áreas mais eletrólúcidas e áreas com a mesma densidade das cristas, provavelmente constituídas por projeções destas (Figs. 1 F e H, 2 A, B, D-F, asterisco), entretanto nenhuma inclusão paracristalina foi observada nestas organelas.

Os corpos acessórios são bem desenvolvidos, eletrondensos e exibem o formato de meia lua. Iniciam-se na porção anterior do flagelo, envolvem parcialmente o axonema em lados opostos (Fig. 2 D-F), e são aproximadamente tão longos quanto os derivados mitocondriais. Eles parecem conectar-se ao adjunto do centríolo (Fig. 2 D, setas) e, em seguida, aos derivados mitocondriais (Fig. 2 E, setas). O espermatozoide de *Ischnura fluviatilis* é representado no esquema mostrado na Fig. 3.

Figura 1. Fotomicrografia de luz (A e B) e de eletrônica de transmissão (C-H) de espermatozoides de *Ischnura fluviatilis*. (A) Espermatozoide corado com GIEMSA. A cabeça de seta indica a transição da cabeça (c) e flagelo (f). (B) Núcleo (n) do espermatozoide corado com DAPI. (C) Secção longitudinal da região anterior do espermatozoide mostrando o acrossomo (a), com a região periférica eletrondensa (pe) e as invaginações da membrana basal (ib), e o núcleo (n). (D) Secção transversal do acrossomo mostrando a região periférica mais eletrondensa (pe) e as invaginações da membrana basal do acrossomo (ib). (E) Secção transversal do núcleo. (F-H) Secções longitudinais da região de transição núcleo-flagelo. Note o adjunto de centríolo (ac), os derivados mitocondriais (dm) e o axonema iniciando logo abaixo da extremidade posterior do núcleo (n). A seta mostra a projeção lateral na extremidade posterior do núcleo que se conecta à ponta anterior do axonema (G). Observe a disposição helicoidal dos componentes do flagelo (H). mp- membrana plasmática; ca- corpo acessório; ac- adjunto de centríolo; cr- cristas mitocondriais; asterisco- região central heterogênea dos derivados mitocondriais. Barras: (A e B) = 4 μm ; (C) = 0,5 μm ; (D) = 0,2 μm ; (E) = 0,3 μm ; (F-H)= 0,5 μm .

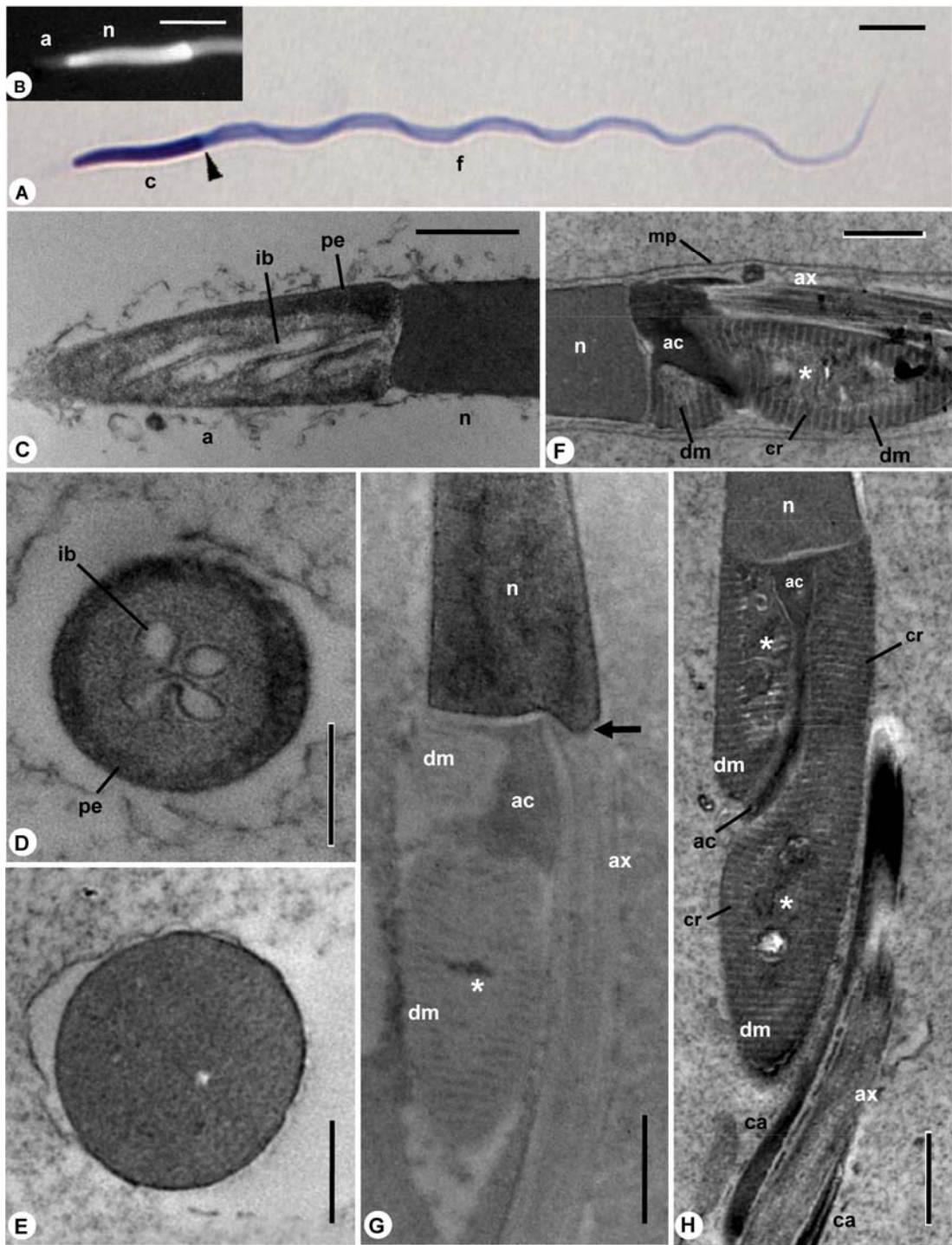


FIGURA 1

Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de espermatozoides de *Ischnura fluviatilis*. (A e B) Secções longitudinais do flagelo. Note a disposição helicoidal dos derivados mitocondriais (dm), do axonema (ax) e dos corpos acessórios (ca). Observe, nos derivados mitocondriais, a região periférica, com cristas (cr), e a central, heterogênea (asteriscos) (A). Setas negras mostram as cristas mitocondriais regulares e os asteriscos a região central heterogênea dos derivados mitocondriais. Seta branca mostra a projeção do adjunto de centríolo entre os derivados mitocondriais (dm) (B). (C a H) Secções transversais do flagelo. Detalhe mostrando a projeção do adjunto de centríolo (ac) entre os derivados mitocondriais (dm) (C). Região anterior do flagelo com dois derivados mitocondriais (dm), dois corpos acessórios (ca), o axonema (ax) e o adjunto de centríolo (ac). Setas negras apontam pontes de material eletrondenso ligando cada corpo acessório ao adjunto de centríolo (D) e ao derivado mitocondrial adjacente (E e F). Região mediana do flagelo com dois derivados mitocondriais (dm), dois corpos acessórios (ca) e o axonema (ax) (E e F). Detalhe de secção transversal do axonema mostrando o par de microtúbulos centrais (pc), as duplas de microtúbulos (d), os microtúbulos acessórios (ma), os elementos radiais (er), o material intertubular (it), aparentemente ligado ao microtúbulo acessório adjacente por pontes de material eletrondenso (cabeças de seta) (G). Região final do flagelo com os dois derivados mitocondriais (dm), o vestígio dos corpos acessórios (ca) e o axonema (ax) (H). Barras: (A e B) = 1 μm ; (C a F) = 0,2 μm ; (G e H) = 0,1 μm .

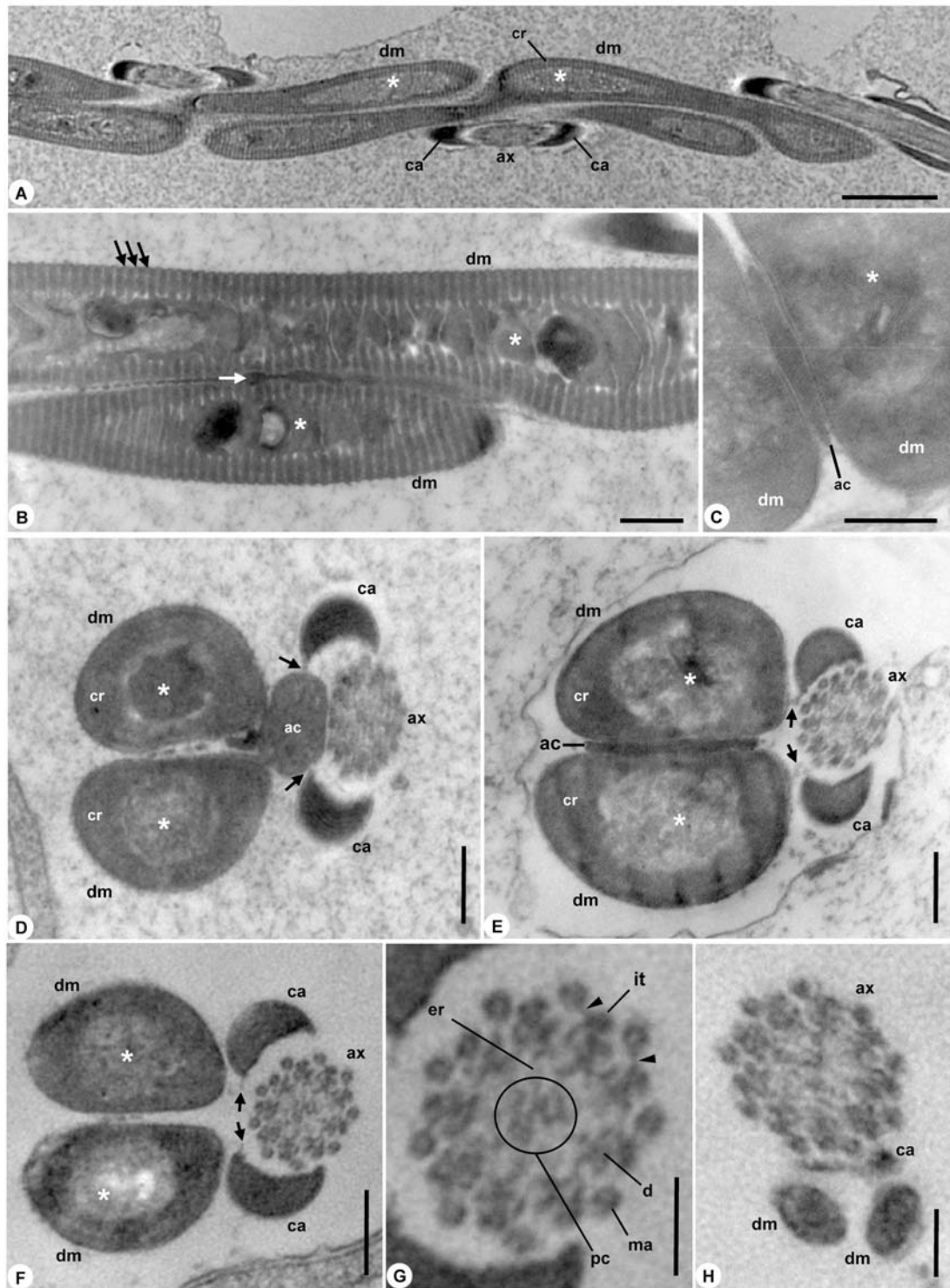


FIGURA 2

Figura 3. Representação esquemática do espermatozoide de *Ischnura fluviatilis*, mostrando o acrossomo (a), com a região periférica eletrondensa (pe) e as invaginações da membrana basal (ib), e o núcleo (n). A região de transição núcleo-flagelo, com o adjunto de centríolo (ac), os derivados mitocondriais (dm), o axonema (ax) e os corpos acessórios (ca) iniciando logo abaixo da extremidade posterior do núcleo (n). Observe a disposição helicoidal dos componentes do flagelo. Setas mostram as cristas mitocondriais regulares e os asteriscos a região central heterogênea dos derivados mitocondriais. Barra = 0,5 μm .

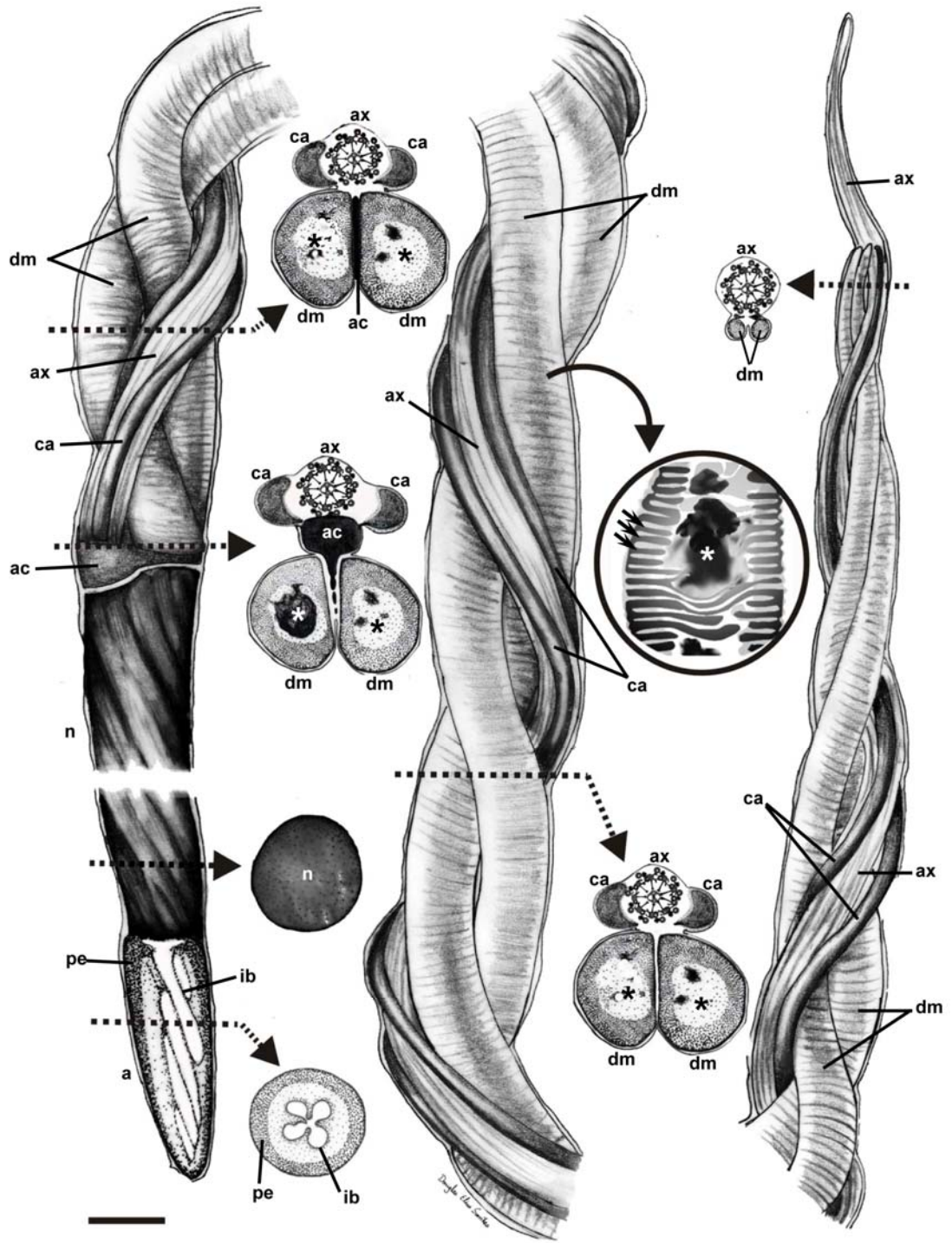


FIGURA 3

4. Discussão

A morfologia geral dos espermatozoides de *I. fluviatilis*, observados no presente estudo, é semelhante àquela observada na maioria dos pterigotas e nas espécies de Odonata já estudadas (Jamieson et al., 1999; Rosati et al., 1976), destacando-se as seguintes características: (1) regiões de cabeça e flagelo diferenciáveis, (2) núcleo alongado e com cromatina homogênea e eletrondensa, (3) presença de um adjunto de centríolo, (4) axonema de padrão 9+9+2, (5) presença de dois derivados mitocondriais e (6) presença de dois corpos acessórios. Entretanto, algumas características observadas em *I. fluviatilis* se destacam.

O comprimento dos espermatozoides de *I. fluviatilis*, com cerca de 50µm, difere daqueles observados por Siva-Jothy (1997) em outras espécies de Coenagrionidae, bem como para outras famílias de Zygoptera, como Platycnemididae, Lestidae e Calopterygidae, para as quais relatou um comprimento de 25 a 30µm, mostrando a importância de estudos da morfologia dos espermatozoides de outras espécies desta subordem.

Em Odonata, o acrossomo sem perforatorium, em monocamada, e conforme também foi observado em outros Anisoptera, como *Aeshna juncea* (Aeschnidae) (Fig. 13 e 14 em Abro, 1998) e em três espécies de Libellulidae (observação pessoal). A ausência de perforatorium também foi observada em Ephemeroptera (Brito, 2012), mostrando que possivelmente esta é uma característica compartilhada entre estas duas ordens, ambas pertencentes ao clado Palaeoptera.

Invaginações da membrana a partir da região basal do acrossomo, como aquelas visualizadas em *I. fluviatilis* e relatadas para outros odonatas (Jamieson et al., 1999), não são observadas em *Aeshna juncea* (Anisoptera) (Fig. 13 e 14 em Abro, 1998) e mostraram-se diferentes das observadas em espécies de Libellulidae (Anisoptera), nas quais elas são laterais (observação pessoal). Estas diferenças mostram que esta característica poderá ser importante na sistemática de Odonata.

Invaginações da membrana a partir da região basal do acromosso também foram observadas no Ephemeroptera *Caenis* sp. (Brito, 2012, cap. 9), uma ordem basal entre os Pterygota que, juntamente com Odonata,

formam um clado denominado Paleoptera (Kristensen, 1981; Kjer et al., 2006; Ishiwata et al., 2011).

A forma como o adjunto de centríolo se associa ao núcleo e aos componentes do flagelo em *I. fluviatilis* permite inferir que nesta espécie ele conecta os componentes flagelares internamente, diferente do observado em outras espécies de Libellulidae (observação pessoal), nas quais esta estrutura se posiciona externamente, envolvendo a extremidade posterior do núcleo e a extremidade anterior do flagelo.

A organização interna dos derivados mitocondriais, com a região periférica apresentando cristas bem regulares, região central heterogênea e ausência de paracristalino, observada em *I. fluviatilis*, parece comum entre os Odonata, uma vez que foi observada em outras espécies desta ordem: *Aeshna grandis* (Anisoptera) (Kessel, 1966), *Calopteryx haemorrhoidalis* (Zygoptera) (Rosati et al., 1976) e *Micrathyria hesperis* (Anisoptera, Libellulidae) (dados não publicados). A ausência de paracristalino nos derivados mitocondriais também foi observada em todas as espécies de Ephemeroptera estudadas (Baccetti et al., 1969; Brito, 2012), portanto pode ser considerada uma característica em Palaeoptera.

Em *I. fluviatilis*, observou-se dois corpos acessórios bem desenvolvidos, eletrondensos e em forma de meia lua, flanqueando o axonema. Esses achados foram similares ao observado em outra espécie de Coenagrionidae (*Enallagma cheliferum*) (Gama et al., 1976) e em outros Zygoptera, como *Calopteryx* sp. (Jamieson et al., 1999), *Calopteryx haemorrhoidalis* (Rosati et al., 1976), ambas da família Calopterygidae. Isto permite inferir que esta é uma característica compartilhada entre as espécies da subordem Zygoptera.

Este é o primeiro trabalho que mostra a ultraestrutura completa dos espermatozoides de uma espécie de Odonata, uma vez que os trabalhos anteriores mostram apenas estruturas isoladas. Além disso, algumas características ainda não haviam sido descritas para outras espécies desse grupo, como a presença de invaginações da membrana basal do acrossomo e a morfologia do adjunto de centríolo.

No geral, a morfologia dos espermatozoides de *I. fluviatilis* é semelhante àquela observada para a maioria dos pterigotas. Entretanto,

algumas características observadas nesta espécie, como a ausência de perforatorium e de material paracristalino nos derivados mitocondriais, também observadas em Ephemeroptera, são características compartilhadas entre os Palaeoptera. Este estudo mostra a importância dos dados ultraestruturais dos espermatozoides para futuros estudos de sistemática dos Odonata.

5. Referências Bibliográficas

Abro A. 1998. Structure and development of sperm bundles in the dragonfly *Aeshna juncea* L. (Odonata). *Journal of Morphology* 235, 239–247.

Araújo V A, Lino-Neto J, Ramalho F S, Zanuncio J C, Serrão J E. 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron* 42, 560–567.

Artiss T, Schultz T R, Polhemus D A, Simon C. 2001. Molecular phylogenetic analysis of dragonfly genera *Libellula*, *Ladona* and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I and 16S rRNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18, 348–361.

Alves I, Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H. 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 87, 131–139.

Baccetti B, Dallai R, Rosati F. 1969. The spermatozoon of Arthropoda. III. The lowest holometabolic insects. *Journal of Microscopy, Paris* 8, 233–248.

Bybee S M, Ogden T H, Branham M A, Whiting M F. 2008. Molecules, morphology and fossils: a comprehensive approach to odonate phylogeny and the evolution of the odonate wing. *Cladistics* 24, 477–514.

Brito P V A. 2012. Morfologia do sistema reprodutivo masculino e dos espermatozoides de Ephemeroptera (Insecta) e análise do seu potencial filogenético. Tese, Universidade Estadual de Campinas.

Brito P, Salles F F, Dolder H. 2011. Characteristics of the Male Reproductive System and Spermatozoa of Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Neotropical Entomology* 40 (1), 103–107.

- Dallai R. & Afzelius B A. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *Journal of Structural Biology* 103, 164–179.
- Dallai R. & Afzelius B A. 1995. Phylogeny significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: Jamieson, B. G. M. et al. (Ed.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Memoires du Museum National D'Histoire Naturelle, Paris 16, 291–296.
- Dallai R, Lombardo B M, Lupetti P. 2007. Sperm ultrastructure in Chironomoidea (Insecta, Diptera). *Tissue Cell* 39, 179–194.
- Dallai R, Mercatia D, Bu Y, Yin Y W. 2010a. Spermatogenesis and sperm structure of *Acerella muscorum*, (Ionescu, 1930) (Hexapoda, Protura). *Tissue Cell* 42, 97–104.
- Dallai R, Mercati D, Bu Y, Yin Y W, Callaini G, Riparbelli M G. 2010b. The spermatogenesis and sperm structure of *Acerentomon microrhinus* (Protura, Hexapoda) with considerations on the phylogenetic position of the taxon. *Zoomorphology* 129, 61–80.
- Fleck G, Ullrich B, Brenk M, Wallnisch C, Orland M, Bleidissel S, Misof B. 2008. A phylogeny of anisopterous dragonflies (Insecta, Odonata) using mtRNA genes and mixed nucleotide/doublet models. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46 (4), 310–322.
- Gama V, Zaha A, Cruz-Landim C, Ferreira A. 1976. Ultraestrutura da espermiogênese e do espermatozóide de *Enallagma cheliferum* Selys, 1875 (Coenagrionidae: Odonata). *Anais da Academia brasileira de Ciências* 48, 313–324.
- Grimaldi D. & Engel M S. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, New York, NY.
- Hasegawa E. & Kasuya E. 2006. Phylogenetic analysis of the insect order Odonata using 28S and 16S rDNA sequences: a comparison between data sets with different evolutionary rates. *Entomological Science* 9, 55–66.
- Ishiwata K, Sasaki G, Ogawa J, Miyata T, Su Z. 2011. Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58, 169–180.
- Jamieson B G M, Dallai R, Afzelius B A. 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.
- Jordan S, Simon C, Polhemus D. 2003. Molecular systematics and adaptive radiation of Hawaii's endemic damselfly genus *Megalagrion* (Odonata: Coenagrionidae). *Systematic Biology* 52, 89–109.

- Kessel R G. 1966. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. *Journal of Ultrastructure Research* 16, 293–304.
- Kessel R G. 1970. Spermiogenesis in the dragonfly with special reference to a consideration of the mechanisms involved in the development of cellular asymmetry, in: *Comparative spermatology*, Ed. B. Baccetti, Academic Press, New York, 531–554.
- Kjer K M. 2004. Aligned 18S and insect phylogeny. *Systematic Biology* 53, 506–514.
- Kjer K M, Carle F L, Litman J, Ware J. 2006. A molecular phylogeny of hexapoda. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 64 (1), 35–44.
- Kristensen N P. 1981. Phylogeny of insect orders. *Annual Review of Entomology* 26, 135–157.
- Lino-Neto J, Dolder H. 2001a. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta* 30 (2), 89–96.
- Lino-Neto J, Dolder H. 2001b. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 82, 159–164.
- Lupetti P, Mencarelli C, Mercati D, Gaino E, Dallai R. 2011. The spermatodesm of *Cloeon dipterum* (L.): fine structure and sperm movement. *Tissue Cell* 43, 157–164.
- Mancini K, Lino-Neto J, Campos L A O, Dolder H. 2006. Sperm ultrastructure of *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insects Sociaux* 53, 333–338.
- Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H, Dallai R. 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Structure Development* 38, 54–59.
- May M L. 2002. Phylogeny and taxonomy of the damselfly genus *Enallagma* and related taxa (Odonata: Zygoptera; Coenagrionidae). *Systematic Entomology* 27, 387–408.
- Misof B. & Fleck G. 2003. Comparative analysis of mt LSU rRNA secondary structures of Odonates: structural variability and phylogenetic signal. *Insect Molecular Biology* 12, 535–547.
- Moreira J, Brito P, Mancini K, Dolder H, Lino-Neto J. 2012. The descriptions of new microanatomical structures of the male reproductive system and

sperm of *Myschocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). *Micron* 43, 292–297.

Oliveira C M, Mancini K, Dolder H, Lino-Neto J. 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae). *Tissue Cell* 42, 242–246.

Rehn A C. 2003. Phylogenetic analysis of higher-level relationship of Odonata. *Systematic Entomology* 28, 181–239.

Rosati F, Selmi G, Mazzini M. 1976. Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *Journal of Submicroscopic Cytology* 8, 51–67.

Saux C, Simon C, Spicer G S. 2003. Phylogeny of the dragonfly and damselfly order Odonata as inferred by mitochondrial 12s ribosomal RNA sequences. *Annals of the Entomological Society of America* 96, 693–699.

Siva-Jothy M T. 1997. Odonate ejaculate structure and mating systems. *Odonatologica* 26 (4), 415–437.

Weekers P H H, De Jonckheere J F, Dumont H J. 2001. Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 89–99.

Zama U, Moreira J, Báo S N, Campos L A O, Dolder H, Lino-Neto J. 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera, Apoidea, Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure Development* 36, 304–316.

Capítulo 2

3.2. Estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de Libellulidae (Odonata: Anisoptera)

Resumo

Os odonatas estão entre os insetos alados mais basais, havendo algumas controvérsias em torno das afinidades entre as superfamílias e famílias desse grupo. As características ultraestruturais dos espermatozoides tem se mostrado promissoras para análises filogenéticas em muitos grupos de insetos, porém trabalhos deste tipo ainda são inexistentes na família Libellulidae. Assim, este trabalho teve como objetivo descrever a estrutura e a ultraestrutura dos espermatozoides de *Micrathyria hesperis* (Ris, 1911), pertencente à subfamília Brachydiplacinae, *Tamea abdominalis* (Rambur, 1842) e *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798) ambas pertencentes à subfamília Tameinae, buscando contribuir em análises filogenéticas desse grupo de insetos. Para isso, espermatozoides extraídos de vesículas seminais e testículos de machos adultos das três espécies foram preparados para análises em microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides das três espécies são alongados e lineares. A região da cabeça é formada pelo acrossomo e o núcleo. Nas três espécies o acrossomo é em monocamada, sem perforatorium, e envolve a região apical do núcleo. O núcleo é alongado, com a cromatina homogeneamente condensada e eletrondensa. Na região de transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo é alongado nas três espécies. O flagelo nestas espécies é extremamente curto e constituído pelo axonema e dois derivados mitocondriais, sendo que a presença de dois corpos acessórios só foi observada em *M. hesperis*. Em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, o axonema apresentou um arranjo microtubular 9+9+0, diferente do observado em *M. hesperis*, na qual esta estrutura apresentou padrão microtubular 9+9+2. A análise da ultraestrutura dos espermatozoides permitiu a diferenciação das espécies das subfamílias Brachydiplacinae e Tameinae estudadas, pertencentes à família Libellulidae, podendo-se concluir que *P. flavescens* e *T. abdominalis* são filogeneticamente mais próximas entre si do que qualquer uma das duas para com *M. hesperis*, concordando com estudos filogenéticos já existentes.

Palavras-chave: Libélula, morfologia, Palaeoptera, flagelo curto.

1. Introdução

Os odonatas estão entre os insetos alados mais basais (Kristensen, 1981, Kjer, 2004). Estes insetos são considerados benéficos para o homem por se alimentarem de insetos transmissores de doenças, podendo ser usados no controle biológico, e por serem bons indicadores biológicos do meio em que vivem (Corbet, 1999; Costa et al., 2012).

Esta ordem é composta por três subordens, dentre elas a Anisoptera, que compreende 9 famílias e apresenta a maior riqueza em espécies (International Dragonfly fund, 2003; Rehn, 2003). Entre os Anisoptera, Libellulidae, com mais de 900 espécies, é a família mais rica em espécies e a mais comumente observada em todo o mundo (Schorr e Paulson, 2012), sendo considerada uma das famílias mais derivadas entre os Anisoptera (Rehn, 2003; Ware et al., 2007 e 2008; Bybee et al., 2008; Fleck et al., 2008).

Existem algumas controvérsias em torno das afinidades entre as superfamílias e famílias (Costa et al., 2012). Vários estudos tentam explicar as relações filogenéticas dentro de Odonata utilizando dados moleculares (Artiss et al., 2001; Weekers et al., 2001; Jordan et al., 2003; Misof e Fleck, 2003; Saux et al., 2003; Kjer, 2004; Dumont et al., 2005; Hasegawa e Kasuya, 2006; Ware et al., 2007 e 2008; Bybee et al., 2008; Fleck et al., 2008) e de morfologia externa (May, 2002; Rehn, 2003). De acordo com alguns trabalhos, a subordem Anisoptera é considerada monofilética (Rehn, 2003), assim como a família Libellulidae (Ware, 2008; Bybee et al., 2008; Fleck et al., 2008).

O comprimento do espermatozoide neste grupo de insetos varia entre as subordens e suas respectivas famílias. Segundo Siva-Jothy (1997), os espermatozoides podem ser agrupados em dois tamanhos: longos e curtos. Os longos, apresentando cerca de 25 μm de comprimento, são observados em Epiophlebiidae (Anisozygoptera), em Platycnemididae, Coenagrionidae, Lestidae e Calopterygidae (Zygoptera) e em Gomphidae e Aeshnidae (Anisoptera). Já os curtos, com cerca de 15 μm de comprimento, são observados em espécies das famílias Macromiidae, Corduliidae e Libellulidae, pertencentes à superfamília Libelluloidea (Anisoptera).

O estudo das características ultraestruturais dos espermatozoides tem se mostrado promissor para análises filogenéticas em muitos grupos de insetos (Lino-Neto et al., 1999; Alves et al., 2006; Mancini et al., 2006 e 2009; Dallai et al., 2007, 2010a e 2010b; Oliveira et al., 2010; Araújo et al., 2011; Lupetti et al., 2011; Brito et al., 2011; Moreira et al., 2012), porém trabalhos deste tipo ainda são inexistentes na família Libellulidae.

Assim, este trabalho teve como objetivo descrever a estrutura e a ultraestrutura dos espermatozoides de *Micrathyria hesperis* (Ris, 1911), pertencente à subfamília Brachydiplacinae, e *Tremea abdominalis* (Rambur, 1842) e *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798), ambas pertencentes à subfamília Tremeinae (Anisoptera), buscando contribuir em análises filogenéticas desse grupo de insetos.

2. Material e métodos

Machos adultos das três espécies foram coletados com o auxílio de rede entomológica, nas proximidades de corpos d'água localizados no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

2.1. Microscopia de luz

Vesículas seminais de 05 indivíduos de cada espécie foram dissecadas e os espermatozoides foram espalhados em lâminas histológicas e fixados com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 15 minutos à temperatura ambiente. Para medir o tamanho total dos espermatozoides, parte das preparações foi corada utilizando Giemsa por 15 minutos. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em fotomicroscópio Olympus BX-50. Para a medição dos núcleos, algumas preparações foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão PBS, por 20 minutos, e examinadas com um microscópio de epifluorescência Olympus BX-50, equipado com um filtro de excitação BP360-370 nm. As medidas de 30 espermatozoides e 30 núcleos de cada espécie foram feitas usando o programa *Image-Pro Plus*, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA).

2.2. Microscopia eletrônica

Testículos, ductos espermáticos e vesículas seminais das espécies estudadas foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5% nesse mesmo tampão, acrescido de 3% de sacarose e 0,2% ácido pícrico, por 24 h a 4 °C. O material, após lavado em tampão, foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, por 2 h, à temperatura ambiente. Em seguida foi desidratado usando soluções com concentrações crescentes de acetona e incluído em resina Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 2% em solução de hidróxido de sódio 1N e observados com um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 906.

3. Resultados

Os espermatozoides das três espécies aqui estudadas apresentam a mesma estrutura básica. Eles são alongados e lineares, medindo cerca de 15 μm de comprimento em *Pantala flavescens*, 18 μm em *Micrathyrria hesperis* e 20 μm em *Tamea abdominalis*, e divididos em duas regiões: a cabeça e o flagelo (Figs. 1A e B, 3A e B, 5A e B).

A região de cabeça compreende o acrossomo e o núcleo. Nas três espécies, o acrossomo é em monocamada, sem perforatorium, e envolve a região apical do núcleo. Ele é formado por uma vesícula eletrólúcida alongada (Figs. 1C, 3G e 5C) e circular em corte transversal (Figs. 1D-F, 3C-E e 5D-E), medindo 1 μm de comprimento em *P. flavescens*, 1,5 μm em *T. abdominalis* e 2 μm em *M. hesperis*. Pôde-se observar invaginações da membrana da vesícula acrossomal, que se projetam, a partir da região basal, lateralmente em direção à região apical do acrossomo (Figs. 3H e J). Interligando estas invaginações à membrana acrossomal mais externa observa-se pontes de material eletrondenso (Figs. 1G, 3I e 5G).

Algumas diferenças em relação à ultraestrutura do acrossomo foram observadas entre as espécies analisadas. Em *T. abdominalis* o acrossomo é

periforme, com a porção apical mais dilatada do que a basal (Fig. 3G), já em *P. flavescens* e *M. hesperis* ele é cônico (Figs. 1C e 5C). Nas três espécies, a extremidade apical do acrossomo, logo abaixo da membrana plasmática, apresenta uma pequena estrutura vesicular, de eletrondensidade média. Esta estrutura se mostra achatada em *T. abdominalis* (Fig. 3G) e em forma de meia lua em *P. flavescens* (Fig. 1C) e *M. hesperis* (Fig. 5C).

O núcleo, nas três espécies, é alongado (Fig. 1A e B) e circular em secção transversal, com a cromatina homogeneamente condensada e eletrondensa (Figs. 1H, 3E-F, 5E, F e H). As extremidades anterior e posterior são afiladas, sendo que, esta última em *M. hesperis*, é posicionada lateralmente à região anterior do adjunto de centríolo (Figs. 6A-D), enquanto que nas outras duas espécies ele é central e envolvido pelo adjunto de centríolo (Figs. 2A e D, 4A e E). O comprimento nuclear em *P. flavescens* é cerca de 10 μm , em *M. hesperis* 12 μm e em *T. abdominalis* 14 μm .

Na região de transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo é alongado nas três espécies, medindo cerca de 2 μm de comprimento em *P. flavescens* e em *M. hesperis* e 3 μm em *T. abdominalis*. Em *P. flavescens* e *T. abdominalis* ele envolve a extremidade posterior do núcleo e a extremidade do axonema (centríolo) ao longo de 0,2 μm , terminando imediatamente antes do início dos derivados mitocondriais (Figs. 2A-B e 4A-B). Nestas duas espécies, a área de interação núcleo-adjunto de centríolo diminui gradativamente indo de cerca de 0,4 μm de diâmetro a 0,3 μm em *P. flavescens* e de 0,6 μm a 0,3 μm em *T. abdominalis*. Em *T. abdominalis* são observadas ainda projeções do adjunto de centríolo na extremidade anterior do axonema (Fig. 4G). Em *M. hesperis*, diferente das outras duas espécies, o adjunto de centríolo se posiciona lateralmente às regiões posterior do núcleo e anterior do flagelo, sobrepondo cerca de 1 μm o axonema e envolvendo parcialmente a região inicial dos dois derivados mitocondriais (Fig. 6A, H-J e 7B).

O flagelo nas três espécies é extremamente curto (Figs. 1A, 3A, 5A), com apenas 5 μm em *P. flavescens* e 6 μm em *M. hesperis* e *T. abdominalis*. Ele é constituído pelo axonema e dois derivados mitocondriais, sendo que a presença de dois corpos acessórios só foi observada em *M. hesperis* (Figs. 6H-L).

Os derivados mitocondriais em *P. flavescens* e *T. abdominalis* apresentam diâmetro um pouco menor do que o axonema (Figs. 2B, F e G, 4B, G e H). Já em *M. hesperis* eles tem diâmetro ligeiramente maior do que o do axonema (Fig. 6J e 7B). Em *P. flavescens* e *T. abdominalis* os derivados não apresentam uma região de cristas bem definida como em *M. hesperis*. Nesta espécie as cristas apresentaram uma periodicidade de cerca de 40 nm e ocupam a região periférica dos derivados, os quais tem a região central homogênea (Fig. 7C). Os derivados iniciam logo abaixo da extremidade posterior do adjunto de centríolo, em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, e flanqueiam o axonema ao longo de parte do flagelo (Figs. 2A e B, 4B). Em *M. hesperis*, um dos derivados inicia primeiro, paralelamente à extremidade posterior do adjunto de centríolo, em seguida o outro e juntos flanqueiam o axonema, terminando antes dos corpos acessórios na porção final do flagelo (Fig. 6H-L).

Em *M. hesperis*, o axonema apresentou padrão microtubular 9+9+2 (9 acessórios, 9 duplas e 2 microtubulos centrais) (Fig. 7D), diferente do observado em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, nas quais esta estrutura não apresentou o par central de microtúbulos, portanto com um arranjo 9+9+0 (Figs. 2F-H e 4H). No final do flagelo, o axonema é a última estrutura a se desorganizar. Em *M. hesperis*, os microtúbulos acessórios terminam antes e, em seguida, as duplas (Figs. 6N-O). O contrário do que ocorre em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, nas quais as duplas finalizam primeiro (Figs. 2I-L e 4I-L).

Em *T. abdominalis* foi observada a presença de material eletrondenso de natureza desconhecida no centro da porção inicial do axonema (Fig. 4G) e de uma estrutura membranosa em torno do mesmo (Fig. 4I e J). Nota-se a presença de material eletrondenso preenchendo os microtúbulos A nas três espécies e de material intertubular eletrondenso entre os microtúbulos acessórios, estando este claramente conectado ao microtúbulo B em *M. hesperis* (Figs. 7D e E). No axonema de *M. hesperis*, pode-se observar a presença de braços de dineína a partir do microtúbulo A, e uma ponte de material eletrondenso entre cada microtúbulo B e o microtúbulo acessório adjacente (Fig. 7E). A presença de braços de dineína não foi evidente nas outras duas espécies. Em *P. flavescens* foram

observadas estruturas vesiculares associadas ao material eletrondenso situados entre os microtúbulos acessórios (Fig. 2G).

Os corpos acessórios, observados apenas em *M. hesperis*, exibem o formato de meia lua, com projeções que envolvem parcialmente o axonema em lados opostos (Figs. 6G-L). Na porção final do flagelo, eles terminam após os derivados mitocondriais e antes do axonema (Figs. 6L e M).

Figura 1. Fotomicrografia de luz (**A e B**) e de eletrônica de transmissão (**C-H**) de espermatozoides de *Pantala flavescens*. (**A**) Espermatozoide corado com GIEMSA. A seta indica a transição da cabeça (c) e flagelo (f). Note a região do acrossomo (a) na extremidade anterior da cabeça do espermatozoide. (**B**) Núcleo (n) do espermatozoide corado com DAPI. (**C**) Secção longitudinal da região anterior do espermatozoide mostrando a vesícula acrossomal (va), estrutura vesicular (asterisco) na extremidade do acrossomo e a invaginação da membrana basal da vesícula acrossomal (ib), e o núcleo (n). (**D-F**) Secções transversais do acrossomo mostrando a vesícula acrossomal (va) e a invaginação da membrana basal da vesícula acrossomal (ib) e o núcleo (n). (**G**) Detalhe de secção transversal do acrossomo mostrando as pontes de material eletrondenso (p) interligando a invaginação da membrana basal (ib) à membrana acrossomal mais externa. (**H**) Secção transversal do núcleo, mostrando a membrana plasmática (mp). Barras: (A-B) = 4 μm ; (C) = 0,3 μm ; (D-F) = 0,2 μm ; (G) = 0,1 μm ; (H) = 0,2 μm .

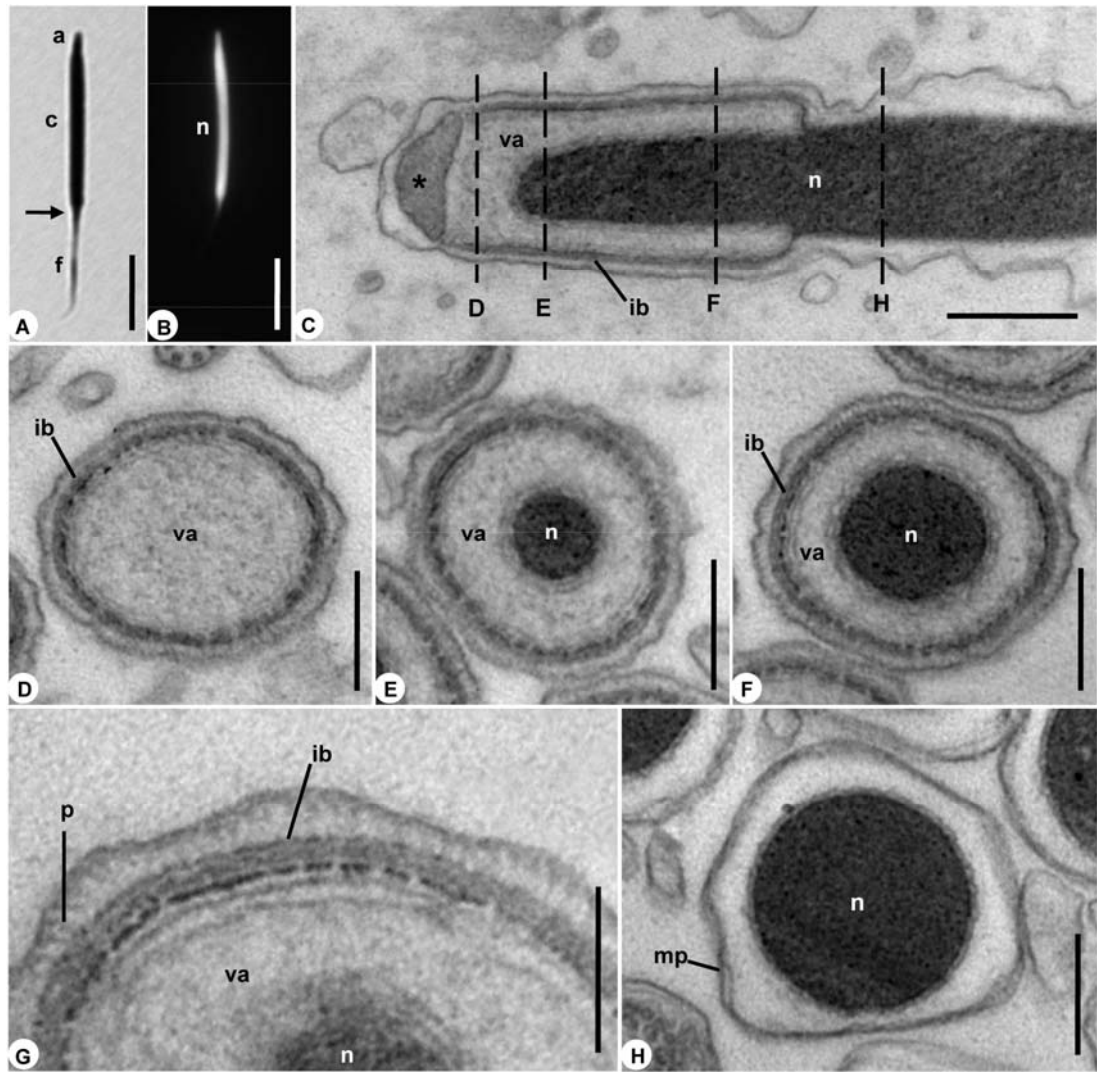


FIGURA 1

Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de espermatozoides de *Pantala flavescens*. **(A e B)** Secções longitudinais das regiões de transição núcleo-flagelo e flagelo, mostrando a extremidade posterior do núcleo (n), o adjunto de centríolo (ac), o centríolo (c), o axonema (ax) e um dos derivados mitocondriais (dm). **(C-E)** Secções transversais da transição núcleo-flagelo de espermátides. Observe os microtúbulos (mt) ligados ao adjunto de centríolo (ac). Note o adjunto de centríolo (ac) envolvendo a extremidade posterior do núcleo (n) **(C e D)** e a região do centríolo (c) **(E)**. **(F)** Secção transversal do flagelo de espermátide, mostrando os microtúbulos (mt) associados aos derivados mitocondriais (dm) e ao axonema (ax). Cabeças de seta indicam os microtúbulos A de cada dupla preenchidos por material eletrondenso **(F e G)**. **(G)** Secção transversal do flagelo. Observe as estruturas vesiculares (v) associadas ao material intertubular (it), localizado entre os microtúbulos acessórios (ma) do axonema (ax), as duplas de microtúbulos (d) e os derivados mitocondriais (dm). **(H-L)** Secções transversais da porção final do flagelo. Barras: **(A-B)** = 0,5 μm ; **(C-L)** = 0,1 μm .

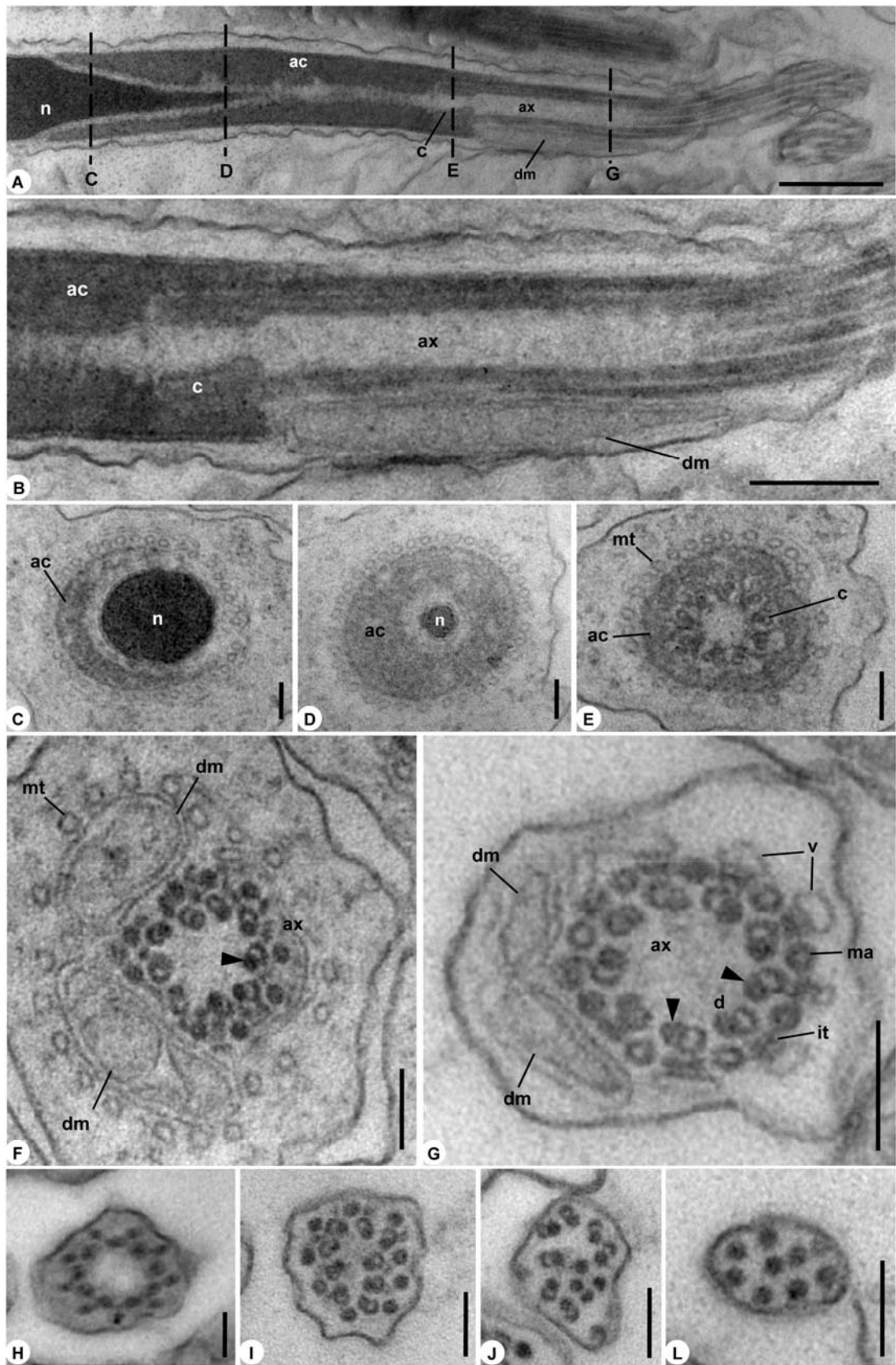


FIGURA 2

Figura 3. Fotomicrografia de luz (**A e B**) e de eletrônica de transmissão (**C-J**) de espermatozoides de *Tramea abdominalis*. (**A**) Espermatozoide corado com GIEMSA. A seta negra indica a transição da cabeça (c) e flagelo (f). Note a região do acrosso (a) na extremidade anterior da cabeça do espermatozoide. (**B**) Núcleo (n) do espermatozoide corado com DAPI. (**C-E**) Secções transversais do acrosso mostrando a vesícula acrossomal (va), a invaginação da membrana basal da vesícula acrossomal (ib) e o núcleo (n). (**F**) Secção transversal do núcleo, mostrando a membrana plasmática (mp). (**G-H**) Secção longitudinal da região anterior do espermatozoide mostrando a vesícula acrossomal (va), estrutura vesicular (asterisco) na extremidade do acrosso, a invaginação da membrana basal da vesícula acrossomal (ib), a membrana plasmática (mp), a membrana acrossomal externa (ma) e o núcleo (n). (**I**) Detalhe de secção transversal do acrosso mostrando as pontes de material eletrondenso (p) interligando a invaginação da membrana basal (ib) à membrana acrossomal mais externa. (**J**) Detalhe de secção longitudinal da porção basal do acrosso. Note as invaginações da membrana basal da vesícula acrossomal (ib), as pontes de material eletrondenso (p) interligando estas invaginações à membrana acrossomal externa (ma), a membrana plasmática (mp). Barras: (**A e B**) = 4 μm ; (**C, D e H**) = 0,2 μm ; (**E, F, I e J**) = 0,1 μm ; (**G**) = 0,3 μm .

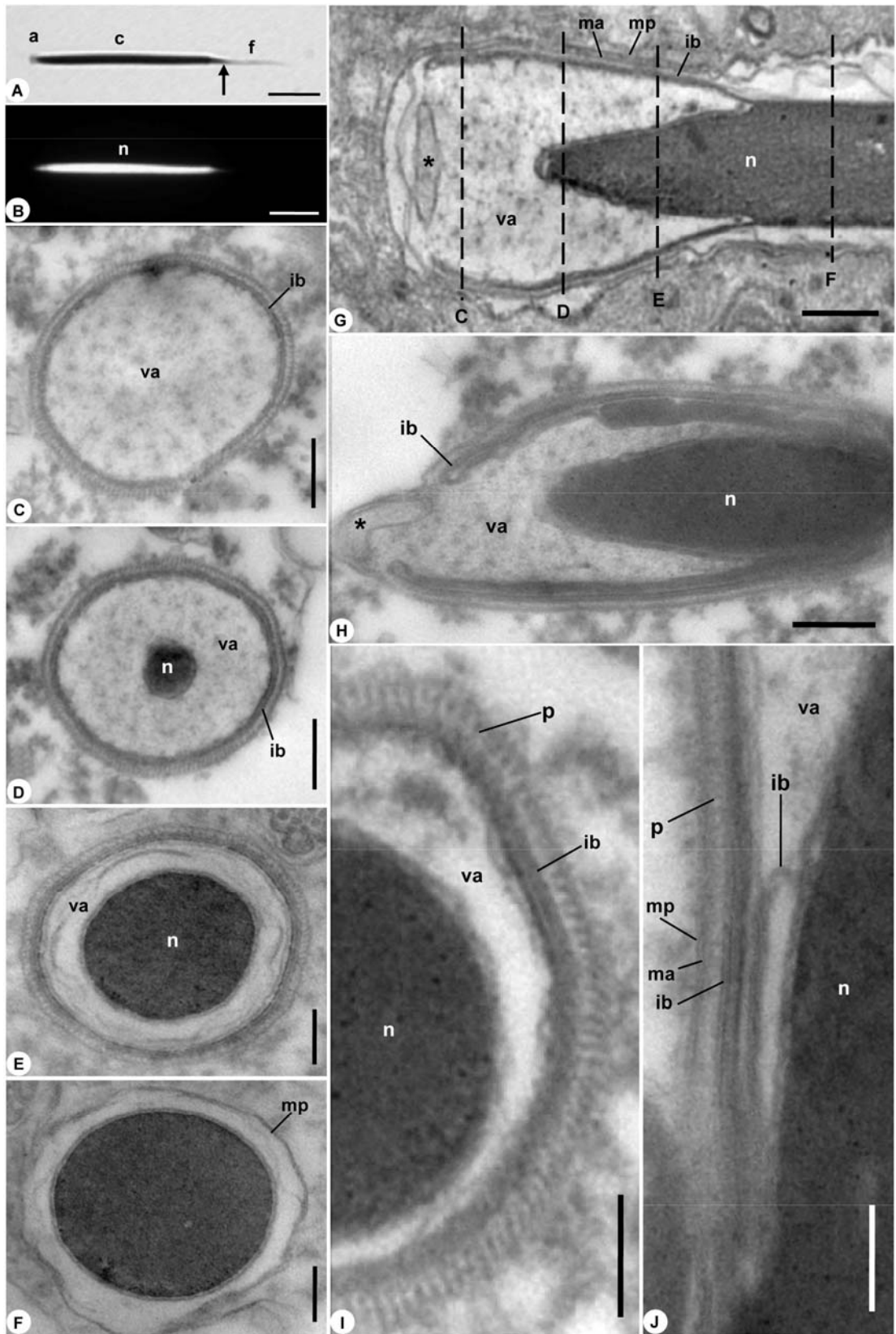


FIGURA 3

Figura 4. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de espermatozoides de *Tramea abdominalis*. **(A e B)** Secções longitudinais da região de transição núcleo-flagelo, mostrando a extremidade posterior do núcleo (n), o adjunto de centríolo (ac), o centríolo (c), o axonema (ax) e um dos derivados mitocondriais (dm). Note o material eletrondenso (asterisco) no centro da porção inicial do axonema. **(C-F)** Secções transversais da transição núcleo-flagelo. Observe o adjunto de centríolo (ac) envolvendo a extremidade posterior do núcleo (n) **(C-E)** e a região do centríolo (c) **(F)**. **(G)** Secção transversal da região inicial do flagelo, mostrando as projeções do adjunto de centríolo (ac) ao redor do axonema (ax), com o centro preenchido por um material eletrondenso (asterisco) e os derivados mitocondriais (dm). **(H)** Secção transversal da região mediana do flagelo, com o axonema (ax) e os derivados mitocondriais (dm) **(I-L)** Secções transversais da porção final do flagelo. Note a estrutura membranosa (m) em torno do axonema e a membrana plasmática (mp) **(I e J)**. Barras: **(A)** = 0,3 μm ; **(B-E)** = 0,2 μm ; **(F-L)** = 0,1 μm .

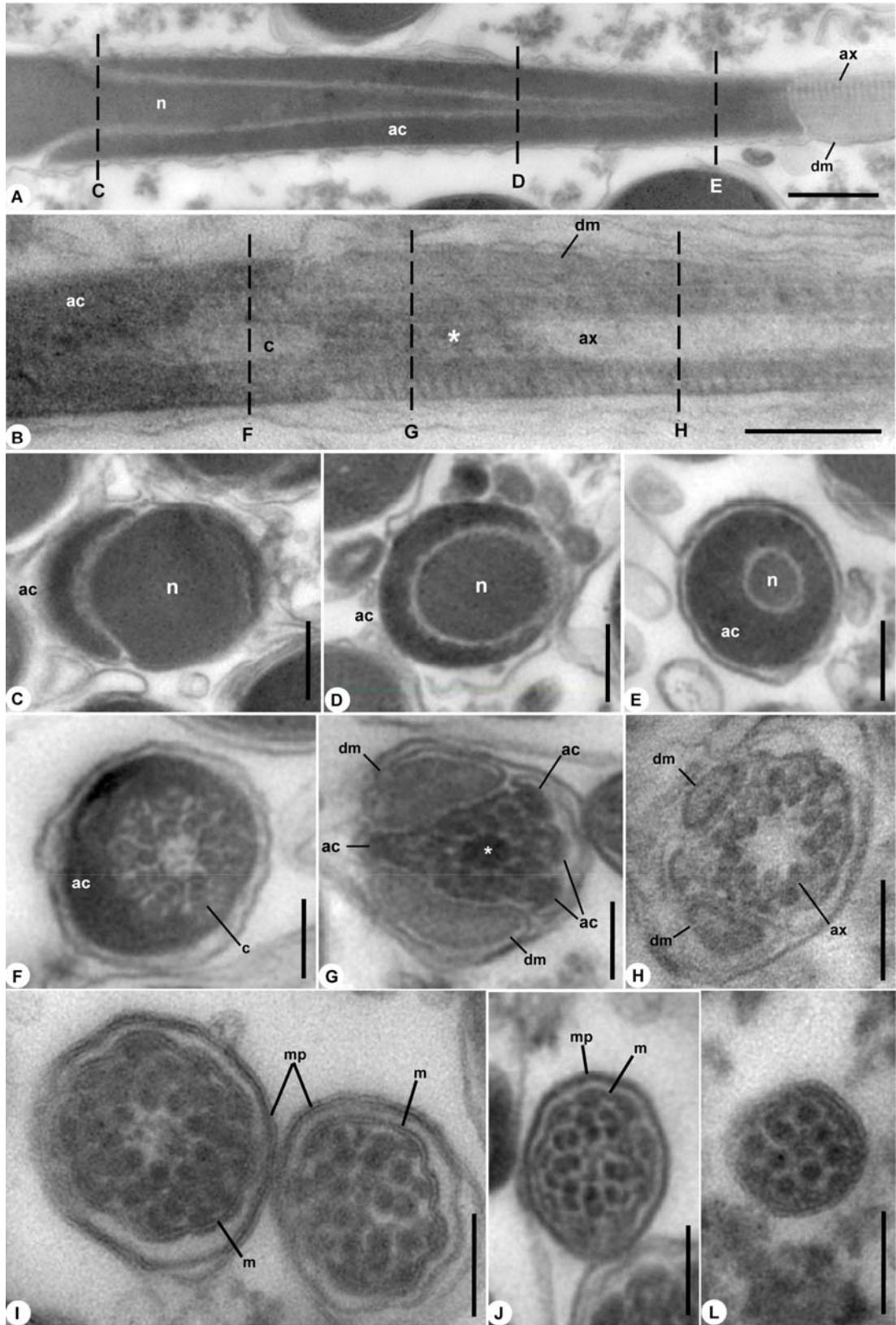


FIGURA 4

Figura 5. Fotomicrografia de luz (**A** e **B**) e de eletrônica de transmissão (**C-H**) de espermatozoides de *Micrathyria hesperis*. (**A**) Espermatozoide corado com GEMSA. A seta negra indica a transição da cabeça (c) e flagelo (f). Note a região do acrossomo (a) na extremidade anterior da cabeça do espermatozoide. (**B**) Núcleo (n) do espermatozoide corado com DAPI. (**C**) Secção longitudinal da região anterior do espermatozoide mostrando a vesícula acrossomal (va), estrutura vesicular (asterisco) na extremidade do acrossomo, a invaginação da membrana basal da vesícula acrossomal (ib) e o núcleo (n). (**D-E**) Secções transversais do acrossomo mostrando a vesícula acrossomal (va) e a invaginação da membrana basal da vesícula acrossomal (ib) e o núcleo (n). (**F**) Secção transversal do núcleo (n), mostrando a membrana plasmática (mp). (**G**) Detalhe de secção transversal do acrossomo mostrando as pontes de material eletrondenso (p) interligando a invaginação da membrana basal (ib) à membrana acrossomal mais externa. (**H**) Secção transversal do núcleo de uma espermátide mostrando os microtúbulos (mt) ligados a este por pontes (cabeça de seta). Barras: (**A** e **B**) = 4 μm ; (**C-F**) = 0,3 μm ; (**G**) = 0,1 μm ; (**H**) = 0,2 μm .

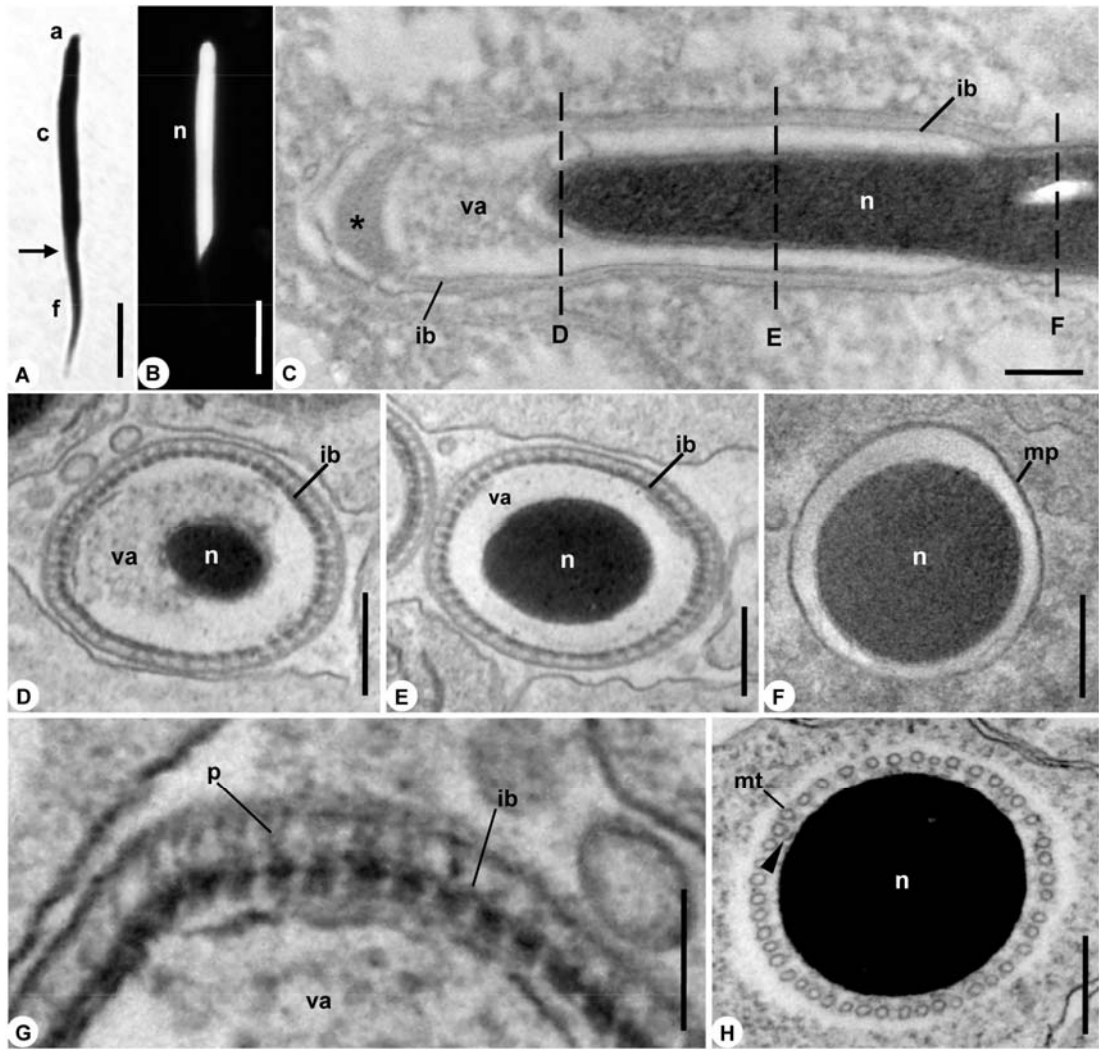


FIGURA 5

Figura 6. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de espermatídes e espermatozoides de *Micrathyria hesperis*. **(A)** Secção longitudinal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando a extremidade posterior do núcleo (n), o adjunto de centríolo (ac), o centríolo (c), o axonema (ax), um derivado mitocondrial (dm) e um corpo acessório (ca). **(B-J)** Secções transversais da transição núcleo-flagelo de espermatídes. Observe os microtúbulos (mt) ligados ao núcleo (n), ao adjunto de centríolo (ac) e aos derivados mitocondriais (dm). Note o adjunto de centríolo (ac) envolvendo gradativamente a extremidade posterior do núcleo (n) (**B e D**), a região do centríolo (c) (**F**), o axonema (ax) e os derivados mitocondriais (dm). **(L-O)** Secções transversais da porção final do flagelo, mostrando os corpos acessórios (ca) e o axonema (ax) (**L**) e, em seguida, apenas o axonema (**M-O**). Barras: **(A)** = 0,5 μm ; **(B-H)** = 0,2 μm ; **(I)** = 0,3 μm ; **(J-O)** = 0,2 μm .

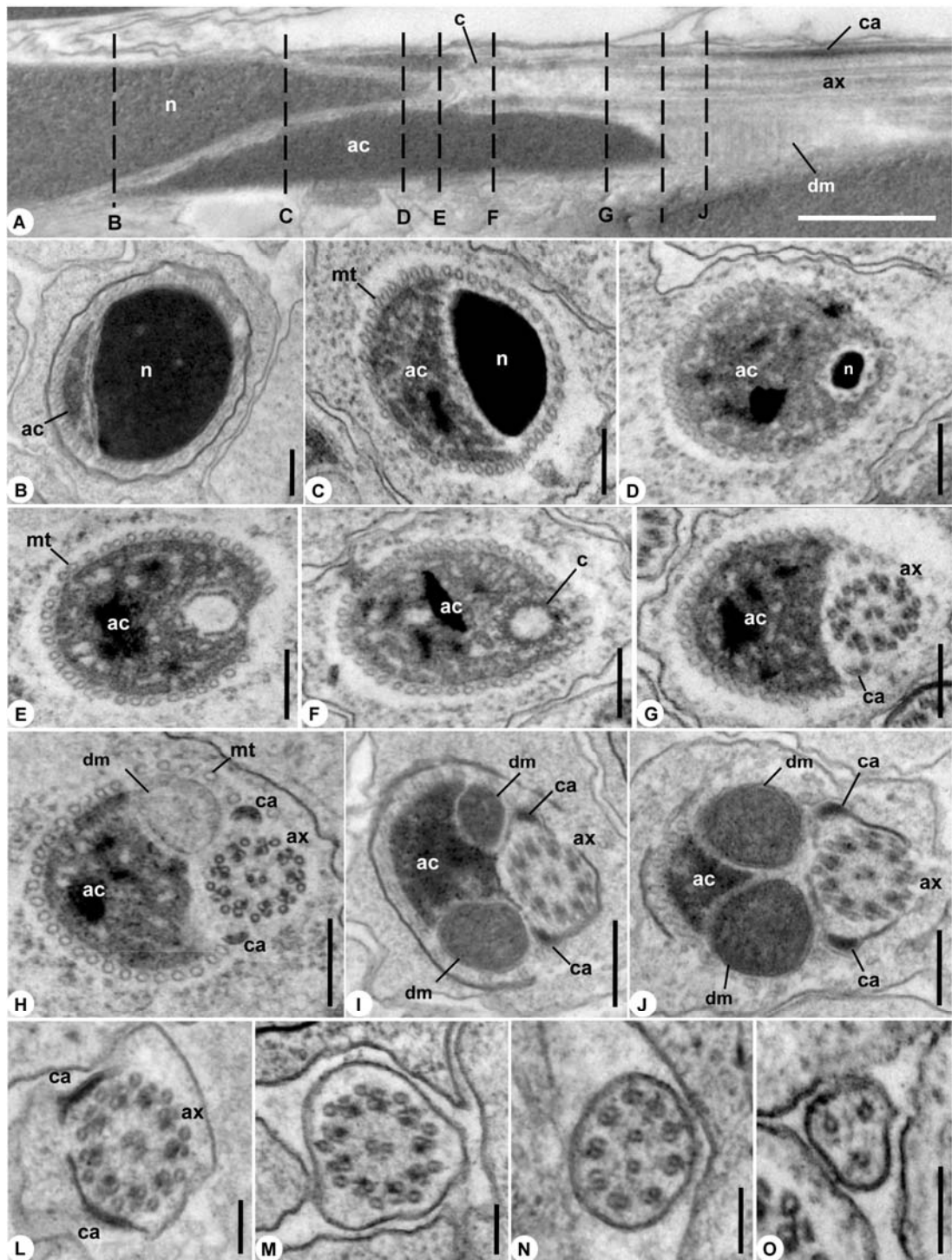


FIGURA 6

Figura 7. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de espermatozoides de *Micrathyria hesperis*. **(A e B)** Secções longitudinais da região de transição núcleo-flagelo, mostrando a extremidade posterior do núcleo (n), o adjunto de centríolo (ac), o centríolo (c), o axonema (ax), um corpo acessório (ca) e um derivado mitocondrial (dm). **(C)** Secção longitudinal de um derivado mitocondrial, mostrando a região de cristas bem definida (setas), a região central homogênea (asterisco) e, abaixo, parte do adjunto de centríolo (ac). **(D)** Secção transversal do axonema, mostrando 9 microtúbulos acessórios (ma), 9 duplas (d), ligadas aos 2 microtúbulos centrais (pc) pelos elementos radiais (er). Observe o material intertubular (it) entre os microtúbulos acessórios e os microtúbulos A de cada dupla preenchidos por material eletrondenso (cabeças de seta). **(E)** Detalhe do axonema, indicando os braços de dineína interno (bi) e externo (be) e o elemento radial (er) a partir do microtúbulo A (A). Setas mostram as pontes de material eletrondenso entre cada microtúbulo B (B) e o microtúbulo acessório adjacente (ma), e entre o microtúbulo B e o material intertubular (it). Barras: **(A)** = 0,5 μm ; **(B)** = 0,3 μm ; **(C)** = 0,1 μm ; **(D)** = 50 nm; **(E)** = 30 nm.

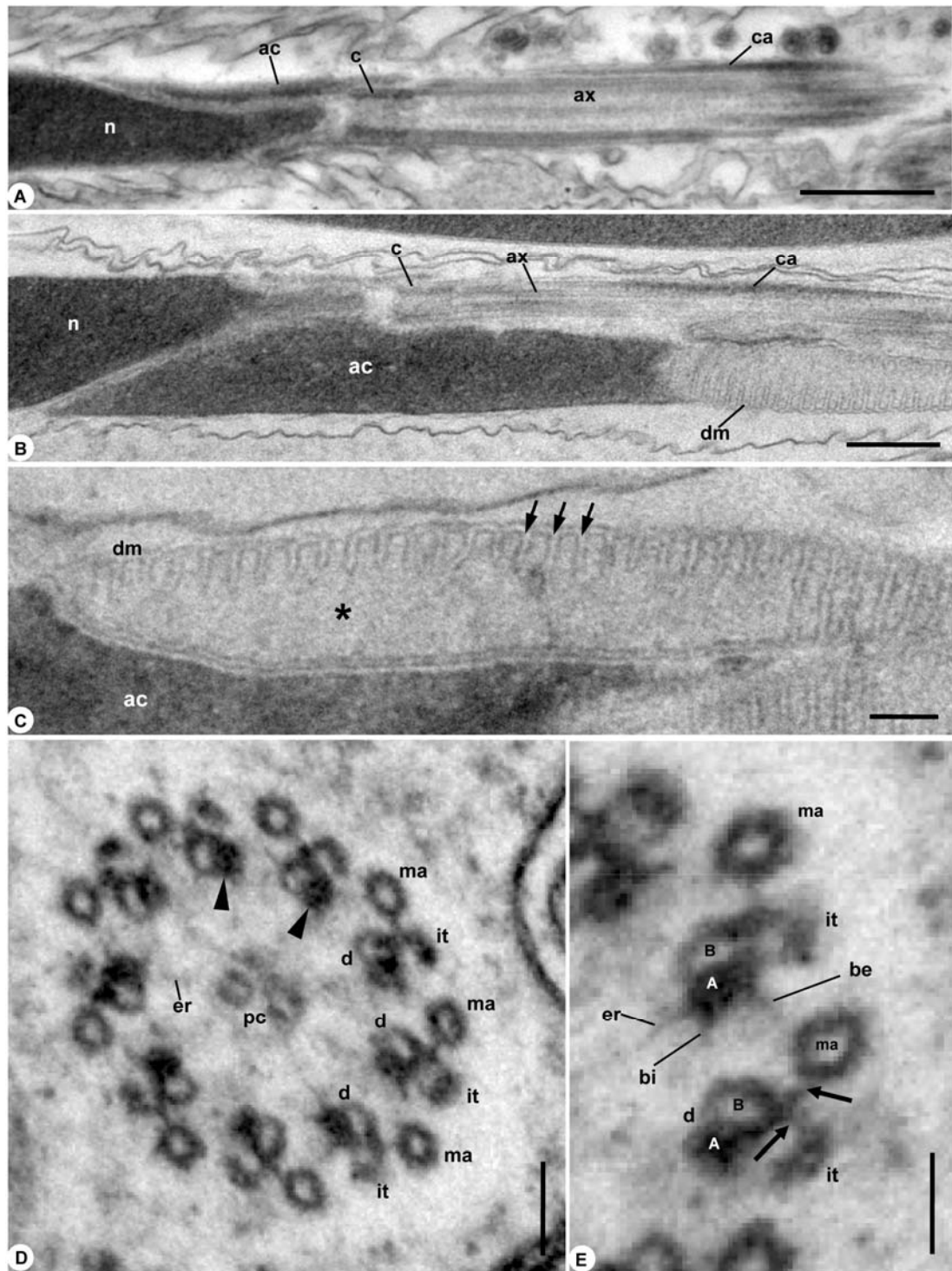


FIGURA 7

4. Discussão

Os espermatozoides das três espécies estudadas possuem algumas características semelhantes às aquelas apresentadas pelos espermatozoides da maioria das espécies de Pterygota estudadas (Jamieson et al., 1999), entre elas: (1) regiões de cabeça e de flagelo distintas, (2) um acrossomo alongado e localizado na extremidade apical da cabeça do espermatozoide, (3) núcleo alongado com cromatina homoganeamente condensada, (4) um adjunto de centríolo conectando o núcleo aos componentes flagelares e (5) presença de dois derivados mitocondriais.

Estas espécies pertencem a duas subfamílias distintas de Libellulidae, Brachydiplacinae (*M. hesperis*) e Trameinae (*P. flavescens* e *T. abdominalis*) e várias características ultraestruturais observadas comprovam a proximidade existente entre elas, como: (1) o comprimento do flagelo, (2) o acrossomo em monocamada, (3) a presença de uma estrutura vesicular na extremidade anterior do acrossomo, (4) presença de invaginações laterais da membrana a partir da região basal do acrossomo e (5) pontes de material eletrondenso interligando as membranas acrossomal e plasmática.

Os espermatozoides nestas espécies são lineares e apresentam o flagelo curto, concordando com o observado em outras espécies de Libellulidae, com flagelo medindo cerca de 7µm de comprimento, bem como de Corduliidae e Macromiidae (Anisoptera) (Siva-Jothy, 1997). Entretanto, diferem daqueles observados em espécies de Platycnemididae, Coenagrionidae, Lestidae e Calopterygidae (Zygoptera) e em Gomphidae, Cordulegastridae e Aeshnidae (Anisoptera) estudadas por Siva-Jothy (1997), e em Coenagrionidae por Caixeiro et al. (neste volume), que possuem o flagelo bem mais longo.

A presença de flagelo curto é uma apomorfia para algumas subfamílias de Libellulidae, uma das famílias consideradas mais derivadas na subordem Anisoptera (Rehn, 2003; Ware et al., 2007 e 2008; Bybee et al., 2008; Fleck et al., 2008).

O acrossomo em monocamada, sem perforatorium, também foi observado em *Aeshna juncea* (Anisoptera) (Figs. 13 e 14 em Abro, 1998) e em *Ischnura fluviatilis* (Zygoptera) (Caixeiro et al., neste volume). A ausência

de perforatorium também foi observada em Ephemeroptera (Brito, 2012), mostrando que possivelmente esta é uma característica compartilhada entre estas duas ordens, ambas pertencentes ao clado Palaeoptera.

A estrutura vesicular, localizada na extremidade anterior do acrossomo, observada nestas três espécies, possivelmente possui um conteúdo enzimático diferente daquele contido no restante da vesícula acrossomal, provavelmente apresentando um papel diferenciado no processo de fertilização nestas espécies.

Invaginação da membrana acrossomal, como observado nas três espécies, também ocorrem em *Ischnura fluviatilis* (Caixeiro et al., neste volume). Entretanto, nessa espécie aparentemente são quatro invaginações e centrais, que apresentam-se em espiral, provavelmente acompanhando o espiralamento do próprio espermatozoide. Nas espécies aqui analisadas, como a extremidade anterior do núcleo ocupa o centro da região basal do acrossomo, esta invaginação fica posicionada na periferia acrossomal.

As pontes de material eletrondenso observadas interligando a invaginação da membrana basal e a membrana acrossomal destas espécies, não foram relatadas em nenhuma outra espécie de inseto, incluindo *Ischnura fluviatilis* (Zygoptera) (Caixeiro et al., neste volume). Elas são provavelmente glicoproteicas, podendo-se inferir seu papel na estruturação do acrossomo.

Algumas características ultraestruturais dos espermatozoides das três espécies aqui estudadas, tais como: (1) o adjunto de centríolo envolvendo a extremidade posterior do núcleo e a extremidade do axonema em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, e posicionado lateralmente às regiões posterior do núcleo e anterior do flagelo, envolvendo parcialmente a região inicial dos dois derivados mitocondriais em *M. hesperis*; (2) o arranjo do axonema, 9+9+0 em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, e 9+9+2 em *M. hesperis*; (3) os derivados mitocondriais menores e sem uma região de cristas bem definida em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, e derivados maiores, com a região periférica de cristas bem definidas e a região central homogênea em *M. hesperis*; (4) a presença de corpos acessórios apenas em *M. hesperis*, permitem tanto diferenciá-las como inferir a relação filogenética entre elas.

Estas características mostram que *P. flavescens* e *T. abdominalis* são mais próximas entre si do que qualquer uma delas com *M. hesperis*, corroborando com o fato de *P. flavescens* e *T. abdominalis* pertencerem à mesma subfamília (Trameinae) e *M. hesperis* a uma subfamília diferente (Brachydiplacinae), permitindo distinguir uma subfamília da outra.

Siva-Jothy (1997) considerou imóveis os espermatozoides de oito espécies de Libellulidade pertencentes às subfamílias Brachydiplactinae, Libellulinae, Sympetrinae e Trameinae. A ausência dos braços de dineína no axonema de *P. flavescens* e *T. abdominalis* corrobora com esse autor, uma vez que estas estruturas são fundamentais para o movimento flagelar (Werner et al., 1999; Cummins, 2009). A motilidade dos espermatozoides de *M. hesperis* também é questionada, apesar do axonema nesta espécie apresentar os braços de dineína, seu flagelo é extremamente curto, como o das outras duas espécies.

Segundo Miller (1987) e Córdoba-Aguilar (2003), em Odonata a chegada do óvulo na vagina estimula contrações musculares da parede dos órgãos de armazenamento de espermatozoides na fêmea (Bursa copulatrix e espermateca), assim estas contrações, mais a motilidade dos espermatozoides permitem que eles alcancem e fertilizem o óvulo. Possivelmente, nas espécies aqui estudadas, a ausência de motilidade dos espermatozoides seria compensada por um mecanismo vigoroso de ejeção dos espermatozoides pelos órgãos de armazenamento na fêmea.

A análise das características ultraestruturais dos espermatozoides permitiu a diferenciação das espécies das subfamílias Brachydiplacinae e Trameinae estudadas, pertencentes à família Libellulidae, podendo-se concluir que *P. flavescens* e *T. abdominalis* são filogeneticamente mais próximas entre si do que qualquer uma das duas para com *M. hesperis*, concordando com a classificação das duas primeiras espécies em uma subfamília e a última espécie em outra.

5. Referências Bibliográficas

Abro A. 1998. Structure and development of sperm bundles in the dragonfly *Aeshna juncea* L. (Odonata). *Journal of Morphology* 235, 239-247.

Alves I, Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H. 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 87, 131-139.

Araújo V A, Lino-Neto J, Ramalho F S, Zanuncio J C, Serrão J E. 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron* 42, 560-567.

Artiss T, Schultz T R, Polhemus D A, Simon C. 2001. Molecular phylogenetic analysis of dragonfly genera *Libellula*, *Ladona* and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I and 16S rRNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18, 348-361.

Bybee S M, Ogden T H, Branham M A, Whiting M F. 2008. Molecules, morphology and fossils: a comprehensive approach to odonate phylogeny and the evolution of the odonate wing. *Cladistics* 24, 477-514.

Brito P, Salles F F, Dolder H. 2011. Characteristics of the Male Reproductive System and Spermatozoa of Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Neotropical Entomology* 40 (1), 103-107.

Brito P V A. 2012. Morfologia do sistema reprodutivo masculino e dos espermatozoides de Ephemeroptera (Insecta) e análise do seu potencial filogenético. Tese, Universidade Estadual de Campinas.

Cummins J. Sperm motility and energetics. In: Birkhead T R, Hosken D J, Pitnick S. 2009. *Sperm biology: an evolutionary perspective*. New York, Elsevier. 642 pp.

Corbet P S. 1999. *Dragonflies: Behavior and Ecology of Odonata*. Ithaca, NY: Comstock Publ. Assoc. 829 pp.

Córdoba-Aguilar A. 2003. A description of Male and female genitalia and a reconstruction of copulatory and fertilization events in *Calopteryx haemorrhoidalis* (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 32, 205-214.

Costa J M, Santos T C, Oldrini B B. Odonata. In: Rafael J A, Melo G A R, Carvalho C J B, Casari S A, Constantino R. 2012. *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto: Holos. 810 pp.

Dallai R, Lombardo B M, Lupetti P. 2007. Sperm ultrastructure in Chironomoidea (Insecta, Diptera). *Tissue Cell* 39, 179-194.

Dallai R, Mercatia D, Bu Y, Yin Y W. 2010a. Spermatogenesis and sperm structure of *Acerella muscorum*, (Ionescu, 1930) (Hexapoda, Protura). *Tissue Cell* 42, 97-104.

Dallai R, Mercati D, Bu Y, Yin Y W, Callaini, G, Riparbelli M G. 2010b. The spermatogenesis and sperm structure of *Acerentomon microrhinus* (Protura, Hexapoda) with considerations on the phylogenetic position of the taxon. *Zoomorphology* 129, 61-80.

Dumont H J, Vanfleteren J R, De Jonckheere J F, Weekers P H H. 2005. Phylogenetics relationships, divergence time estimation, and global biogeographic patterns of Calopterygoid Damselflies (Odonata, Zygoptera) inferred from ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 54 (3), 347-362.

Fleck G, Ullrich B, Brenk M, Wallnisch C, Orland M, Bleidissel S, Misof B. 2008. A phylogeny of anisopterous dragonflies (Insecta, Odonata) using mtRNA genes and mixed nucleotide/doublet models. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46 (4), 310-322.

Hasegawa E. & Kasuya E. 2006. Phylogenetic analysis of the insect order Odonata using 28S and 16S rDNA sequences: a comparison between data sets with different evolutionary rates. *Entomological Science* 9, 55–66.

International Dragonfly Fund. World species list. www.iori/idf.org. 2003.

Jamieson B G M, Dallai R, Afzelius B A. 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc. 555 pp.

Jordan S, Simon C, Polhemus D. 2003. Molecular systematics and adaptive radiation of Hawaii's endemic damselfly genus *Megalagrion* (Odonata: Coenagrionidae). *Systematic Biology* 52, 89-109.

Kjer K M. 2004. Aligned 18S and insect phylogeny. *Systematic Biology* 53, 506-514.

Lino-Neto J, Báo S N, Dolder H. 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 28, 253-259.

Lupetti P, Mencarelli C, Mercati D, Gaino E, Dallai R. 2011. The spermatodesm of *Cloeon dipterum* (L.): fine structure and sperm movement. *Tissue Cell* 43, 157-164.

Mancini K, Lino-Neto J, Campos L A O, Dolder H. 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insecta Socialia* 53, 333-338.

Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H, Dallai R. 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Structure and Development* 38, 54-59.

May M L. 2002. Phylogeny and taxonomy of the damselfly genus *Enallagma* and related taxa (Odonata: Zygoptera; Coenagrionidae). *Systematic Entomology* 27, 387-408.

Miller P L. 1987. An examination of the prolonged copulations of *Ischnura elegans* (Vander Linden) (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica* 16, 37-56.

Misof B. & Fleck G. 2003. Comparative analysis of mt LSU rRNA secondary structures of Odonates: structural variability and phylogenetic signal. *Insect Molecular Biology* 12, 535-547.

Moreira J, Brito P, Mancini K, Dolder H, Lino-Neto J. 2012. The descriptions of new microanatomical structures of the male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). *Micron* 43, 292-297.

Oliveira C M, Mancini K, Dolder H, Lino-Neto J. 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyidae). *Tissue Cell* 42, 242-246.

Rehn A C. 2003. Phylogenetic analysis of higher-level relationship of Odonata. *Systematic Entomology* 28, 181-239.

Saux C, Simon C, Spicer G S. 2003. Phylogeny of the dragonfly and damselfly order Odonata as inferred by mitochondrial 12s ribosomal RNA sequences. *Annals of the Entomological Society of America* 96, 693-699.

Schorr M, Paulson D. 2012. World Odonata List. University of Puget Sound. In: www.pugetsound.edu/x6140.xml

Siva-Jothy M T. 1997. Odonate ejaculate structure and mating systems. *Odonatologica* 26 (4), 415-437.

Ware J L, May M, Kjer K. 2007. Phylogeny of the higher Libelluloidea (Anisoptera: Odonata): an exploration of the most speciose superfamily of dragonflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 289-310.

Ware J L, Ho S Y W, Kjer K. 2008. Divergence dates of libelluloid dragonflies (Odonata: Anisoptera) estimated from rRNA using paired-site substitution models. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 426-432.

Weekers P H H, De Jonckheere J F, Dumont H J. 2001. Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopterix* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 89-99.

Werner M, Zissler D, Peschke K. 1999. Structure and energy pathways of spermatozoa of the rove beetle *Aleochara bilineata* (Coleoptera, Staphylinidae). *Tissue Cell* 31 (4), 413-420.

4. Conclusões Gerais

- ✓ Os espermatozoides das espécies de Odonata aqui analisadas apresentaram características ultraestruturais que permitem diferenciar esta ordem da maioria dos Pterigota, como: (1) ausência de perforatorium no acrossomo e de material paracristalino nos derivados mitocondriais, (2) flagelo extremamente curto, possivelmente imóvel, com derivados mitocondriais pequenos nas espécies de Libellulidae (Anisoptera) e (3) ausência de corpos acessórios e arranjo microtubular 9+9+0 nas espécies da subfamília Trameinae (Anisoptera).
- ✓ Algumas características da ultraestrutura dos espermatozoides mostraram-se úteis na diferenciação entre Zygoptera e espécies de Anisoptera, como: (1) o flagelo longo em Zygoptera e curto em Anisoptera (Libellulidae), (2) Acrossomo com invaginações centrais em Zygoptera e laterais em Anisoptera e (3) O adjunto de centríolo em Zygoptera situa-se internamente aos elementos flagelares, enquanto em Anisoptera (Libellulidae) situa-se externamente, envolvendo as extremidades posterior do núcleo e anterior do flagelo.
- ✓ Várias características ultraestruturais permitem inferir que as subfamílias de Libellulidae, Brachydiplacinae (*M. hesperis*) e Trameinae (*P. flavescens* e *T. abdominalis*) são filogeneticamente próximas, tais como: (1) o comprimento do flagelo, (2) a presença de uma estrutura vesicular na extremidade anterior do acrossomo, (3) presença de invaginações laterais da membrana a partir da região basal do acrossomo e (4) pontes de material eletrondenso interligando a invaginação da membrana basal e a membrana acrossomal.
- ✓ A morfologia dos espermatozoides mostrou-se capaz de diferenciar espécies da subfamília Brachydiplacinae daquelas da subfamília Trameinae (Anisoptera), como: (1) o adjunto de centríolo envolvendo a extremidade posterior do núcleo e a anterior do axonema em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, diferente de *M. hesperis*, na qual ele está

posicionado lateralmente às regiões posterior do núcleo e anterior do flagelo, (2) o arranjo do axonema, 9+9+0 em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, e 9+9+2 em *M. hesperis*, (3) os derivados mitocondriais menores e sem uma região de cristas bem definida em *P. flavescens* e *T. abdominalis*, e derivados maiores, com a região de cristas bem definidas em *M. hesperis* e (4) a presença de corpos acessórios apenas em *M. hesperis*.

- ✓ A ausência dos braços de dineína no axonema de *P. flavescens* e *T. abdominalis* pode justificar a imotilidade observada de seus espermatozoides.
- ✓ A presença de flagelo curto parece ser uma característica comum para algumas subfamílias de Libellulidae.
- ✓ O acrossomo em monocamada, sem perforatorium, e a ausência de paracristalino nos derivados mitocondriais de Odonata e Ephemeroptera mostra que estas são características compartilhadas entre estas duas ordens, ambas pertencentes ao clado Palaeoptera.

Espécies	Comprimento total do espermatozoide	Comprimento do flagelo	Forma do acrosso	Compartimento na região apical do acrosso	Invaginações da vesícula acrossomal	Adjunto de Centríolo	Derivados mitocondriais	Axonema	Corpos acessórios	Final do flagelo
<i>Tramea abdominalis</i>	20 µm	6 µm	Periforme	Achatado	Laterais	Envolvendo a região posterior do núcleo e a região do centríolo	Pouco desenvolvidos, sem cristas evidentes	9+9+0	Ausentes	Duplas terminam primeiro
<i>Pantala flavescens</i>	15 µm	5 µm	Coniforme	Forma de meia lua	Laterais	Envolvendo a região posterior do núcleo e a região do centríolo	Pouco desenvolvidos, sem cristas evidentes	9+9+0	Ausentes	Duplas terminam primeiro
<i>Microthyrina hesperis</i>	18 µm	6 µm	Coniforme	Forma de meia lua	Laterais	Lateral, envolvendo a região posterior do núcleo e a porção anterior do flagelo	Desenvolvidos com cristas evidentes e regulares	9+9+2	Presentes	Microtúbulos acessórios terminam primeiro
<i>Ischnura fluviatilis</i>	50 µm	42 µm	Coniforme	Ausente	Centrais	Menos desenvolvido e entre os componentes flagelares	Bem desenvolvidos, cilíndricos, com cristas evidentes e regulares	9+9+2	Presentes, bem desenvolvidos e alongados	?

Tabela 1. Comparação das características estruturais e ultraestruturais dos espermatozoides das espécies de Odonata estudadas no presente trabalho.