

ADEMÁRIA MOREIRA NOVAIS

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS  
ESPERMATOZOIDES EM NEPOMORPHA E CIMICOMORPHA  
(HETEROPTERA)**

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  
2017

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

T

N935m  
2017 Novais, Ademária Moreira, 1983-  
Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos  
espermatozoides em Nepomorpha e Cimicomorpha  
(Heteroptera) / Ademária Moreira Novais. – Viçosa, MG, 2017.  
viii, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Hemiptera - Espermatozoides. 2. Morfologia.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 595.75

ADEMÁRIA MOREIRA NOVAIS

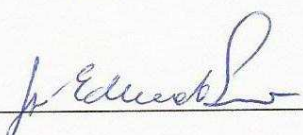
**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS  
ESPERMATOZOIDES EM NEPOMORPHA E CIMICOMORPHA  
(HETEROPTERA)**

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: 07 de julho de 2017

  
\_\_\_\_\_  
Vinicius Albano Araújo

  
\_\_\_\_\_  
Cláudia Vânia Miranda de Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
José Eduardo Serrão

  
\_\_\_\_\_  
Luis Carlos Martinez Castrillón

  
\_\_\_\_\_  
José Lino Neto

(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, em especial o coordenador, professor Dr. José Eduardo Serrão, e a secretária, Elizabeth Alves Pena, pela competência e profissionalismo.

Ao Instituto Federal de Mato Grosso Campus Juína (IFMT), por conceder-me afastamento total das minhas funções docentes, para a dedicação exclusiva ao meu Doutorado, em especial aos colegas de trabalho Geraldo Polegatti e Noemi Corrêa que não mediram esforços para que isso foi possível.

A todos professores do Programa de Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos durante as disciplinas, especialmente aqueles que muito contribuíram para minha formação, Prof<sup>a</sup> Isabel Maldonado, Prof<sup>o</sup> Sérgio da Matta, Prof<sup>a</sup> Juliana, Prof<sup>o</sup> Clovis e Prof<sup>o</sup> João Marcos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral Adriana, Gustavo e Leandro pela gentileza e prontidão em ajudar.

Aos técnicos administrativos do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, Gilmar, Karla, Micheli, Carlota, Cristiane e Miriam, por serem sempre muito atenciosos e dispostos a ajudar.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Lino Neto, pela aceitação em me orientar, pelo aprendizado, amizade, orientação, pelas longas conversas, pelos momentos de descontração, enfim, por ser mais que um Orientador, um amigo.

Ao Professor Dr. Paulo Sérgio Fiuza Ferreira, pela disponibilidade em ir para campo e coletar os exemplares.

Professor Dr. Lucio de Oliveira Campos pelos ensinamentos e troca de ideias em diversos momentos ao longo desses quatro anos, além das contribuições no meu exame de qualificação.

Aos professores membros da banca, Prof<sup>o</sup> Vinícius, Prof<sup>a</sup> Cláudia, Prof<sup>o</sup> Serrão, Prof<sup>o</sup> Luis Carlos pela disponibilidade em contribuir com meu trabalho.

Ao técnico do laboratório José Luis Monteiro, por todos os ensinamentos e amizade.

Aos laboratórios de Orthopterologia e Citogenética de Insetos pelo suporte técnico e empréstimo dos equipamentos para a realização das fotografias.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, Aline, André Oliveira, André Souza, Camila, Debora, Dodora, Glenda, Hellen, Jamile, Lenise, Luanda, Luiza, Marcelo, Paty, Pedro, Polly, Wagner e Virgínia, por tornarem meus dias mais leves e mais alegres.

À amiga e colega de laboratório, Karen Salazar, que tanto me ajudou durante o doutorado, pela sua amizade, simplicidade e alegria que transmite à todos a sua volta.

Aos amigos que fiz no Programa de Biologia Celular e Estrutural, Ana Claudia, Daniel, Eduardo, Graziela, Lidiane, Marli, Martinha, Patrícia e Pollyana, pelo companheirismo, amizade e ajuda nas disciplinas.

Aos meus pais, Adelina Moreira Novais e Antonio Ferreira Novais, pelo amor incondicional e por serem minha base e sempre me apoiarem, vocês são o meu maior exemplo!

Ao meu esposo Eder Fabrini Gaspar, que abdicou do seu trabalho e de ficar próximo da sua família para me acompanhar nessa jornada, sendo meu suporte e minha válvula de escape quando as frustrações batiam, por ter feito parte e vivenciado a minha trajetória e me ajudado em todos os momentos, até mesmo nas coletas. Por todo amor e companheirismo.

Às minhas irmãs Sivoneide e Cleide e meus sobrinhos, Julia, Felipe e Sofia, que mesmo distantes sempre me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas.

À todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. Introdução Geral</b> .....	01
1.1. A Ordem Hemiptera (Subordem Heteroptera).....	01
1.2. Sistema reprodutor masculino em Heteroptera.....	02
1.3. Estrutura e ultraestrutura dos espermatozóides.....	03
1.4. Referências Bibliográficas .....	04
<b>2. Objetivo</b> .....	10
<b>3. Artigos</b> .....	11
3.1. Capítulo 1: Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in <i>Martarega bento</i> (Heteroptera: Notonectidae).....	11
3.2. Capítulo 2: Morfologia do sistema reprodutor masculino e espermatozoides de <i>Ornithocoris pallidus</i> (Heteroptera: Cimicidae) com inferências ao comportamento reprodutivo.....	21
<b>4. Conclusões Gerais</b> .....	42

## RESUMO

NOVAIS, Ademária Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides em *Nepomorpha* e *Cimicomorpha* (Heteroptera)**. Orientador: José Lino Neto.

A caracterização morfológica do sistema reprodutor e dos espermatozoides tem sido reconhecida como uma fonte de caracteres para análises taxonômicas e filogenéticas. Tal caracterização tem se mostrado uma importante ferramenta na elucidação de questões da biologia reprodutiva e sistemática de diversos grupos de insetos. Nesse contexto, descrevemos, usando as microscopias de luz e eletrônica de transmissão, a morfologia do sistema reprodutor e dos espermatozoides de *Martarega bentoi* (Notonectidae) e *Ornithocoris pallidus* (Cimicidae), contribuindo com dados relevantes para a sistemática e biologia reprodutiva destas famílias, bem como para Heteroptera em geral. Os testículos de *M. bentoi*, possuem dois folículos espiralados e forma de caracol. A disposição lado a lado de cistos com células germinativas nas diferentes fases da espermatogênese pode ser uma característica do gênero *Martarega*. Cada feixe contém 64 espermatozoides, medindo aproximadamente 2.800 µm. Os espermatozoides exibem características observadas, até o momento, apenas nesta espécie: (1) acrossomo extremamente longo, com duas regiões; (2) base do núcleo terminando abruptamente com duas cavidades onde estão inseridas os derivados mitocondriais. Os espermatozoides de *M. bentoi* possui derivados mitocondriais bastante assimétricos e exibem duas inclusões paracristalinas e pontes ligando-os ao axonema. Entre as espécies de Notonectidae observadas até o momento, algumas características parecem ser exclusivas de *M. bentoi*, por exemplo, o número de espermatozoides por cisto, o tamanho do espermatozoide, a assimetria em tamanho e forma dos derivados mitocondriais e a inserção destes na base do núcleo. No segundo capítulo descrevemos o sistema reprodutor e espermatozoides de *O. pallidus*. Cada um dos dois testículos tem sete folículos, os quais se esvaziam de espermatozoides após a maturação sexual, quando as vesículas seminais se tornam totalmente cheias de espermatozoides. Os espermatozoides de *O. pallidus* exibem ultraestrutura bastante semelhante àquela de outras espécies proximamente relacionadas à Cimicidae, nos levando a supor que, aparentemente, a inseminação traumática não exerceu qualquer pressão seletiva sobre a morfologia dessas células. Contudo a sua produção em grande quantidade e restrita à fase de maturação sexual dos machos nos parece ter relação à condição hematofágica do cimicídeos. Ainda, a uniformidade morfométrica observada nos espermatozoides dessa

espécie pode ser decorrente do alto risco de competição espermática somada às condições inóspitas da cavidade hemocélica da fêmea. Com base em todos os dados apresentados, podemos concluir que o sistema reprodutivo masculino e os espermatozoides dessas duas espécies estudadas, mostraram características comuns aos demais Heteroptera, outras comuns às espécies mais próximas e, ainda, algumas que, até então, são exclusivas à cada uma dessas espécies. Essas informações podem contribuir para esclarecer questões da biologia reprodutiva e sistemática desses grupos de insetos.

## ABSTRACT

NOVAIS, Ademária Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Morphology of the male reproductive system and the spermatozoa in Nepomorpha and Cimicomorpha (Heteroptera)**. Adviser: José Lino Neto.

The morphological characterization of the reproductive system and the spermatozoa has been recognized as a source to taxonomic and phylogenetic analysis. This characterization corresponds an important tool in the elucidation of questions of the reproductive biology and systematic of several groups of insects. In this context, using light and transmission electron microscopy we described the morphology of the male reproductive system and the spermatozoa of *Martarega bentoi* (Notonectidae) and *Ornithocoris pallidus* (Cimicidae), contribution in the systematic of these two families and in general to Heteroptera. The testes of *M. bentoi* have two spiral format follicles and are snail shape. The side-by-side arrangement of the germinative cells in different phases of the spermatogenesis may be a characteristic of the *Martarega* genus. Each bundle contains 64 sperm, measuring approximately 2,800 µm. The spermatozoa exhibit characteristics observed so far only in this species: 1) extremely long acrosome with two regions; 2) base of the nucleus ending abruptly with two cavities where the mitochondrial derivatives are inserted. The spermatozoa of *M. bentoi* have rather asymmetric mitochondrial derivatives and exhibit two paracrystalline inclusions and bridges linking them to the axoneme. Among the species Notonectidae observed to date, some characteristics appear to be unique to *M. bentoi*, for example, the number of spermatozoa per cyst size of the sperm, the asymmetry in size and shape of mitochondrial derivatives and their insertion in the base of the nucleus. In the second chapter we describe the reproductive system and spermatozoa of *O. pallidus*. Each testicle has seven follicles which become empty of reproductive cells after sexual maturation of the male, and then the vesicles have full of sperm cells. The spermatozoa of *O. pallidus* show ultrastructure similar with other related species with Cimicidae, which leading us to suppose that apparently the traumatic insemination does not selective pressure in the morphology of these cells. However, the production in big quantity of spermatozoa and its restriction at the sexual maturation phase seem be related with the hematophagic condition of the cimicids. Moreover, the morphometric uniformity of the spermatozoa observed in this species may bedue to the high risk of the sperm competition, and in addition to the inhospitable condition into the female hemocellic cavity. In base at the data presented, we can conclude that the male

reproductive system and the spermatozoa of the four species studied exhibited common characters with the other Heteroptera, some ones common to the nearest species, and others ones that until then are unique to each species. This information can contribute to clarify issues of reproductive biology and systematics of these groups of insects.

## 1. Introdução Geral

### 1.1. Ordem Hemiptera (Subordem Heteroptera)

Os Hemiptera são reconhecidos pela conformação do aparelho bucal, que é representado por um rostró (*haustellum*), constituído por um lábio segmentado, no qual se alojam as demais peças bucais (Costa Lima, 1940). São conhecidas cerca de 89 mil espécies em todo o mundo, agrupadas nas quatro subordens reconhecidas atualmente: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha e Heteroptera (Cryan e Urban, 2012; Grazia et al., 2012).

Os Heteroptera apresentam espécies com hábitos terrestres, aquáticos, semi-aquáticos e parasitas de humanos, pássaros e morcegos. Em relação aos hábitos alimentares são muito diversos, podendo ser hematófagas, zoófagas ou fitófagas (Grazia et al., 2012; Schuh e Slater, 1995). Heteroptera é composta por sete infraordens: Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Pentatomomorpha e Cimicomorpha (Štys e Kerzhner, 1975) e mais de 40.000 espécies descritas (Weirauch e Schuh, 2011).

A infraordem Nepomorpha é constituída pelos Heteroptera aquáticos (Popov, 1971), que compreendem cerca de 2.000 espécies, distribuídas em 11 famílias (Štys e Jansson, 1988), entre elas, Notonectidae. Os insetos desta família são comumente chamados "backswimmers" (nadadores de costas), por nadarem com dorso voltado para baixo, usando suas longas pernas posteriores como remos para impulsionar-se através da água (Bachmann, 1998; Schuh e Slater, 1995). Eles se alimentam de insetos e pequenos peixes, inserindo os estiletos nas suas presas e sugando os fluidos do corpo imobilizado (McCafferty, 1981).

Cimicomorpha compreende mais de 20 mil espécies, distribuídas atualmente em 17 famílias (Weirauch e Schuh, 2011). Os membros deste grupo apresentam os mais variados habitats e hábitos alimentares (Schuh e Slater, 1995; Schuh et al., 2008), incluindo zoofagia e hematofagia em Reduviidae, preferência por fitofagia em Miroidea e ectoparasitismo em Polycytenidae e Cimicidae. Os cimicídeos são conhecidos como "bed bugs" (percevejos de cama), são hematófagos e parasitam aves, morcegos e humanos. Todos os membros dessa família possuem um modo incomum de cópula, a inseminação extragenital traumática, onde o macho insere o parâmero através da parede abdominal da fêmea e alcança o espermalégio, onde deposita o esperma (Usinger, 1966).

Vários estudos tentam explicar as relações filogenéticas dentro de Heteroptera utilizando dados moleculares e morfológicos (Schuh e Slater, 1995; Forero, 2008; Weirauch e Schuh, 2011). A partir dessas análises é possível verificar que as relações entre as infraordens de Heteroptera ainda não estão bem definidas. Atualmente, há três hipóteses de classificação para as infraordens de Heteroptera, baseadas em evidências morfológicas e moleculares, que foram propostas por: Wheeler et al (1993) e Xie et al (2008) onde todas as infraordens são monofiléticas e Sherbakov e Popov (2002) e Mahner (1993) que assumem que Nepomorpha é um táxon irmão do restante dos Heteroptera (Ver Fig. 1, Weirauch e Schuh, 2011).

Sendo assim, os dados provenientes de estudos morfológicos e anatômicos do aparelho reprodutor masculino e espermatozoides podem ser úteis para a compreensão da filogenia dos Heteroptera em geral, como também possibilitam compreender sobre a biologia reprodutiva e comportamento dos insetos.

## 1.2. Sistema reprodutor masculino em Heteroptera

Em geral o sistema reprodutor dos Heteroptera consiste de um par de testículos ligados a um par de ductos deferentes associados à glândulas acessórias e um ducto ejaculatório comum. Cada testículo é constituído por um número variável de folículos, que podem ser de 1 a 7.

Em Nepomorpha, *Buenoa amnigenus* e *B. tarsalis* apresentam 2 folículos (Observação pessoal), assim como *Martarega* sp. (Notonectidae), *Gelastocoris flavus flavus* e *G. angulatus* (Gelastocoridae). Já *Belostoma anurum* e *B. micantulum* (Belostomatidae) possuem testículos com 5 folículos (Pereira et al., 2015). Em Gerromorpha, todas as espécies estudadas até o momento tem 2 folículos: *Limnogonus aduncus* e *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae, Castanhole et al., 2008; Pereira et al., 2015) e *Rhagovelia triangula* (Veliidae) (Observação pessoal), no entanto Pereira (2015) descreveu *Rhagovelia tenuipes* e *R. zela*, com apenas 1 folículo.

Em Pentatomomorpha, há espécies da mesma família com número de folículos diferentes, como em Pentatomidae, *Mormidae v-luteum* com 3 folículos e *Oebalus poecilus* e *O. ypisilongriseus* com 4 folículos (Souza et al., 2008) e *Antitheuchus tripterus* (Souza et al., 2007a) com seis folículos em cada testículo. Em Coreidae, *Zicca annulata* e *Chariesterus armatus* tem 4 folículos e *Anasa bellator*, *Athaumastus haematicus*, *Dallacoris obscura*, *D. pictus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus*,

*Sphictyrtus fasciatus* e *Coreus marginatus* tem 7 folículos (Souza et al., 2007b; Karakaya et al., 2012). Em Lygaeidae, *Nysius californicus* (Souza et al., 2007c), apresenta 7 folículos.

Em Cimicomorpha, *Cimex lectularius* (Cimicidae) possui 7 folículos (Davis, 1956), enquanto *Psallus* sp. (Miridae) (Mróz, 2012) possui 3 folículos. Os gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius* da família Reduviidae possuem 7 folículos por testículo (Gonçalves et al., 1987).

Em relação a morfologia testicular podem apresentar forma de leque, oval, circular, arredondado ou alongado. Os testículos estão envoltos por uma cápsula conjuntiva cuja coloração pode ser incolor ou colorido: amarelo, alaranjado, vermelho ou verde (Gomes et al., 2013; Pereira et al., 2015).

Muitos Heteroptera possuem vesículas seminais, a qual abrange quase inteiramente o ducto deferente ou se restringe a apenas uma porção dilatada do mesmo (Jamieson et al., 1999). Em geral, os espermatozoides saem dos testículos em direção às vesículas seminais onde ficam armazenados até a cópula.

As glândulas acessórias, assim como os demais órgãos do aparelho reprodutor, dispõem de considerável diversidade morfológica. Por fim, os ductos ejaculatórios compreendem canais de comprimentos variados pelos quais ocorre a condução dos espermatozoides à genitália masculina durante a cópula.

### 1.3. Estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides

Espermatozoides de insetos são células especializadas e diversificadas e apresentam características morfológicas e estruturais que tem contribuído para distinguir, até mesmo, espécies e inferir sobre as relações filogenéticas (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto et al., 2008; Barcellos et al., 2015).

Entre os Heteroptera, a ultraestrutura de espermatozoides foi descrita em espécies de Leptopodomorpha (Afzelius et al., 1985), Gerromorpha (Tandler e Moriber, 1966; Dallai e Afzelius, 1980; Lee, 1985), Nepomorpha (Afzelius et al., 1976; Lee e Lee, 1992), Pentatomomorpha (Báo e Souza, 1994; Trandaburu, 1973; Araújo et al., 2011) e Cimicomorpha (Dolder, 1988; Baffa et al., 2017).

Os espermatozoides dos Heteroptera podem chegar a grandes tamanhos como em *Notonecta glauca* (Notonectidae) (Lee e Lee, 1992), que atinge 16.500 µm de

comprimento. Quanto à ultraestrutura, os espermatozoides apresentam cabeça contendo acrossomo e núcleo, um adjunto do centríolo que liga os elementos da cabeça ao flagelo. O adjunto do centríolo pode estar reduzido ou bem desenvolvido, podendo ser único ou bifurcado. O flagelo, por sua vez é composto pelo axonema com padrão  $9 + 9 + 2$ , que encontra-se ligado aos dois derivados mitocondriais por duas pontes. Os derivados mitocondriais podem ser simétricos ou assimétricos, envolver parcialmente ou totalmente o axonema e apresentam de duas a três inclusões paracristalinas. Ainda podemos citar a ausência de corpos acessórios. Todas essas características são consideradas sinapomorfias para os Heteroptera (Dallai e Afzelius, 1980; Jamieson et al., 1999).

Em Pentatomomorpha o polimorfismo entre os espermatozoides ocorre em Pentatomidae, Largidae e Pyrrhocoridae (Bowen, 1920; Schrader e Leuchtenberger, 1950; Araújo et al., 2011; 2012), porém ainda não foi relatado para outras infraordens de Heteroptera.

O número de espermatozoides por cisto indica quantas divisões celulares ocorreram durante a espermatogênese e é espécie-específico. Por essa razão tem sido usado como informação adicional na sistemática de insetos (Schiff et al., 2001; Lino-Neto et al., 2008). Em Heteroptera pode variar de 16 espermatozoides por cisto em Gerridae (observação pessoal) à 1024 em Belostomatidae (Lee e Lee, 1992).

#### 1.4. Referências Bibliográficas

- Afzelius, B.A., Baccetti, B., Dallai, R., 1976. The giant spermatozoon of *Notonecta*. J. Submicrosc. Cytol. 8, 149–16.
- Afzelius, B.A., Dallai, R., Lindskog, P., 1985. Spermatozoa of saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). J. Ultrastruct. Res. 90, 304–312.
- Araújo, V.A., Lino-Neto, J., de Sousa Ramalho, F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). Micron 42, 560–567.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). Acta Zool. 93, 239–244.

- Bachmann, A.O., 1998. Heteroptera acuáticos. In: Morrone, J.J. & Coscarón, S. (Eds.) Biodiversidad de artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonómica. La Plata. Ediciones Sur. 1, 163–180.
- Báo, S.N., Souza, W., 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). Tissue Cell 26, 299–308.
- Baffa, A.F., Camara, D.C.P., Santos-Mallet, J.R., da Silva, E. R., Costa, J., Freitas, S.P.C., 2017. Sperm dimorphism in the *Triatoma brasiliensis* species complex and its applications. Med.Vet. Entomol. Doi: 10.1111/mve.12226. 1–8.
- Barcellos, M.S., Martins, L.C.B., Cossolin, J.F.S., Serrão, J.E., Delabie, J.H.C., Lino-Neto, J., 2015. Testes and spermatozoa as characters for distinguishing two ant species of the genus *Neoponera* (Hymenoptera: Formicidae). Fla. Entomol. 98, 1254–1256.
- Bowen, R.H., 1920. Studies on insect spermatogenesis. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. Biol. Bull. 39, 316–362.
- Castanhole, M.M.U., Pereira, L.L.V., Souza, H.V., Bicudo, H.E.M.C., Costa, L.A.A., Itoyama, M.M., 2008. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior. Genet. Mol. Res. 7, 1398–1407.
- Costa Lima, A., 1940. Insetos do Brasil. 2º tomo, Hemípteros. Escola Nacional de Agronomia, RJ. 351 pp.
- Cryan, J.R., Urban, J.M., 2012. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? Syst. Entomol. 37, 7–21.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). J. Morphol. 164, 301–309.

- Davis, N.T., 1956. The morphology and functional anatomy of the male and female reproductive systems of *Cimex lectularius* L. (Heteroptera, Cimicidae). Ann. ent. Soc. Amer. 49, 466–93.
- Dolder, H., 1988. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 1012, 159–164.
- Forero, D., 2008. The systematics of the Hemiptera. Rev. Colomb. Entomol. 34, 1–21.
- Gomes, M. O., Castanhole, M.M.U., Souza, H.V., Murakami, A.S., Firmino, T.S.S., Saran, P.S., Banho, C.A., Monteiro, L.S., Silva, J.C.P., Itoyama, M.M., 2013. Morphological aspects of the testes of 18 species of terrestrial of Heteroptera from Northwestern São Paulo (Brazil). Biota Neotrop. 13, 131–135.
- Gonçalves, T.C.M., Lent, H., Almeida, J.R., 1987. Estudo anatômico e morfométrico dos folículos testiculares de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online] 82, 543–550.
- Grazia, J., Cavichioli, R.R., Wolff, V.R.S., Fernandes, J.A.M., Takiya, D.M., 2012. Hemiptera. In: Rafael, J.A., Melo, G.A.R., et al. (Ed). Insetos do Brasil: Diversidade e taxonomia. Holos, Ribeirão Preto. 28, 810.
- Jamieson, B.G.M., 1987. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, 320 pp.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. Insects: their spermatozoa and phylogeny. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A., Plymouth UK, 555 pp.
- Karakaya, G., Özyurt, N., Candan, S., Suludere, Z., 2012. Structure of the male reproductive system in *Coreus marginatus* (L.) (Hemiptera: Coreidae) Türk. Entomol. Derg. 36, 193–204.
- Lee, Y.H., 1985. Spermatogenesis of the water strider, *Gerris paludum* (Heteroptera, Gerridae). J. Ultrastruct. Res. 90, 235–250.

- Lee, Y.H., Lee, C.E., 1992. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. *Zool. Sci.* 9, 971–981.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., Mancini, K., Mercati, D., Dallai, R., 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40, 185–193.
- Mahner, M., 1993. Systema Cryptoceratorum Phylogenicum (Insecta, Heteroptera). *Zoologica* 48, 1–302.
- McCafferty, W.P., 1981. Water bugs (order Hemiptera). In: *Aquatic entomology. The fishermen's and ecologists' illustrated guide to insects and their relatives*. Boston. Sci Books Int. 448 pp.
- Mróz, E., 2012. The structure of the male reproductive system of the genus *Psallus* Fieber (Hemiptera: Heteroptera: Miridae) *Pol. Pismo Entomol.* 81, 107–118.
- Özyurt, N., Candan, S., Suludere, Z., Amutkan, D., 2013. Morphology and histology of the male reproductive system in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) based on optical and scanning electron microscopy. *J. Entomol. Zool. Stud.* 1, 40–46.
- Pereira, L.L.V., Alevi, K.C.C., Castanhole, M.M.U., Moreira, F.F.F., Barbosa, J.F., Itoyama, M.M., 2015. Cytogenetics analysis and testis morphology of aquatic species of the families Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae, and Veliidae (Heteroptera). *J. Insect Sci.* 15, 1–10.
- Popov, Y.A., 1971. Origin and main evolutionary trends of Nepomorpha bugs. *Proceedings of 13th International Congress of Entomology.* 1, 282–283.
- Scherbakov, D.E., Popov, Y.A., 2002. Superorder Cimicidea Laicharting, 1781. Order Hemiptera Linne, 1758. The bugs, cicadas, plantlice, scale insects, etc. In: *History of insects*. Ed. AP Rasnitsyn, DLJ Quicke, pp. 143–57. Dordrecht, The Nether: Kluwer Academic. 517 pp.

- Schrader, F., Leuchtenberger, C., 1950. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). Exptl. Cell Res. 1, 421–452.
- Schuh, R.T., Slater, J.A., 1995. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University Press, Ithaca, New York. 12, 336 pp.
- Schuh, R.T., Weirauch, C., Henry, T.J., Halbert, S.E., 2008. Curaliidae, a new family of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) from the Eastern United States. Ann. Entomol. Soc. Am. 101, 20–29.
- Schiff, N., Flemming, A.J., Quicke, D.L.J., 2001. Spermatodesmata of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta): evidence for multiple increases in sperm bundle size. J. Hymenopt. Res. 10, 119–125.
- Souza, H.V., Bicudo, H.E.M.C., Costa, L.A.A., Itoyama, M.M., 2007a. A study of meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). Eur. J. Entomol. 104, 353–362.
- Souza, H.V., Arakaki, R.L.M., Dias, L.N., Lima, A.S.M., Costa, L.A.A., Bicudo, H.E.M.C., Itoyama, M.M., 2007b. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family. Cytologia 72, 49–56.
- Souza, H.V., Bicudo, H.E.M.C., Itoyama, M.M., 2007c. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). Genet. Mol. Res. 6, 33–40.
- Souza, H.V., Castanhole, M.M.U., Bicudo, H.E.M.C., Costa, L.A.A., Itoyama, M. M., 2008. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera). Genet. Mol. Biol. 31, 686–691.
- Štys, P., Jansson, A., 1988. Check-list of recent family-group and genus-group names of Nepomorpha (Heteroptera) of the world. Acta Entomol. Fenn. 50, 1–4.

- Štys, P., Kerzhner, I., 1975. The rank and nomenclature of higher taxa in recent Heteroptera. *Acta Entomol. Bohemoslov.* 72, 64–79.
- Tandler, B., Moriber, L.G., 1966. Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remigis* (Say). *J. Ultrastruct. Res.* 14, 391–404.
- Trandaburu, V., 1973. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). *Trav. Mus. Hist. Nat.* 13, 137–145.
- Usinger, R. L., 1966. Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera). College Park, Md., Entomol. Soc. Am. 585 pp.
- Weirauch, C., Schuh, R.T., 2011. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 487–510.
- Wheeler, W.C., Schuh, R.T., Bang, R., 1993. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. *Entomol. Scand.* 24, 121–37.
- Xie, Q., Tian, Y., Zheng, L., Bu, W., 2008. 18S rRNA hyper-elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 463–71.

## **2. Objetivo**

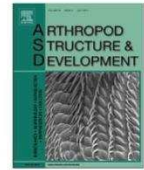
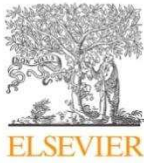
Descrever a morfologia do sistema reprodutor e espermatozoides de duas espécies de Nepomorpha e Cimicomorpha (Heteroptera), contribuindo com informações que para auxiliar na compreensão da biologia reprodutiva e sistemática deste grupo de insetos.

### **3. Artigos**

#### 3.1. Capítulo 1

## **Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera: Notonectidae)**

Artigo publicado na Revista Arthropod Structure & Development



## Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera: Notonectidae)



Ademária M. Novais<sup>a, b</sup>, Glenda Dias<sup>a</sup>, José Lino-Neto<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso, Campus Juína, 78320-000, Juína, Mato Grosso, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 15 March 2017  
Accepted 20 April 2017  
Available online 18 May 2017

**Keywords:**  
Hemiptera  
Nepomorpha  
Backswimmer  
Sperm ultrastructure

### ABSTRACT

The testicular, spermatogenesis and sperm morphology of the backswimmer *Martarega bentoi* was described using light and transmission electron microscopy. In this species, a pair of testes, two deferent ducts, two different pairs of accessory glands, and an ejaculatory duct form the male reproductive system. Each testis consists of two testicular follicles, which are arranged side by side in snail shape. The follicles are filled with cysts at different stages of spermatogenesis, but in the same cyst the germ cells (up to 64) are in the same stage. At the end of spermatogenesis, the sperm cells are very long, with the flagellum measuring approximately 2500  $\mu\text{m}$  in length, the nucleus only 19  $\mu\text{m}$ , and the acrosome, with two distinct regions, 300  $\mu\text{m}$ . The flagellum is composed of an axoneme, with a 9 + 9 + 2 microtubular pattern, and 2 asymmetric mitochondrial derivatives (MDs). These have the anterior ends inserted into two cavities at the nucleus base, exhibit two paracrystalline inclusions, and have bridges linking them to the axoneme. Few spermatozoa per cyst, asymmetry in size and shape of the MDs, as well as their insertion at the nuclear base are characteristics considered derived, and that differentiate the sperm of *M. bentoi* from those of the Nepomorpha, Belostomatidae and Nepidae.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The Hemiptera, with approximately 89,000 species known worldwide, are distributed in the four suborders currently recognized: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha and Heteroptera (Cryan and Urban, 2012; Grazia et al., 2012). In the Heteroptera suborder occur species with terrestrial, aquatic and semiaquatic habits (Grazia et al., 2012). According to Stys and Kerzhner (1975), this suborder is composed of seven infraorders: Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Pentatomomorpha and Cimicomorpha (Fig. 1 in Wheeler et al., 1993). Nepomorpha is composed of aquatic heteropterans (Popov, 1971), comprising about 2000 species, distributed among 11 families (Stys and Jansson, 1988), among them the Notonectidae. The species of this family are commonly known as backswimmers for swimming with their backs facing down, using their long posterior legs as oars to propel themselves through the water.

In the Heteroptera in general, the male reproductive system is formed by one pair of testes, two deferent ducts, an ejaculatory duct and accessory glands. Each testis consists of testicular follicles ranging in shape and numbering from one to seven pairs (Gonçalves et al., 1987; Gomes et al., 2013). In the adult males, the follicles are commonly filled with cysts in the different phases of spermatogenesis, indicating that sperm production continues into adulthood in these insects. The sperm morphology has been studied in several groups (Jamieson et al., 1999). In the sperm of these insects, the flagellum region is characterized by only one axoneme, with a 9 + 9 + 2 microtubular pattern, and connected by bridges to the two mitochondrial derivatives (MD) (Mercati et al., 2009). In general, the MDs are similar and exhibit two or more paracrystalline regions (Afzelius et al., 1976; Baccetti et al., 1977; Dallai, 2014). In the nucleus-flagellum transition region, these sperm exhibit a centriole adjunct, in which the anterior tips of the MD are inserted (Dias et al., 2016). In the head region, they exhibit a simple acrosome, without perforatorium, and a nucleus uniformly filled by very electron-dense chromatin. Several studies have shown that the bridges connecting the axoneme to MD, more than one paracrystalline material in the MD, and absence of accessory

\* Corresponding author.  
E-mail address: [jslinoneto@gmail.com](mailto:jslinoneto@gmail.com) (J. Lino-Neto).

bodies between the axonema and the MD are synapomorphic characteristics for Heteroptera.

Although the male reproductive system and the spermatozoa of Heteroptera show the number of components more or less constant, the shape and size of each of these components, as well as the arrangement between them, can vary markedly even among related species. Considering that these traits may configure additional characters for taxonomic analysis and understanding the relationships between the various heteropteran groups, in this work we describe the morphology of the male reproductive system and spermatozoa of the Nepomorpha *M. bentoi*, and compare it with that observed in other Heteroptera, especially Pentatomomorpha, highlighting those traits not yet described in any other specie of these insects.

## 2. Material and methods

Eighteen sexually mature males of *M. bentoi* were collected in ponds on the campus at the Federal University of Viçosa, Viçosa (20° 45' 14" S, 42° 52' 55" W 648 m), Minas Gerais, Brazil.

### 2.1. Light microscopy of testes and spermatozoa

To carry out morpho-anatomy of the testes, the reproductive systems of three adult males were dissected and photographed with a stereoscopic microscope (Discovery V-20 Zeiss) coupled with an AxioCam MRc Zeiss camera. To obtain the histological sections, the testes of four individuals were dissected and fixed for 24 h in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. The material was washed for 2 h in the same buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h, and dehydrated in alcohol solutions of increasing concentrations: 30, 50, 70, 90 and 100%. For inclusion, the testes were immersed in historesin, and semi-thin sections (1 µm thick) were obtained with a microtome Leica RM 2255 (Leica Corporation, Wetzlar, Germany) with glass knives. These were transferred to histological slides stained with Harris hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) for 15 min, washed in running water for 10 min, stained with eosin (Sigma–Aldrich, USA) for 1 min, and rapidly rinsed in tap water; and some slides were additionally stained with toluidine blue for 30 s and rapidly rinsed in tap water.

To determine the size of the sperm bundle, the testes of five individuals were dissected in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. The bundles were spread on histological slides, fixed in 4%

paraformaldehyde for 15 min, washed in distilled water and dried at room temperature. To perform the measurements of the nucleus and acrosome of the sperm, the deferent ducts of these five individuals were dissected and the spermatozoa were spread on histological slides. These were stained for 20 min with 0.2 mg/ml DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole), washed in distilled water and mounted with 50% sucrose.

All observations and light photographs were made using an Olympus BX-60 microscope with Olympus Q-Color 3 digital camera attached. The slides stained with DAPI were photographed under epifluorescent illumination in this same microscope equipped with a BP360–370 nm excitation filter. All the measurements were realized using the Image-Pro Plus software (Media Cybernetics). For the histological image of the testis (Fig. 2), 98 frames were captured in the 40× objective and later mounted in a panoramic image using the Photomerge command of Adobe Photoshop CS5 software.

### 2.2. Transmission electron microscopy (TEM)

The testes and deferent ducts of six specimens were dissected in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution containing 2% sucrose and 5 mM CaCl<sub>2</sub> in this same buffer. The material was post-fixed in a 1% osmium tetroxide solution for 1 h, dehydrated in an increasing alcohol series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%), infiltrated, and finally embedded in epoxy resin (Epon 812). Ultrathin sections (~70 nm) were contrasted with solutions of 3% uranyl acetate and 0.2% lead citrate. All samples were observed and photographed using a transmission electron microscope (Zeiss EM109), operating at 80 kV, at the Center for Microscopy and Microanalysis at UFV.

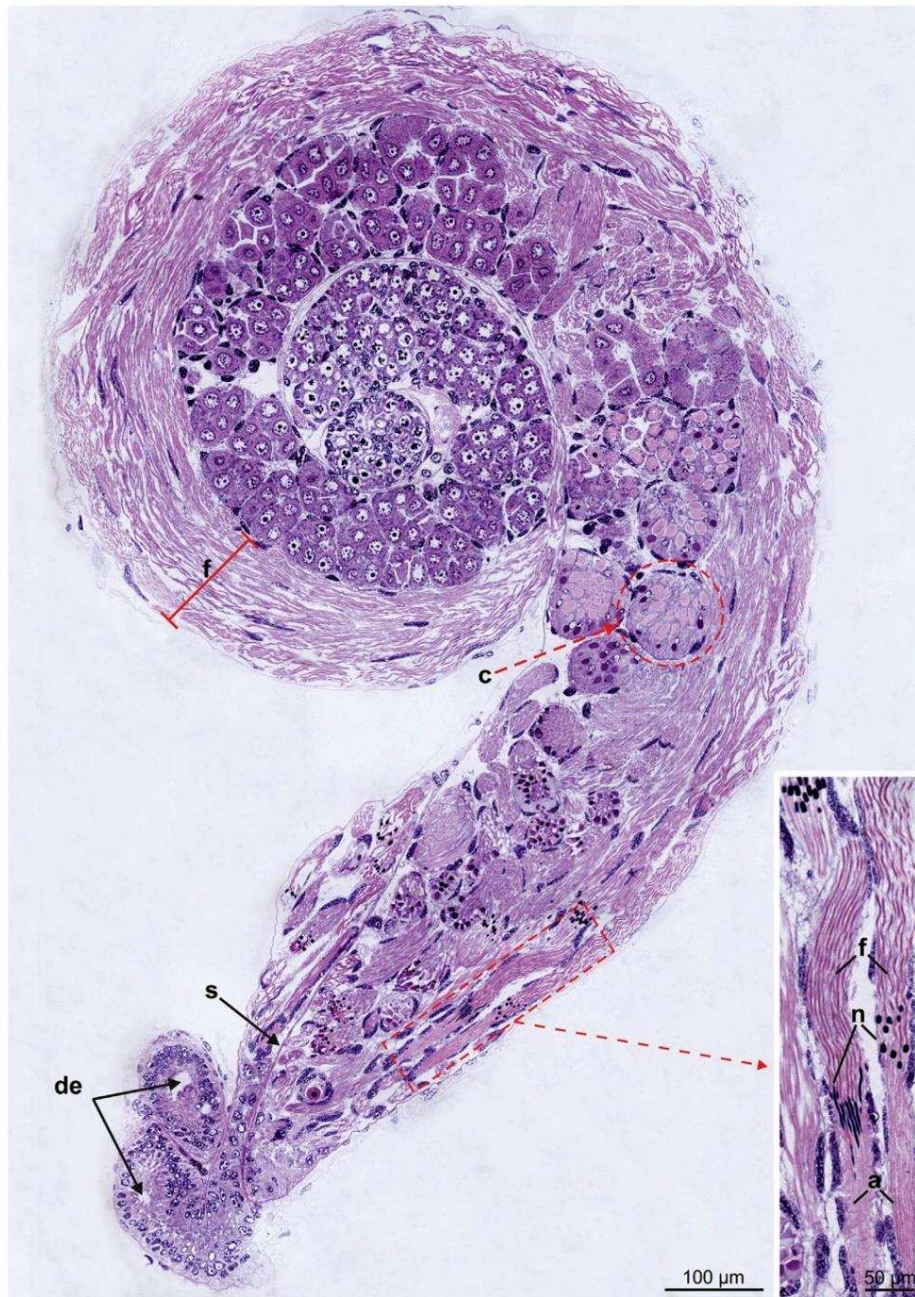
## 3. Results

### 3.1. Male reproductive system

The male reproductive system of *M. bentoi* consists of a pair of testes measuring about 3 mm in length (Fig. 1A). Each testis consists of two follicles of whitish color arranged side by side in snail shape, and coated with a clear conjunctive capsule (Fig. 3A). From the proximal end of each follicle emerges an efferent duct (Fig. 2) that then later join together, forming a long and thin deferent duct (Fig. 1A and B). The deferent ducts, where the spermatozoa remain until copulation, flow into the ejaculatory duct. Two different pairs



**Fig. 1.** Photomicrograph of the male reproductive system of *M. bentoi*. **A)** Total assembly of the reproductive system showing the pair of testes (t), deferent duct (dd) and a pair of accessory glands linear (lag), the other pair enovelled (eag). **B)** A testis with two follicles (fl) side by side and in snail shape and part of the deferent duct (dd).



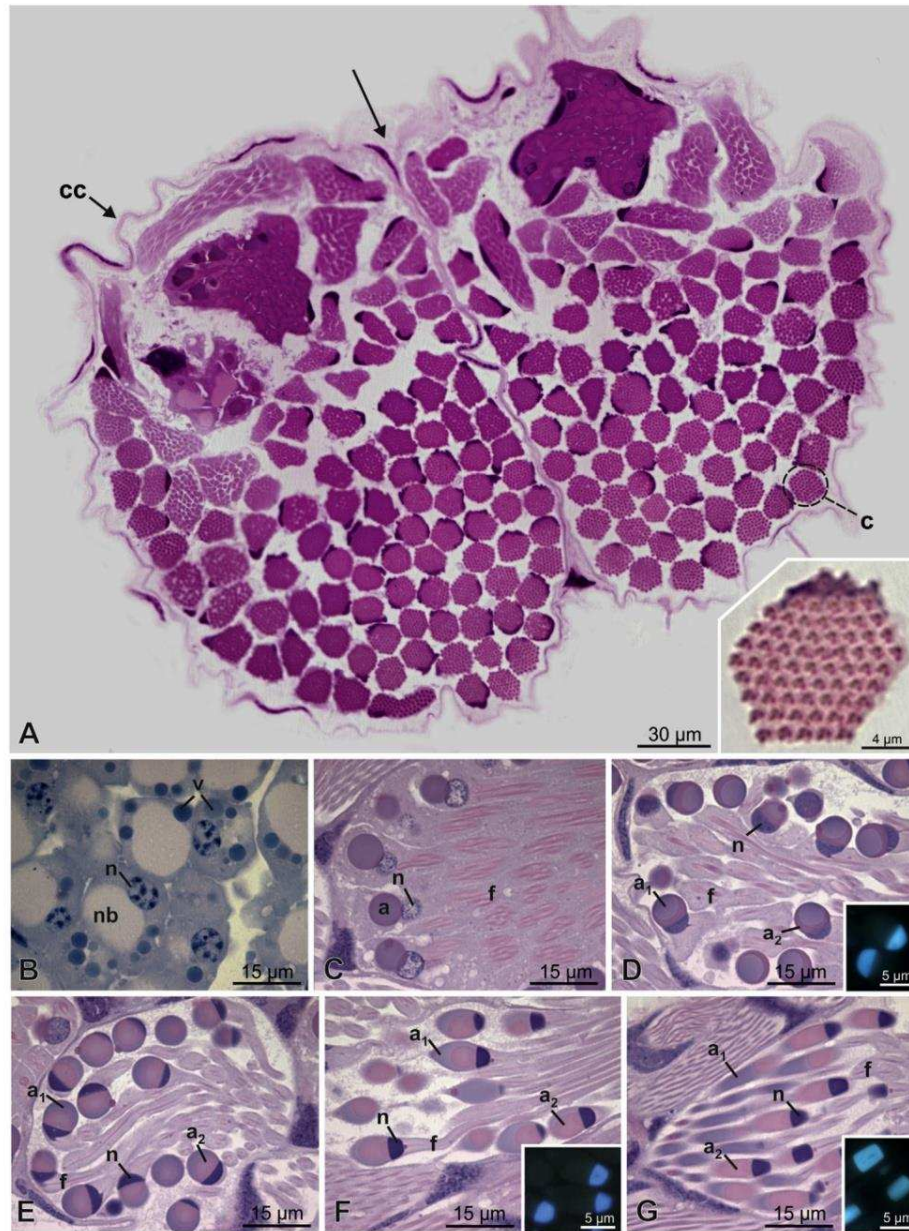
**Fig. 2.** Testis in longitudinal section showing cysts containing cells at different stages of spermatogenesis (c), efferent ducts (de), septal between follicles (s), and flagella (f). Detail showing two cysts in advanced stages of spermiogenesis. Nucleus (n), acrosome (a).

of tubular accessory glands (Fig. 1A) are associated with the ejaculatory duct: a pair is linear and located side-by-side to the deferent ducts, the other pair is enovelled together with the ejaculatory duct. The follicles are completely filled with cysts containing germ cells at different stages of spermatogenesis, in an orderly manner, from the distal to the proximal end (Fig. 2). However, these cysts are observed mainly in the concave face of the follicles since the convex

face is used to accommodate the long flagella (2.5 mm) of the spermatids in the final stages of spermiogenesis (Figs. 2, 3A).

### 3.2. Spermiogenesis and sperm

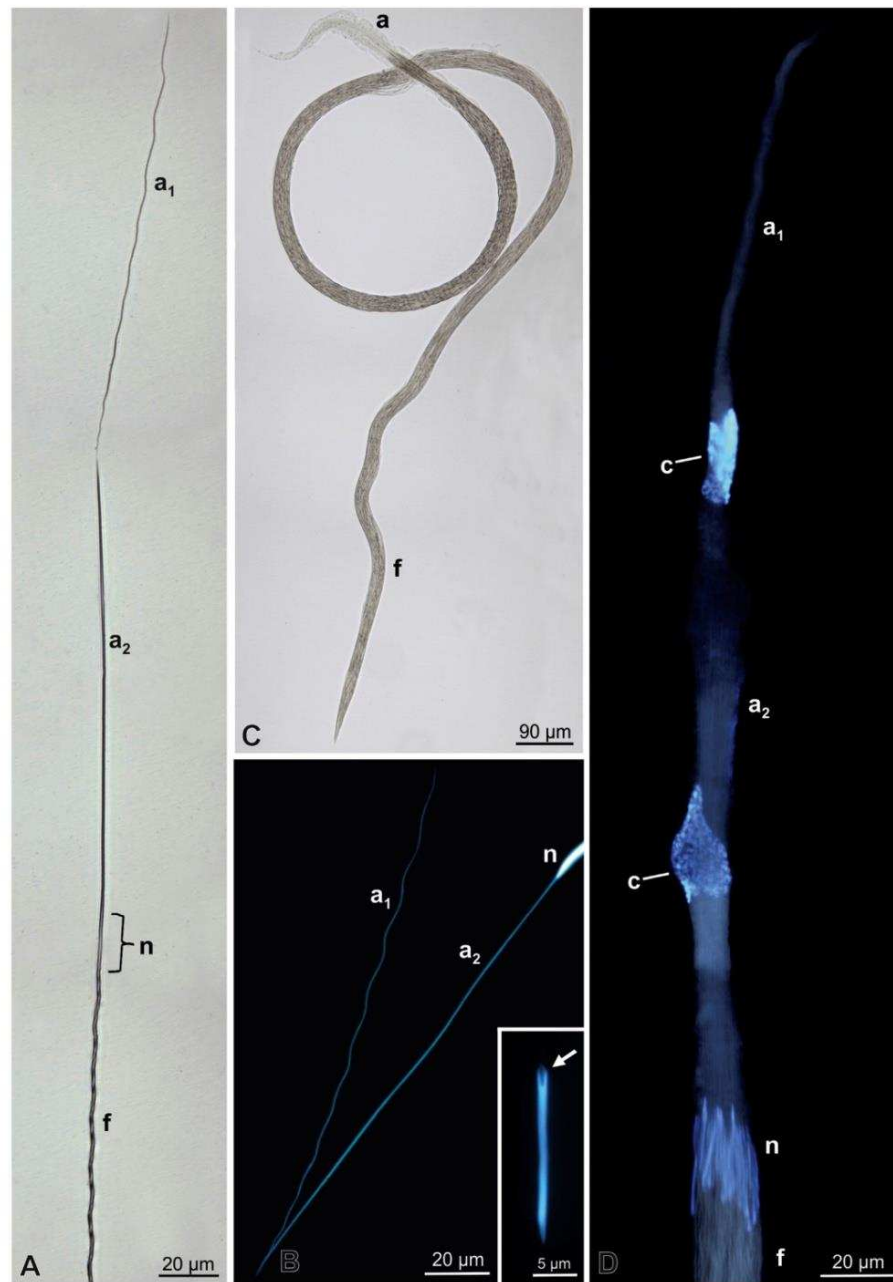
In the initial spermatids (Fig. 3B), numerous vesicles are observed, which merge to form the acrosomal vesicle in the



**Fig. 3.** Testis in cross section (A) and cysts at different stages of spermiogenesis (B–G). Note the septum (arrow) between the two follicles, which are filled by cysts (c) with 64 spermatozoa each (detail). The details in the figures D–G show nuclei (n) in respective phases of spermiogenesis stained with DAPI. Conjunctive capsule (cc), nebkern (nb), vesicles (v), acrosomal vesicles (a), flagellum (f), region 1 of the acrosomal vesicle ( $a_1$ ), region 2 of the acrosomal vesicle ( $a_2$ ).

spermiogenesis stages (Fig. 3C–G) and, finally, the spermatozoal acrosome (Fig. 4). Throughout the spermiogenesis the acrosomal vesicles get modified and two regions are observed: the anterior with affinity for the basic dye hematoxylin, and the posterior, in contact with the nucleus, with affinity for the acid dye eosin (Fig. 3D–G). These two regions refer, respectively, to  $a_1$  and  $a_2$  in both the spermatids (Figs. 3D–G, 5A and B) and mature spermatozoa (Figs. 4A, C and D, 6A–G, 7).

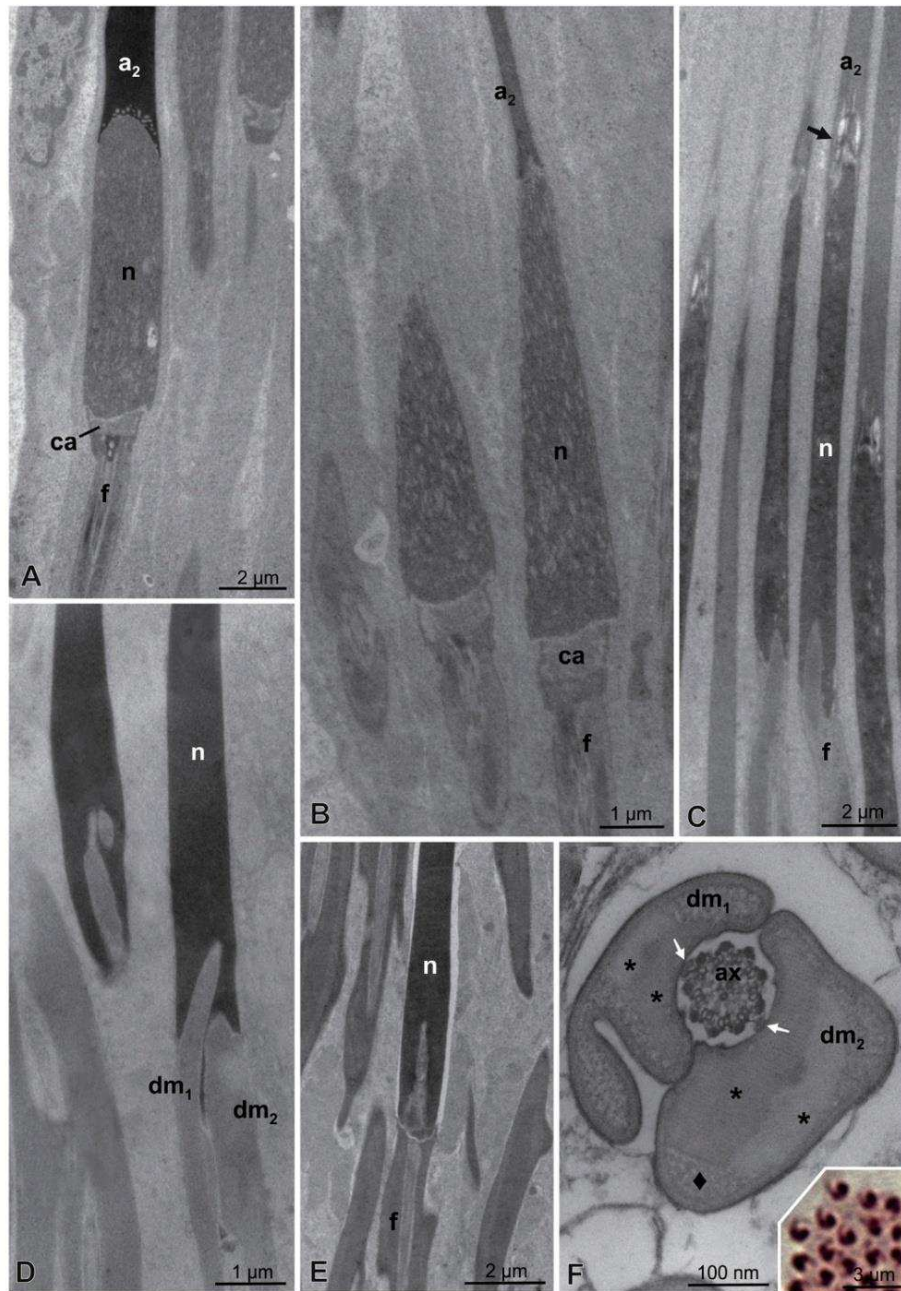
The nucleus also assumes different shapes as it lengthens during spermiogenesis, varying from spherical in young spermatids (Fig. 3B and C), through a half-moon shape (Fig. 3D–F), to cylindrical in the late spermatids (Fig. 3G). The mitochondria fuse in the still-young spermatids forming the nebkern (Fig. 3B), which separates into two mitochondrial complexes during spermiogenesis and, in the end, will give rise to the two MDs in the sperm cell (Figs. 5D and F, 7).



**Fig. 4.** Light microscopy of sperm and sperm bundles. **A)** Sperm anterior region showing the two acrosomal regions ( $a_1$  and  $a_2$ ), the nuclear region (n) and the beginning of the slightly spiraled flagellum (f). **B)** Sperm anterior region stained with DAPI showing the nucleus, the two acrosomal regions and, in detail, the bifurcated nuclear base (arrow). **C)** Sperm bundle showing the acrosomal (a) and flagellar (f) regions. **D)** The anterior region of a sperm bundle stained with DAPI showing the sperm nuclei, the cystic cell nuclei (c), and the two acrosomal regions.

In *M. bentoi*, we observe only one sperm morphotype, kept in bundles in the deferent ducts as a result of cystic spermiogenesis (Figs. 2, 3A). Each bundle contains up to 64 sperm (Fig. 3A detail), measuring approximately 2800  $\mu\text{m}$  in length (Fig. 4B). Under the

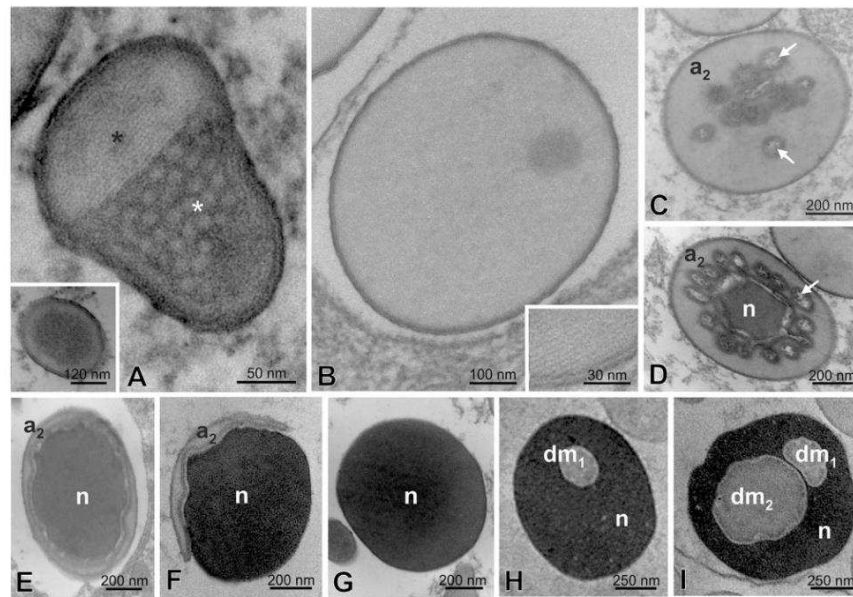
conventional light microscope it is not possible to distinguish the nucleus from the flagellar region as well as from the acrosome (Fig. 4A). However, we solved this difficulty using the DNA-specific fluorescent dye DAPI (Fig. 4C and D).



**Fig. 5.** TEM of spermatids and sperm in longitudinal (A–E) and cross sections (F). **A, B**) Spermatids showing nucleus (n) and the acrosomal region ( $a_2$ ). Flagellum (f), centriole adjunct (ca). **C**) Nuclear region showing the acrosome-nucleus (arrow) and nucleus-flagellum transitions. **D, E**) Nucleus-flagellum transition showing the insertion of the two mitochondrial derivatives ( $dm_1$  and  $dm_2$ ) at the nuclear base. **F**) Cross section of a flagellum showing the asymmetric mitochondrial derivatives with two paracrystalline areas (asterisks) and fully surrounded the axoneme (ax). The arrows show the bridges between the derivatives and axoneme. Amorphous region (diamond). Detail: Flagella in semithin section showing that the irregular shape of the mitochondrial derivatives is also observed under the light microscope.

In mature sperm, the acrosome is very long, measuring approximately 300  $\mu\text{m}$ , with each of the two regions measuring 150  $\mu\text{m}$ . The anterior region is thinner and spiraled (Fig. 4A and C). When observed in cross-section under a TEM, this region is

piriform (Fig. 6A), except in the circular tip (Fig. 6A detail), and has two paracrystalline areas with different patterns and densities (Figs. 6A, 7). Already, the posterior region, which is juxtaposed to the nucleus, is smooth (Fig. 4A), has a circular shape and a constant



**Fig. 6.** TEM of sperm in cross sections. **A)** Acrosomal anterior region ( $a_1$ ) showing the two paracrystalline areas (asterisks). The detail shows the tip of this region. **B)** Acrosomal posterior region ( $a_2$ ) with only one paracrystalino (detail). **C–F)** Acrosome–nucleus transition region, showing the concave base of the acrosome, where the anterior end of nucleus ( $n$ ) is inserted, with several invaginations (arrows). **G)** Nuclear median region. **H–I)** Nucleus–flagellum transition showing the tips of the mitochondrial derivatives ( $dm_1$  and  $dm_2$ ) inserted in the nuclear base.

diameter, equal to that of the nucleus ( $\pm 0.5 \mu\text{m}$ ). It is formed by only a paracrystalline area with pattern and density equal to the less dense area of the anterior region (Figs. 6C, 7). The base of this region is asymmetric and concave, where the anterior tip of the nucleus is inserted, with several small invaginations (Figs. 5A–C, 6D–G, 7). The nucleus has compact chromatin, and is electron-dense (Figs. 5D, 6F–J). It measures only about  $19 \mu\text{m}$  in length, exhibits a constant diameter, with the anterior tip tapered and housed in the acrosome base (Figs. 4C, 5A, 6E and F, 7). The nuclear base exhibits two cavities, approximately  $2 \mu\text{m}$  deep, in which the anterior ends of the two MDs are inserted (Figs. 4C detail, 5D and E, 6I and J, 7).

The flagellum is slightly spiraled (Fig. 4A) and consists of a  $9 + 9 + 2$  axoneme, with 9 accessory microtubules, 9 doublets and 2 central microtubules, and 2 MDs, but without accessory bodies (Figs. 5F, 7). The MDs, in cross-section, are quite asymmetrical in area and especially in shape, and they totally encircle the axoneme. Each mitochondrial derivative has two paracrystalline inclusions, an amorphous region, and bridges linking them to the axoneme (Figs. 5F, 7). The centriole adjunct was easily observed in the spermatids (Fig. 5A and B), but in the mature sperm it was either very discrete or non-existent (Fig. 5D).

#### 4. Discussion

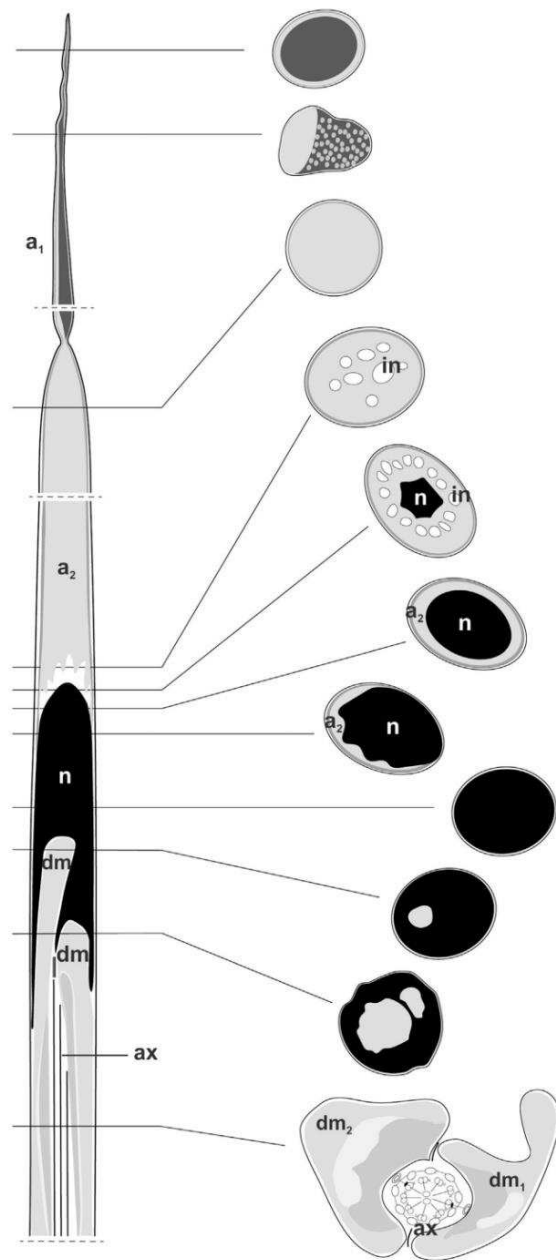
Testes with two follicles, such as those that occur in *M. bentoi*, were observed in another notonectid *Buenoa amnigenus*. Although Pereira et al. (2015) stated that each testis of this species had only one follicle, when these testes were disassembled using acetic acid at 45%, we could easily observe the two follicles per testicle. This same number of follicles per testis occur also in Gelastocoridae; however, in Belostomatidae (all Nepomorpha) was observed five

follicles per testis were observed (Pereira et al., 2015). It is interesting to note that all phylogenetic proposals put Belostomatidae and Nepidae as the most basal among Nepomorpha families. If so, it is possible to suppose that, at least in this infraorder, the most derivate, or most specialized families, tend to have fewer numbers of follicles per testis. The reduced number of follicles per testis certainly leads to a reduction in the sperm production, and this probably is related to the reproductive strategies of the species of these families.

The arrangement of the long flagella ( $2.8 \text{ mm}$ ) of late spermatids and spermatozoa side by side with the cysts in anterior stages of spermatogenesis observed in this species, allows housing the bundles of these cells in relatively short testes ( $3.0 \text{ mm}$ ). Thus, the testicular follicles may be thicker and possibly produce more spermatozoa, which would compensate, at least in part, for the lower production of these cells due to reduced numbers of follicles per testis.

Observing Fig. 1E of the work of Pereira et al. (2015), we note that the testes of *M. membranacea* are very similar to those of the species *M. bentoi* studied here. However, in *B. amnigenus*, the testicular follicles are very long and thin, resulting in highly spiraled testis (personal observation). There are still very few Notonectidae studied, but this information may indicate that the testicular characteristics observed in *M. bentoi* can be restricted to the *Martarega* genus.

The size of the spermatozoa in Nepomorpha can range from  $210 \mu\text{m}$  (*Diplonychus esakii*, Belostomatidae) to  $16,500 \mu\text{m}$  (*Notonecta glauca*, Notonectidae) (Lee and Lee, 1992). However, the longer spermatozoa were observed in Notonectidae family: *M. bentoi* with  $2800 \mu\text{m}$  and *N. glauca* with  $16,500 \mu\text{m}$  (Pitnick et al., 2009). Very long sperm are common in insects; however, the Notonectidae sperm can be considered unusually giant, since according to Pitnick



**Fig. 7.** Schematic drawing of the sperm anterior portion from longitudinal and cross sections, showing the anterior ( $a_1$ ) and posterior ( $a_2$ ) regions of the acrosome, nucleus (n), invaginations (in), mitochondrial derivatives ( $dm_1$  and  $dm_2$ ) and axoneme (ax). Schemes are not to scale.

et al. (2009) sperm larger than 1000  $\mu\text{m}$  are in this category. The reason why some insects produce giant sperm has not yet been well understood, and there are several hypotheses that try to explain how selective pressure is responsible for the evolution of the sperm increasing its length (Dallai et al., 2008).

The number of cell divisions from specific spermatogonia during spermatogenesis is species-specific. In *M. bentoï* there occur six cycles of divisions, four being mitotic cycles and two meiotic, resulting in 64 sperm per cyst. We did not observe variation in this number in any of the 20 analyzed cysts, which shows a great efficiency of the spermatogenesis in this species, since there is no sperm loss during this process. In other Nepomorpha, the sperm number per cyst is much higher: 512 in *Laccotrephes japonensis* (Nepidae) and 1024 in *Muljarus japonicus* (Belostomatidae) (Lee and Lee, 1992). However, in these families, the sperm are much smaller (260  $\mu\text{m}$  for *M. japonicus* and 370  $\mu\text{m}$  for *L. japonensis*) than those of Notonectidae. This suggests that the energetic investment necessary for the production of large sperm leads to a reduction in quantity, as suggested by Pitnick (1996). According to Virkki (1969) and Lachaise and Joly (1991), the advanced groups usually tend to have fewer spermatozoa per cyst, which would agree with the phylogenetic hypotheses proposed for Nepomorpha (Hua et al., 2009).

Sperm polymorphisms commonly occur in some orders of insects (Swallow and Wilkinson, 2002). In Hemiptera have already been observed in the suborders Auchenorrhyncha (Chawanji et al., 2006) and Heteroptera. In this suborder the polymorphism occurs in some of pentatomorphan families (Bowen, 1920; Schrader and Leuchtenberger, 1950; Araújo et al., 2011, 2012; Mercati and Dallai, 2016). However, in Nepomorpha (Belostomatidae and Nepidae (q.v.), and in the notonectid studied here) only one sperm morphotype was observed.

As expected, *M. bentoï* sperm showed the three ultrastructural features considered synapomorphies for Heteroptera: bridges connecting the axoneme to MDs, more than one paracrystalline material in the MDs, and the absence of accessory bodies along with the flagellum (Dallai et al., 2016). However, these sperm exhibit characteristics observed only in Notonectidae, and still others have not yet been described for any Hemiptera.

Mitochondrial derivatives quite asymmetric in area and shape, and totally involving the axoneme, were also observed in *N. glauca* (Afzelius et al., 1976). However, in other Heteroptera MDs symmetrical in area and shape have been observed, and partially involving the axoneme (Dallai and Afzelius, 1980). The anterior tips of the MDs inserted into cavities at the nuclear base had not yet been observed in any other Heteroptera, not even in Nepomorpha. For example, in Nepidae and Belostomatidae, the tips of the MDs are inserted into structures known as centriole adjunct (Lee and Lee, 1992). In that same way, it occurs in Pentatomorpha (Pentatomidae, Araújo et al., 2011; Largidae, Araújo et al., 2012; Plataspidae, Dias et al., 2016), and Cimicomorpha (Reduviidae, Maia, 2009).

About the acrosome, assuming that at 100  $\mu\text{m}$  it is already considered long (Dallai et al., 2014), it is possible to say that the acrosome of *M. bentoï* sperm, measuring 300  $\mu\text{m}$ , is an unusually long structure. Although it seems that a very long acrosome is a characteristic of many aquatic and semi-aquatic Heteroptera, for instance, in *Gerris remigis* sperm (Gerromorpha: Gerridae), the acrosome measured 2500  $\mu\text{m}$  in length (Tandler and Moriber, 1966). On the other hand, an acrosome with two regions, with the concave base overlapping the nucleus tip, and also with small invaginations at its base, are characteristics that can be typical of this species, since in the notonectid *N. glauca* the acrosome is parallel to the nucleus (Afzelius et al., 1976). Interestingly, the main features observed only in *M. bentoï* sperm can be easily observed using only light microscopy, for example, the two acrosomal regions, the bifurcated nuclear base, and the asymmetry of the MDs (Figs. 4, 5F). This makes it very easy to observe the occurrence or not of these characteristics in other Nepomorpha.

In conclusion, the number of spermatozoa per cyst, the sperm and acrosome sizes, as well as the acrosome formed by two regions, the asymmetry in size and shape of MDs, and the insertion of these at the nuclear base, are characteristics considered derivative, and differentiate the *M. bentoi* sperm from those of Belostomatidae and Nepidae, thus supporting the most derived condition proposed for Notonectidae in the Nepomorpha infraorder.

### Acknowledgments

We would like to thank the Dr. Julianna Freires Barbosa (Federal University of Rio de Janeiro) for identification of specimens, to Karen A. Salazar Niño for the schematic drawing of the Fig. 7, to the Nucleus of Electron Microscopy and Microanalysis of the UFV, and to GlobalEdico ([www.globaledico.com](http://www.globaledico.com)) for reviewing English language. This research was supported by the Brazilian Agencies FAPEMIG, CAPES and FINEP.

### References

- Afzelius, B.A., Baccetti, B., Dallai, R., 1976. The giant spermatozoon of *Notonecta*. J. Submicrosc. Cytol. 8, 149–216.
- Araújo, V.A., Lino-Neto, J., de Sousa Ramalho, F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). Micron 42, 560–567.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). Acta Zool. 93, 239–244.
- Baccetti, B., Dallai, R., Pallini, V., Rosati, F., Afzelius, B.A., 1977. Protein of insect sperm mitochondrial crystals. Crystallomitin. J. Cell Biol. 73, 594–600.
- Bowen, R.H., 1920. Studies on insect spermatogenesis. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. Biol. Bull. 39, 316–362.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 38, 373–388.
- Cryan, J.R., Urban, J.M., 2012. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? Syst. Entomol. 37, 7–21.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). J. Morphol. 164, 301–309.
- Dallai, R., Mercati, D., Giusti, F., 2008. Structural organization of the “zipper line” in *Drosophila* species with giant spermatozoa. J. Struct. Biol. 161, 43–54.
- Dallai, R., 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. Arthropod Struct. Dev. 43, 257–290.
- Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R.G., 2016. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. Annu. Rev. Entomol. 61, 1–23.
- Dallai, R., Gottardo, M., Mercati, D., Machida, R., Mashimo, Y., Matsumura, Y., Beutel, R.G., 2014. Giant spermatozoa and a huge spermatheca: a case of coevolution of male and female reproductive organs in the ground louse *Zorotypus impolitus* (Insecta, Zoraptera). Arthropod Struct. Dev. 43, 135–151.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., Dallai, R., 2016. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. Micron 82, 33–40.
- Grazia, J., Cavichioli, R.R., Wolff, V.R.S., Fernandes, J.A.M., Takiya, D.M., 2012. Hemiptera. In: Rafael, J.A., Melo, G.A.R., et al. (Eds.), Insetos do Brasil: Diversidade e taxonomia, vol. 28. Holos, Ribeirão Preto, p. 810.
- Gomes, M.O., Castanhole, M.M.U., Souza, H.V., Murakami, A.S., Firmino, T.S.S., Saran, P.S., Banho, C.A., Monteiro, L.S., Silva, J.C.P., Itoyama, M.M., 2013. Morphological aspects of the testes of 18 species of terrestrial Heteroptera from Northwestern São Paulo (Brazil). Biota Neotrop. 13, 132–135.
- Gonçalves, T.C.M., Lent, H., Almeida, J.R., 1987. Estudo anatômico e morfométrico dos folículos testiculares de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Mem. I. Oswaldo Cruz 82, 543–550.
- Hua, J., Li, M., Dong, P., Cui, Y., Xie, Q., Bu, W., 2009. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. BMC Evol. Biol. 15, 9–134.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. Insects. Their spermatozoa and phylogeny. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A., Plymouth UK, p. 555.
- Lachaise, D., Joly, D., 1991. Sperm and evolution in *Drosophila*. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W. (Eds.), Molecular Technique in Taxonomy. Springer Verlag, Berlin, pp. 201–216.
- Lee, Y.H., Lee, C.E., 1992. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta, Heteroptera) with special reference to phylogeny. Zool. Sci. 9, 971–981.
- Maia, M.C., 2009. Morfologia dos espermatozoides de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Ph.D. Thesis. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Minas Gerais.
- Mercati, D., Dallai, R., 2016. A peculiar new virus-spermatozoon association in the bug *Raphigaster nebulosa* (Poda) (Heteroptera-Insecta). Arthropod Struct. Dev. 45, 64–68.
- Mercati, D., Giusti, F., Dallai, R., 2009. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). J. Morphol. 270, 825–833.
- Pereira, L.L.V., Alevi, K.C.C., Castanhole, M.M.U., Moreira, F.F.F., Barbosa, J.F., Itoyama, M.M., 2015. Cytogenetics analysis and testis morphology of aquatic species of the families Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae, and Veliidae (Heteroptera). J. Insect Sci. 15, 1–10.
- Pitnick, S., 1996. Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. Am. Nat. 148, 57–80.
- Pitnick, S., Hosken, D.J., Birkhead, T., 2009. Sperm morphological diversity. In: Birkhead, T., Hosken, D.J., Pitnick, S. (Eds.), Sperm Biology: an Evolutionary Perspective. Academic Press, Oxford, pp. 69–149.
- Popov, Y.A., 1971. Proceedings of 13th International Congress of Entomology. Origin and Main Evolutionary Trends of Nepomorpha Bugs, vol. 1, pp. 282–283.
- Schrader, F., Leuchtenberger, C., 1950. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). Exptl. Cell Res. 1, 421–452.
- Stys, P., Kerzhner, I., 1975. The rank and nomenclature of higher taxa in recent Heteroptera. Acta Entomol. Bohemoslov. 72, 64–79.
- Stys, P., Jansson, A., 1988. Check-list of recent family-group and genus-group names of Nepomorpha (Heteroptera) of the world. Acta Entomol. Fenn. 50, 1–4.
- Swallow, J.G., Wilkinson, G.S., 2002. The long and short of sperm polymorphisms in insects. Biol. Rev. 77, 153–182.
- Tandler, B., Moriber, L.G., 1966. Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remigis* (Say). J. Ultrastruct. Res. 14, 391–404.
- Virkki, N., 1969. Sperm bundles and phylogenesis. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 101, 13–27.
- Wheeler, W.C., Schuh, R.T., Bang, R., 1993. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: Congruence between morphological and molecular data sets. Ent. Scand. 24, 121–137.

3.2. Capítulo 2.

**Morfologia do sistema reprodutor masculino e espermatozoides de  
*Ornithocoris pallidus* (Heteroptera: Cimicidae) com inferências à  
biologia reprodutiva**

## Resumo

Os Cimicidae (Hemiptera: Heteroptera) são ectoparasitas de vários animais, incluindo humanos, se alimentando exclusivamente de sangue e todos eles possuem o modo de inseminação traumática. Neste trabalho descrevemos a morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de *Ornithocoris pallidus*, utilizando técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. O sistema reprodutor dessa espécie consiste de um par de testículos com sete folículos, dois ductos deferentes bastante dilatados quando preenchidos por espermatozoides maduros constituindo as vesículas seminais, um bulbo ejaculatório, um par de glândulas acessórias, um ducto ejaculatório e o edeago. Nos indivíduos sexualmente maduros os testículos estão vazios e as vesículas seminais bastante dilatadas e totalmente preenchidas por espermatozoides. Os espermatozoides são finos (~ 200 nm) e longos (~ 450 µm), com a região de cabeça composta pelo núcleo e o acrossomo que tem sua base apoiada lateralmente à ponta nuclear e quase a metade posterior do núcleo é bastante delgada (~ 45 nm) a qual é totalmente circundada pelo adjunto do centríolo. O flagelo consiste de um axonema com 9 + 9 + 2 microtúbulos e dois derivados mitocondriais simétricos. Embora nos cimicídeos o modo de inseminação extragenital seja peculiar, os espermatozoides de *O. pallidus* não exibiram qualquer característica morfológica que possa ser associada à esta peculiaridade. Por outro lado, a produção de espermatozoides restrita à fase de maturação sexual do macho possivelmente está associada ao modo de reprodução das fêmeas que é dependente do repasto sanguíneo.

## Abstract

Cimicidae (Hemiptera: Heteroptera) are ectoparasites of various animals, including humans, feeding exclusively on blood and all of them have the mode of traumatic insemination. In this work we describe the morphology and ultrastructure of the male reproductive system and the spermatozoa of *Ornithocoris pallidus* using light microscopy and transmission electron microscopy techniques. The reproductive system of this species consists of a pair of testicles with seven follicles, two very dilated vas deferens when filled by mature sperm constituting the seminal vesicles, an ejaculatory bulb, a pair of accessory glands, an ejaculatory duct, and the edeagus. In adult sexually mature individuals the testes are empty and the seminal vesicles quite dilated and fully filled by spermatozoa. The spermatozoa are thin (~ 200 nm) and long (~ 450 μm), with the head region composed of the nucleus and the acrosome having its base supported laterally to the nuclear tip and nearly the posterior half of the nucleus is quite thin (~ 45 Nm) which is completely surrounded by the adjuvant of the centriole. The flagellum consists of an axoneme with 9 + 9 + 2 microtubules and two symmetrical mitochondrial derivatives. Although in the cimicides the mode of extragenital insemination is peculiar, the spermatozoa of *O. pallidus* did not exhibit any morphological characteristic that can be associated with this peculiarity. On the other hand, the production of spermatozoa restricted to the stage of sexual maturation of the male is possibly associated with the mode of reproduction of the females that is dependent on the blood supply.

## **Introdução**

Os cimicídeos são insetos hematófagos e ectoparasitas de seres humanos, aves e morcegos (Reinhardt e Siva-Jothy, 2007). Na biologia de cimicídeos ocorrem duas adaptações importantes: a hematofagia obrigatória e a inseminação traumática (extragenital). O repasto sanguíneo é um pré-requisito para, além da produção de ovos, a cópula, tendo sido observado que machos de *Ornithoris toledo* e *Cimex lectularius* dirigem seu interesse sexual para fêmeas recém-alimentadas (Cragg, 1920; Snipes et al., 1940). Na inseminação traumática, também observada em outros hemípteros (Forattini, 1990), o macho, em vez de usar a abertura genital da fêmea, perfura a parede abdominal com seu órgão copulador e insere uma grande quantidade de espermatozoides diretamente na hemocele da fêmea. Esta por sua vez, possui um conjunto de adaptações para esse tipo de inseminação, conhecido como sistema paragenital (Usinger, 1966; Forattini, 1990; Reinhardt e Siva-Jothy, 2007). O sistema paragenital possui um importante órgão conhecido como órgão de Berlese ou Ribaga (espermalégio), que é observado externamente formando um sulco dorso-ventral no abdome, chamado seio paragenital. Através desse sulco, o macho insemina a fêmea, perfurando a membrana pleural e acessando a sua hemocele, onde são lançados os espermatozoides (Usinger, 1966).

Em sua revisão, Reinhardt et al. (2015) discutem que o fenótipo dos espermatozoides podem ser influenciados pelo genótipo diploide do macho, o genótipo mitocondrial, o meio ambiente e suas interações. Segundo esses autores, entre os fatores ambientais estão a dieta, o estilo de vida do macho e o trato genital da fêmea. Dessa forma, considerando que os cimicídeos são hematófagos obrigatórios (machos e fêmeas) e possuem inseminação traumática, neste trabalho nós descrevemos morfologia dos sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de *Ornithocoris pallidus* afim de realizar inferências à respeito da biologia reprodutiva desta espécie e possivelmente da família Cimicidae.

## **Material e métodos**

Todos os indivíduos de *O. pallidus* foram coletados em ninhos da andorinha migratória *Pygochelidon cyanoleuca* (Vieillot, 1817) no sótão de uma casa na zona rural do município de Paula Cândido (20°50'29.2"S 42°54'16.7"W), Minas Gerais, Brasil.

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

Para a morfologia do sistema reprodutivo masculino (SRM), dez indivíduos machos sexualmente maduros foram dissecados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixados por 4 h em solução de glutaraldeído a 2,5% no mesmo tampão fosfato. Em seguida, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 h, desidratadas em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 99%), infiltradas e incluídas em historesina Leica. Cortes semifinos (1 µm) foram feitos em um micrótomo automático (RM 2255 Leica) com navalha de vidro e montados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina, eosina e/ou azul de toluidina.

Para as medidas dos espermatozoides e de suas respectivas regiões, vesículas seminais de três machos foram dissecadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e os espermatozoides foram espalhados sobre lâminas histológicas e fixados em solução de 4% de paraformaldeído, por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, secas em temperatura ambiente e, então, coradas com Giemsa e fotografados e um fotomicroscópio BX-60 da Olympus. Para medir os núcleos algumas lâminas foram coradas com 0,2 g/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), por 20 minutos, lavadas em água corrente, montadas com lamínulas usando sacarose 50%.

A imagem do testículo inteiro foi obtida com uma câmera digital Panasonic (DMC-LX3) acoplada ao microscópio CX-31 da Olympus. As demais imagens foram obtidas com câmera digital Q-Color 3 acoplada ao microscópio BX-60, ambos da Olympus, e, para as lâminas coradas com DAPI, equipado com um filtro de excitação BP 360-370 nm. A imagem histológica de um testículo e vesícula seminal foi obtida pela montagem de 59 quadros (*frames*), capturados com a objetiva de 20x, usando o comando *Photomerge* do software Adobe Photoshop CS5.

As médias de comprimento dos espermatozoides e de suas respectivas partes foram obtidas analisando, com o software *Image-J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), 10 imagens espermatozoides para cada indivíduo, totalizando 30 células.

## **Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Testículos e vesículas seminais de 10 indivíduos foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fixados em uma solução de glutaraldeído a 2,5% neste mesmo tampão, acrescido de 3% de sacarose, por aproximadamente 24 horas. O

material após lavado em tampão foi pós-fixado em tetróxido de ósmio no mesmo tampão por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 90% e 99%), em acetona 99% e, em seguida, infiltradas e incluídas em Resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos (~ 60nm) foram feitos em ultramicrotomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila aquosa a 3% e citrato de chumbo a 0,2%. Os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), operando a 80 kV.

## Resultados

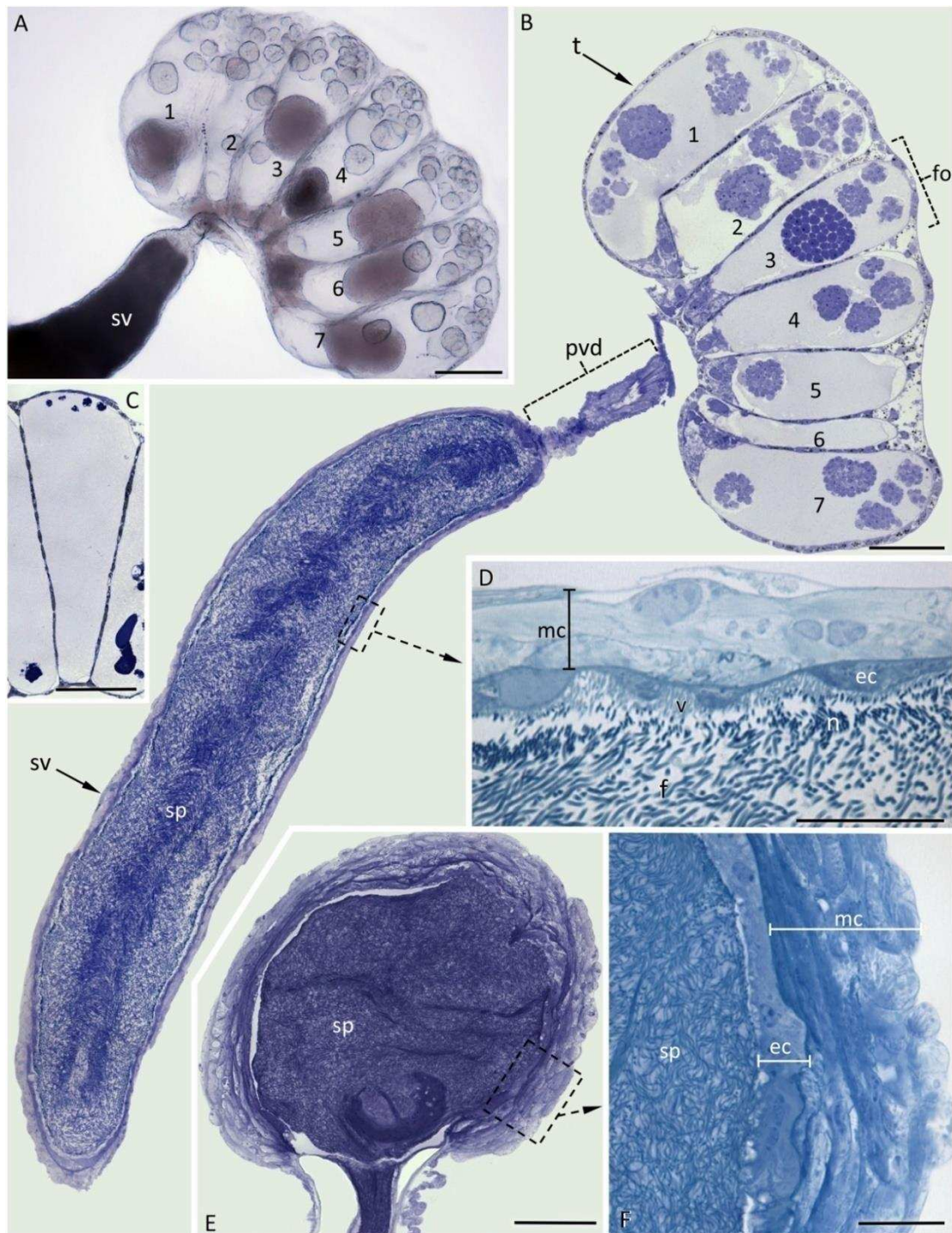
O sistema reprodutor masculino de *O. pallidus* é constituído por um par de testículos, dois ductos deferentes que desembocam em um bulbo ejaculatório, um ducto ejaculatório e um par de glândulas acessórias (Fig. 1A e 1B). Cada testículo é formado por sete folículos que, nos insetos jovens, são preenchidos por cistos nas diferentes fases da espermatogênese, mas no mesmo cisto todas as células germinativas se encontraram na mesma fase da espermatogênese. Já nos indivíduos sexualmente maduros os folículos tornam-se totalmente vazios de células germinativas, mas mantendo a mesma anatomia e, praticamente, o tamanho (Fig. 1C), e os ductos deferentes muito dilatados, exceto na extremidade próxima ao testículo, e totalmente preenchido por espermatozoides, constituindo as vesículas seminais (VS) (Fig. 1B). Nestas os espermatozoides estavam individualizados, não em feixes, mas com suas cabeças regularmente associadas às microvilosidades do epitélio vesicular (Fig. 1D). O epitélio é delgado e formado por uma única camada de células achatadas e apoiadas na camada muscular (Fig. 1D). Ainda nos indivíduos sexualmente maduros, o bulbo ejaculatório é densamente preenchido por espermatozoides dispostos aleatoriamente, não associados ao epitélio como nas vesículas seminais (Fig. 1E, F). No bulbo ejaculatório o epitélio também é formado por uma única camada de células, contudo a espessura é mais regular do que na VS e não se observou microvilosidades. Ainda a camada muscular que a circunda é bem mais espessa do que aquela observada na VS (Fig. 1F).

Os espermatozoides de *O. pallidus* se mostraram finos e longos (Fig. 2), medindo  $450,60 \pm 5,06$  ( $440,81-458,90$ )  $\mu\text{m}$  de comprimento, com um coeficiente de variação (CV) igual à 1,12%. O seu núcleo também se mostrou longo ( $96,80 \pm 3,94$   $\mu\text{m}$ ) e delgado (~ 200 nm) (Fig. 2A). Contudo quando corado com DAPI (Fig. 2B, C), ele

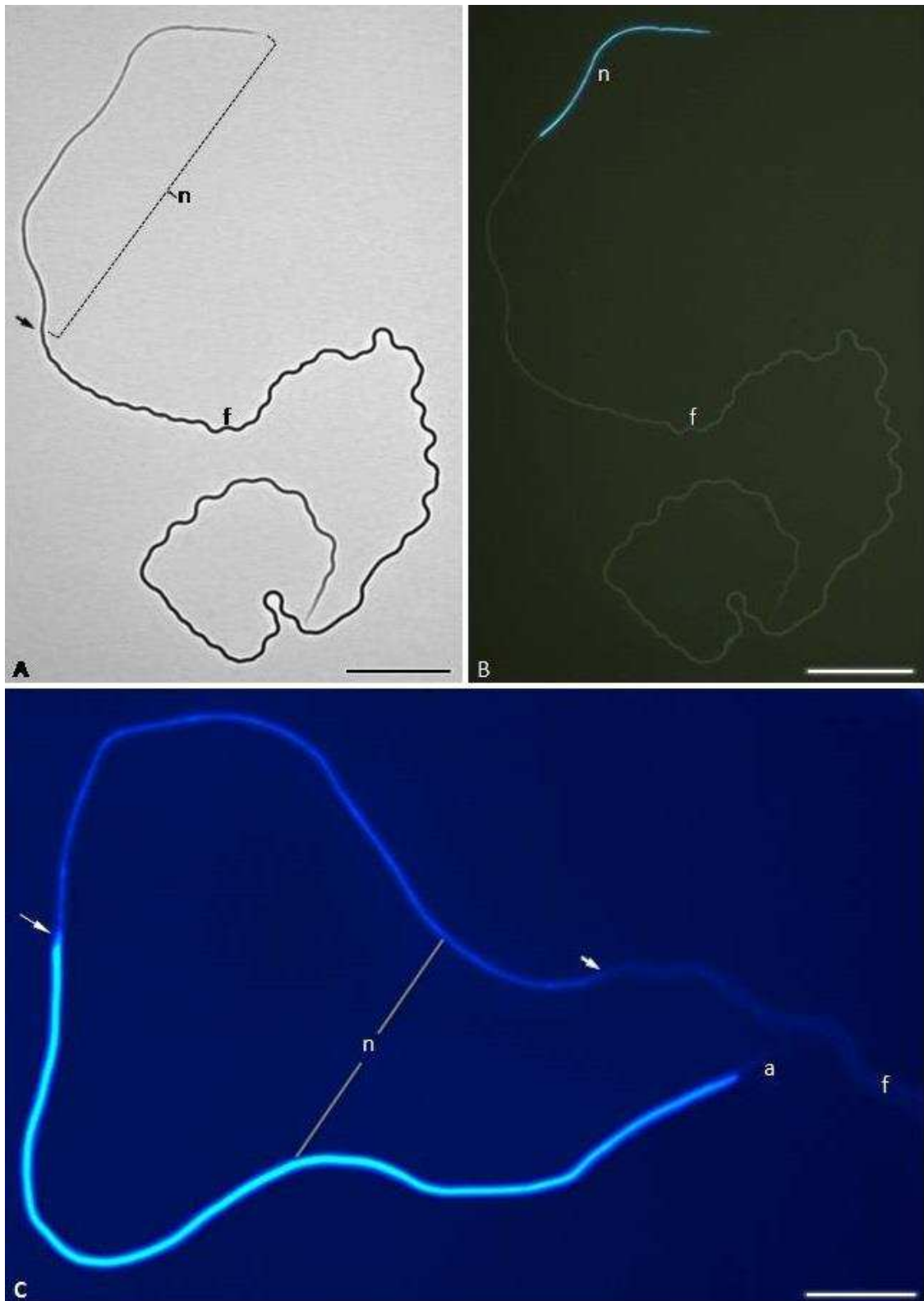
mostrou uma característica muito peculiar quanto ao diâmetro: um pouco mais de sua metade anterior (~ 54 µm de comprimento) exibiu diâmetro próximo aquele do flagelo, contudo o restante posterior, por volta de 43 µm, é bem mais fino, medindo apenas por volta de 45 nm (Fig. 2 e 3A). Quando observado ao MET, foi possível notar que toda esta porção delgada é totalmente circundada pelo adjunto do centríolo (Fig. 3A, G, H). À MET também mostrou que o núcleo tem cromatina eletrondensa e compacta, contudo próxima à região mediana (em corte transversal) foi observado em praticamente todos eles um estreito “canal” eletronalucente ao longo de quase todo seu comprimento (Fig. 3A, E-G).

O acrossomo, situado anteriormente ao núcleo, mediu 4 µm de comprimento (Fig. 2C) e é constituído por uma única estrutura (monocamada) de densidade um pouco menor do que aquela do núcleo (Fig. 3A-D). Ele possui, como o núcleo, um estreito “canal” eletronalucente (Fig. 3D). Sua base (~ 1,2 µm em comprimento) é assimétrica e apoiada lateralmente à extremidade anterior do núcleo (Fig. 3E). O adjunto do centríolo, na região de transição núcleo-flagelo, assemelha-se a um bastão incomumente longo (~ 45 µm em comprimento) que abraça assimetricamente toda a porção delgada posterior do núcleo (Fig. 2C, 3A, G, H). Ele não é totalmente ocluído, assim exhibe uma estreita fenda, justaposta ao núcleo, ao longo de todo o seu comprimento (cabeça de setas nas Fig. 3A, H). A sua extremidade posterior circunda, além do núcleo, as pontas anteriores dos derivados mitocondriais (DMs) (Fig. 3I) e, imediatamente abaixo do núcleo, a extremidade anterior do axonema (centríolo modificado), além das pontas dos DMs (Fig. 3J).

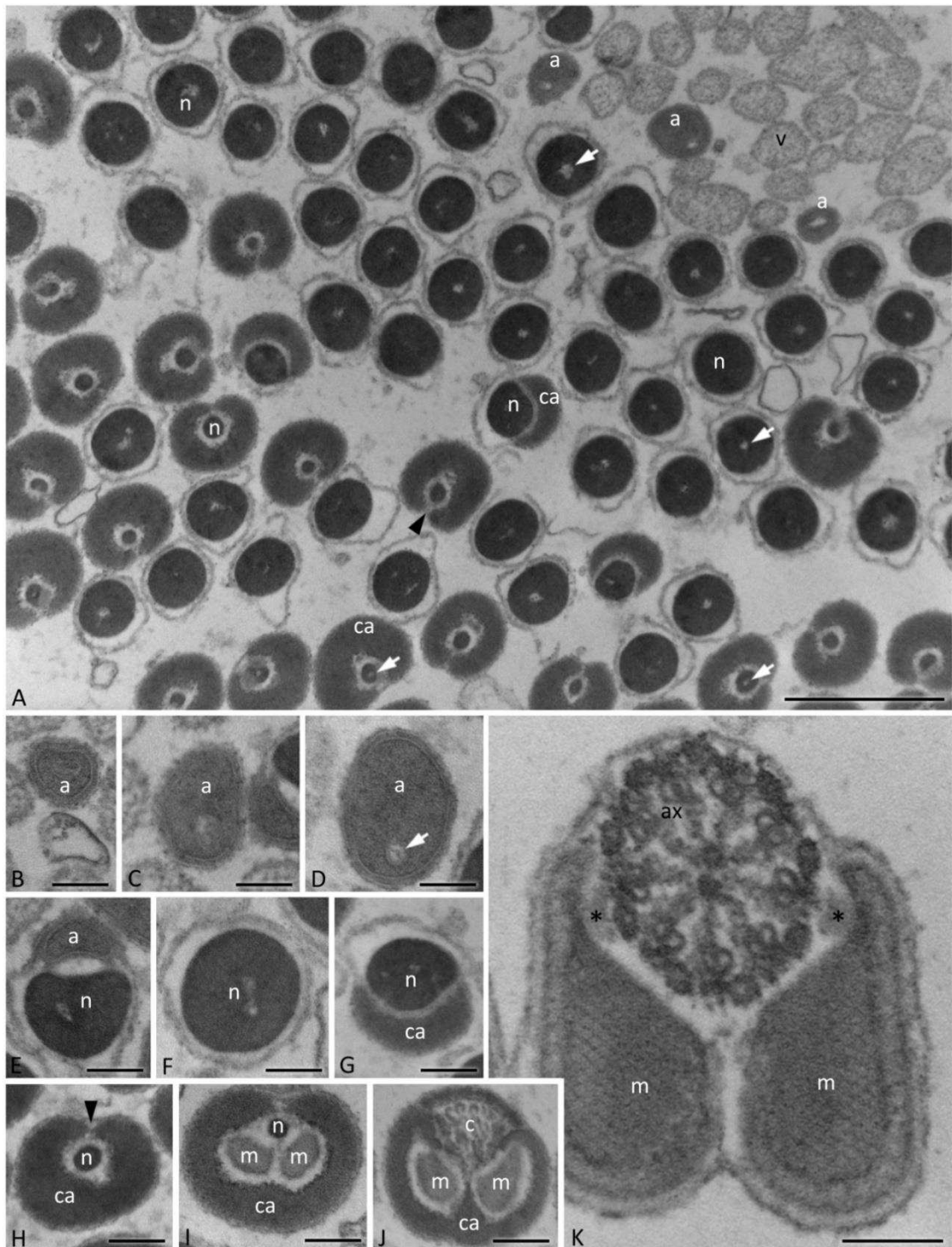
O flagelo consiste de dois DMs e um axonema típico com nove túbulos acessórios (9 + 9 + 2 microtúbulos) e materiais intertubular (Fig. 3K). Os DMs são simétricos e circundam pouco mais da metade da circunferência do axonema. Em corte transversal, cada DM possui área próxima àquela do axonema (quase toda preenchida por materiais paracristalinos) e exhibe uma ponte que o conecta ao axonema por meio do material intertubular.



**Fig. 1:** Sistema reprodutor masculino de *Ornithocoris pallidus*. **A)** Fotomicrografia do testículo (t), mostrando os sete folículos e vesícula seminal (sv). **B)** Corte longitudinal do testículo (t), mostrando os sete folículos (fo), o ducto deferente pré-vesicular (pvd) e a vesícula seminal (sv) repleta de espermatozoides (sp). **C)** Detalhe do testículo mostrando que o mesmo encontra-se praticamente vazio. **D)** Detalhe da vesícula seminal mostrando os espermatozoides com os núcleos (n) voltados para a camada epitelial (ec) com vilosidades (v). Flagelos (f), camada muscular (mc). **E)** Bulbo ejaculatório repleto de espermatozoides (sp). **F)** Detalhe do bulbo ejaculatório com espermatozoides (sp) e camada epitelial (ec) e muscular (mc). Escalas: A, B = 0.1 mm; C, E = 20  $\mu$ m; D = 80  $\mu$ m.



**Fig. 2:** Microscopia de luz do espermatozoide, em **A**) Evidenciando o núcleo (n) e o flagelo (f), em **B**) corado em DAPI, evidenciando o adjunto do centríolo (ca). **C**) Maior detalhe da região nuclear extra-adjunto e região nuclear intra-adjunto. Seta indica onde inicia o adjunto do centríolo, cabeça de seta mostra a região de transição núcleo-flagelo. Escalas: A, B = 25  $\mu\text{m}$ ; C = 5  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3:** Microscopia eletrônica de transmissão. **A)** Corte transversal dos espermatozoides na vesícula seminal, com os acrossomos (a) e núcleos (n) mais próximos das vilosidades (v) da parede epitelial. Mais internamente vemos a transição núcleo-adjunto do centríolo (ca). **B-D)** Acrossomo. **E)** Transição núcleo-acrossomo. **F)** Núcleo. **G-J)** Transição núcleo-adjunto do centríolo, **D)** início dos derivados mitocondriais e **J)** axonema. **K)** Flagelo, com os dois derivados mitocondriais (m) e o axonema. Seta branca indica a região eletrólucida. Cabeça de seta preta indica a fenda do adjunto do centríolo. Asteriscos indicam as pontes citoplasmáticas entre os derivados e o axonema. Escalas: A = 0.5  $\mu\text{m}$ ; B-K = 0.1  $\mu\text{m}$ .

## Discussão

Anatomicamente, o sistema reprodutor masculino (SRM) de *Ornithocoris pallidus* é semelhante aquele de *Cimex lectularius*, tanto em número de folículos como na forma dos testículos e demais constituintes (Cragg, 1920; Davis, 1956; Usinger, 1966), de modo que, observando imagens e esquemas feitos por esses autores, não conseguimos notar qualquer detalhe que possa distinguir um do outro. Contudo, nenhum desses autores mencionou se, em *C. lectularius*, os folículos testiculares (sete por testículo) tornam-se vazios de espermatozoides após a maturação sexual, como observamos em *O. pallidus*. Em um trabalho sobre *C. lectularius*, Reinhardt et al. (2009) mencionam que “*sperm is constantly produced by the testes and sperm accumulates and is stored in the seminal vesicles*”. Contudo não é claro se ‘constantemente’ significa ao longo de toda a vida adulta do indivíduo ou durante a maturação sexual. Até porque Reinhardt e Siva-Jothy (2007) escrevem “*These observations coupled with that by Cragg (1923) suggest males can sometimes be sperm limited and so need to be prudent with their mating efforts.*”

De qualquer forma, considerando a total semelhança na morfologia do SRM, bem como no comportamento reprodutivo e alimentar dessas espécies, é possível que nos cimicídeos em geral a produção de espermatozoides ocorre em adultos jovens durante apenas à maturidade sexual, o que é uma característica incomum à maioria dos Heteroptera (Souza et al., 2011; Karakaya et al., 2012; Özyurt et al., 2013).

Nós temos observado SRM em várias espécies de Miridae e Anthocoridae, famílias proximamente relacionadas à Cimicidae, onde os folículos testiculares se mostraram cheios de cistos nas diferentes fases da espermatogênese, indicando produção contínua de espermatozoides ao longo de toda a vida adulta (sinspermatogênicos), como também tem sido observado em Pentatomomorpha (Pires, et al., 2007; Rodrigues, et al., 2008; Mróz e Wojciechowski, 2011; Mróz, 2012; Özyurt et al., 2015). Por outro lado, a produção de espermatozoides restrita à fase de maturidade sexual tem sido comumente observada em algumas espécies de Hymenoptera (Allard et al., 2010; Araújo et al., 2010) e Ephemeroptera (Brito et al., 2011). Em Ephemeroptera e Hymenoptera (Chalcidoidea) (Damiens e Boivin, 2005), a produção de espermatozoides inicia na fase de larva ou de pupa (Fiorillo et al., 2008), assim quando os adultos emergem já estão aptos a copularem e, em geral, morrem em seguida (De Souza et al., 2011). Nestes insetos, no término da maturidade sexual as

vesículas seminais se encontram totalmente cheias de espermatozoides e os testículos totalmente atrofiados e histoanatomicamente desorganizados (Damiens e Boivin, 2005; Fiorillo et al., 2008). Portanto diferente do observado em *O. pallidus*, no qual os testículos se tornam depletados de células germinativas, mas mantêm toda a sua anatomia e, praticamente, tamanho (ver Fig. 1A-C).

As vesículas seminais de *O. pallidus* e também de *C. lectularius* (Davis, 1956; Usinger, 1966), são muito grandes quando comparadas, p.ex., àquelas do mirídeo fitófago *Collaria oleosa* (Mróz e Wojciechowski, 2011; Mróz, 2012), mostrando comparativamente o grande potencial de armazenamento espermático nos cimicídeos machos. Todo esse potencial certamente é uma adaptação à produção de todos os espermatozoides em uma única etapa. Essa característica dá a esses insetos uma pronta disponibilidade de uma grande quantidade de espermatozoides. Por sua vez, é possível que toda essa disponibilidade tenha relação com o comportamento reprodutivo desses insetos, o qual está diretamente relacionado à atividade hematofágica de machos e, especialmente, fêmeas. Pois, como mencionado anteriormente, em *Ornithocoris* e *Cimex* (e provavelmente em outros cimicídeos) tanto a produção de ovos pelas fêmeas como a cópula dependem do repasto sanguíneo (Cragg, 1920; Snipes et al., 1940; Kaldun e Otti, 2016). Na hematofagia, diferente de, p.ex., a fitofagia, a disponibilidade de alimento é em geral descontínua e, por isso, quando há uma presa os hematófagos, geralmente em grande número, ingerem grande quantidade de sangue e, portanto, tornando muitas fêmeas aptas a copularem ao mesmo tempo. Dessa forma, os machos terem disponível grande quantidade de espermatozoides maduros em suas VS é uma adaptação à esta condição.

Uma questão interessante é por que em cimicídeos os testículos não se tornam atrofiados ao pararem de produzir espermatozoides? Embora a resposta para esta questão necessita de outros estudos, algumas considerações podem ser feitas. Está bem documentado que em Cimicidade os machos têm vida adulta longa, podendo sobreviver por mais de um ano mesmo com um único repasto sanguíneo (Omori, 1941; Linford e Currie, 2006). Dessa forma é importante que esses indivíduos possam manter seus espermatozoides viáveis (nutridos e protegidos de substâncias nocivas) em suas VS por longo período, como as fêmeas os mantem em sua espermateca (Pascini e Martins, 2017). Para algumas espécies de insetos a importância de ecdisteróides na reprodução masculina é bem conhecida e que, nos machos adultos, a produção desses hormônios ocorre nos testículos, mais precisamente em células da cápsula testicular (ver Nijhout,

1994). Levando isso em consideração, é possível supor que nos cimicídeos os testículos, mesmo após a produção e transferência dos espermatozoides para as VS, continuariam produzindo hormônios para manter, por exemplo, as glândula acessórias funcionais e os próprios indivíduos aptos a copularem. Se assim for, a total regressão testicular em Ephemeroptera e nos Hymenoptera não sinspermatogênicos se explicaria pela curta fase de vida dos machos adultos, pois logo após a maturação sexual eles copulam com uma ou mais fêmeas e, em seguida, morrem (De Souza et al., 2011). Assim não havendo necessidade de testículos funcionais para manter os espermatozoides nas VS por um longo período de tempo.

A presença de um bulbo ejaculatório mostra a íntima relação entre a morfologia do SRM com o comportamento reprodutivo de cimicídeos. Aparentemente essa bomba tem a função de regular a quantidade de espermatozoides liberada pelo macho em cada cópula (Davis, 1956). Se de fato for essa a função, a sua presença só faz sentido naquelas espécies em que os machos armazenam grande quantidade de espermatozoides e que existam muitas fêmeas a serem fertilizadas seguidamente. Como discutido acima, essas são duas características que estão presentes em cimicídeos e, provavelmente, são adaptações à sua condição hematófaga.

A cabeça de um ou outro espermatozoide inserida no epitélio da vesícula seminal é frequentemente observada (Dias et al., 2017). Contudo a associação de praticamente todos os espermatozoides ao epitélio vesicular pelas cabeças, como observada em *O. pallidus* e *C. lectularius* (Davis, 1956), é um tipo de organização ainda não relatado em outros insetos. Nos insetos em geral o mais observado são os espermatozoides dispostos nas vesículas seminais aleatoriamente isolados ou em feixes (Lino-Neto et al., 2008; Higginson e Pitnick, 2011; Dallai, 2014). Propor qualquer função dessa associação pela simples observação histológica seria puramente especulativo. Contudo é possível que ela seja importante para, de alguma forma, manter a viabilidade dos espermatozoides por longos períodos de tempo na vesícula e/ou, talvez, regular a transferência dessas células das vesículas para o bulbo ejaculatório, já que elas estão fisicamente associadas ao epitélio vesicular.

A baixa variação de 1,1%, indica homogeneidade no tamanho dos espermatozoides. A competição espermática pode desempenhar um papel importante na variação do comprimento dos espermatozoides em diferentes grupos animais (Pitnick et al., 2009). Por exemplo, foi observado em pássaros (Calhim et al., 2007) e em Hymenoptera (Fitzpatrick e Baer, 2011) que o coeficiente de variação foi notadamente

maior em espécies com menor risco de competição espermática. A explicação dada é que, quando o risco de competição é alto a seleção favorecerá um rigoroso controle de qualidade do ejaculado, o que resultará em maior uniformidade dos espermatozoides, inclusive em comprimento. Pois pensa-se que quanto maior a taxa de erro (ou variação) na produção dos espermatozoides, mais dessas células serão necessárias para assegurar o sucesso da fertilização (Cohen, 1973, 1975), o que elevará o já alto custo dessa produção. Fitzpatrick e Baer (2011) observaram que em machos de três espécies de *Bombus* (fêmeas acasalam com um único macho = monândricas) os CV dos comprimentos dos espermatozoides foram por volta de 3,5%, já em quatro espécies de *Apis* (fêmeas poliândricas, logo com alto risco de competição espermática) foram por volta de 2%. Dessa forma, o CV para *O. pallidus*, por volta de 1% pode indicar um alto risco de competição espermática nesta espécie, bem como em outros cimicídeos, pois Stutt e Siva-Jothy (2001) encontraram que *C. lectularius* pode copular com até cinco machos.

Embora ainda sem consenso, tem sido proposto que o trato reprodutivo feminino pode também, influenciar a morfometria dos espermatozoides no sentido de otimizar o ejaculado (Pitnick et al., 2009). A falta de consenso sobre essa suposição seja, talvez, porque tem-se tentado averiguá-la analisando a morfometria espermática em animais de inseminação via genital (grilos, trutas, coelhos e humanos). Considerando que a presença no trato genital feminino de ‘apenas’ espermatozoides de machos diferentes exerce papel significativo na otimização do ejaculado, o que se dizer dessa presença na cavidade hemocélica? Nesse ambiente muito provavelmente terão, além de espermatozoides rivais, as células de defesa da fêmea e o próprio trajeto incomum até o sitio de fertilização, pressionando para selecionar machos que produzam ejaculados de ótima qualidade através de, por exemplo, maior uniformidade morfométrica dos espermatozoides. Se assim for, isso explica o baixo CV de comprimento dos espermatozoides de *O. pallidus*, o que também seria esperado para os cimicídeos em geral.

Cragg (1920) afirmou que os espermatozoides de *Cimex* são longos medindo por volta de 800  $\mu\text{m}$  de comprimento. Ao fazer essa afirmação o autor não deu o nome da espécie, contudo a figura mostrada é de um espermatozoide de *C. lectularius*. Já Abraham (1934), em seu trabalho sobre *C. lectularius*, afirmou que os espermatozoides mediram 4-5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 400-500  $\mu\text{m}$  comprimento, com uma região mais rígida de aproximadamente 85  $\mu\text{m}$ , a qual foi interpretada como sendo a cabeça. Ainda,

Reinhardt e Siva-Jothy (2007), citando os dois autores acima, afirmaram que os espermatozoides de *Cimex* variam de 400  $\mu\text{m}$  a 800  $\mu\text{m}$  de comprimento. Dessa forma, nos parece que essas medidas, com toda essa variação, estão sendo atribuídas aos espermatozoides de *C. lectularius*. Contudo, considerando toda a discussão anterior sobre a uniformidade morfométrica dos espermatozoides de *O. pallidus*, e que ele e *C. lectularius* exibem o mesmo comportamento reprodutivo, é possível supor que há erro em alguns desses valores. Até porque foi um autor que encontrou 400-500  $\mu\text{m}$  e já outro  $\sim 800 \mu\text{m}$ . Além do mais, é fácil perceber que há erro de, pelo menos, 10 x no valor citado para o diâmetro dessas células, pois 4-5  $\mu\text{m}$  é aproximadamente o diâmetro de um núcleo esférico de uma espermátide que apresenta cromatina descondensada.

Como descreveu Abraham (1934) para *C. lectularius*, os espermatozoides de *O. pallidus* quando corados com Giemsa, mostraram que quase um quarto do seu comprimento total era rígido/linear ( $\sim 96 \mu\text{m}$ ) e levemente mais delgado do que o restante ondulado. Assim como aquele autor, nós consideramos que esse região representava a cabeça (especialmente núcleo), o que foi confirmado quando usamos o corante DAPI para DNA. Contudo, a maior surpresa foi quando o DAPI nos mostrou que quase a metade posterior do núcleo exibia um diâmetro uniformemente mais fino do que o porção anterior; uma característica até então observada apenas nos Cimicomorpha *Blaptostethus pallescens* e, principalmente, *Amphiareus constrictus* (Anthocoridae) (Santos e Lino-Neto, 2017, dados não publicados). Contudo, nos espermatozoides dessas duas espécies essa região era comparativamente curta (em *A. constrictus*  $\sim 5 \mu\text{m}$ ), de modo a correspondência dessa característica entre *O. pallidus* e esses dois anthocorídeos só foi confirmada à MET. A qual mostrou que, nas três espécies, essa porção fina posterior do núcleo dos espermatozoides era completamente circundada pelo adjunto do centríolo. É interessante perceber que o compartilhamento dessa característica vai de encontro à maioria das análises filogenéticas que mostram Anthocoridae e Cimicidae como as duas famílias de Cimicomorpha mais proximamente relacionadas (Schuh e Štys, 1991). Mesmo assim, o comprimento dessa região nuclear e, por conseguinte, do adjunto do centríolo diferenciam os espermatozoides de *O. pallidus* daqueles dos dois anthocorídeos. Ainda, o fato do núcleo dos espermatozoides de outros cimicídeos exibirem duas regiões, como supomos, aumenta a possibilidade do uso da morfometria espermática para discriminar espécies desse percebejo de taxonomia ainda intricada até do mesmo gênero. Pois, enquanto o número de componentes que formam os espermatozoides é bastante preservado nos táxons

superiores (p.ex., subordem), os comprimentos de espermatozoides e de suas partes (acrossomo, núcleo e flagelo) são independentes entre si e bastante variáveis até mesmo entre espécies muito próximas (Fitzpatrick e Baer, 2011). Por exemplo, a MET mostrou que em *O. pallidus* os espermatozoides são formados pelos mesmos componentes encontrados nos espermatozoides dos demais Heteroptera, que são: um acrossomo e um núcleo na região da cabeça, no flagelo apenas um axonema com  $9 + 9 + 2$  microtúbulos e dois DMs e, na região de transição núcleo-flagelo, um adjunto do centríolo. Ainda como nos demais Heteroptera, no flagelo não há corpos acessórios e cada DM está ligado ao material intertubular do axonema por uma ponte (Dallai, 2014; Dallai e Afzelius, 1980; Mercati et al., 2009; Dias et al., 2017). Contudo as dimensões e arranjo entre os componentes, assim com a morfometria dos espermatozoides e de suas diferentes regiões, certamente tornam essas células distintas de qualquer outra já observada.

Ainda sobre o adjunto do centríolo, é interessante observar que, enquanto em cimicídeos e anthocorídeos ele circunda completamente a porção longa e afilada do núcleo, no também Cimicomorpha Reduviidae essa estrutura é disposta lateralmente à base chanfrado do núcleo, exatamente como ocorre nos Pentatomomorpha (Dias et al., 2016). O que nos parece indicar uma condição em Reduviidae similar ao ancestral, como proposto por Schuh e Štys (1991).

Dentre todos os espermatozoides de Heteroptera com estrutura e ultraestrutura conhecidas, aqueles que mais se parecem aos de *O. pallidus* são os espermatozoides de Anthocoridae (*B. pallescens* e *A. constrictus*, Santos e Lino-Neto, dados não publicados), família mais proximamente relacionada à Cimicidae. Contudo os DMs dos espermatozoides desses dois anthocorídeos são assimétricos, enquanto os de *O. pallidus* e *C. lectularius* são simétricos, como observado na maioria dos Heteroptera (Dallai e Afzelius, 1980).

Com base no acima exposto, nós supomos que os espermatozoides de cimicídeos, ao compararmos com aqueles dos demais Heteroptera, não exibem qualquer elemento estrutural, ou alteração em qualquer um daqueles existentes, que possa ser atribuída à pressões seletivas decorrente do seu modo extragenital de inseminação. Por outro lado, a uniformidade na morfometria dessas células, como observada em *O. pallidus*, pode ser decorrente do alto risco de competição espermática somado às condições inóspitas para eles da cavidade hemocélica da fêmea onde são lançados pelo macho durante a cópula. Provavelmente, a produção de espermatozoides, e em grande

quantidade, restrita ao período de maturação sexual e a não atrofia testicular, mesmo esvaziado de células germinativas, podem ser adaptações ao comportamento reprodutivo da espécie (e possivelmente da família), que por sua vez é consequência do hábito deste alimentar-se de sangue.

### **Referências Bibliográficas**

- Allard, D., Ito, F., Aikawa, Y., Gotoh, A. Billen, J., 2010. Testes degeneration in ants: a histological study of *Gnamptogenys bicolor*. *Acta Zool-Stockholm* 92, 372–376.
- Araújo, V.A., Freitas, F.V., Moreira, J., Neves, C.A., Lino-Neto, J., 2010. Morphology of male reproductive system of two solitary bee species (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop. Entomol.* 39, 595–600.
- Brito, P., Salles, F.F., Dolder, H., 2011. Characteristics of the male reproductive system and spermatozoa of Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Neotrop. Entomol.* 40, 103–107.
- Calhim, S., Immler, S., Birkhead, T.R., 2007. Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One.* 2(5): e413.
- Cragg, F.W., 1920. Further observations on the reproductive system of *Cimex*, with special reference to the behavior of spermatozoa. *Indian J. Med. Res.* 8, 32–79.
- Cragg, F.W., 1923. Observations on the bionomics of the bed-bug, *Cimex lectularius* L., with special reference to the relations of the sexes. *Indian J. Med. Res.* 11, 449–473.
- Cohen, J., 1973. Gametic diversity within an ejaculate. In: *The functional anatomy of the spermatozoon.* (Ed. by Afzelius, B.A.) Oxford, Pergamon Press. 329–339.
- Cohen, J., 1975. Gamete redundancy - wastage or selection? In: *Gamete competition in plants and animals.* (Ed. Mulcahy, D.L.) Amsterdam: North Holland Publ. Co. 99–114.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *J. Morphol.* 164, 301–309.

- Dallai, R., 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Struct. Dev.* 43, 257–290.
- Damiens, D. Boivin, G., 2005. Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. *Physiol. Entomol.* 30, 241–247.
- Davis, N.T., 1956. The morphology and functional anatomy of the male and female reproductive systems of *Cimex lectularius* L. (Heteroptera, Cimicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 49, 466–93.
- De Souza, D.J., Ribeiro, M.M.R., Mello, A., Lino-Neto, J., Dângelo, R.A.C., Lucia, T. M.C.D., 2011. A laboratory observation of nuptial flight and mating behaviour of the parasite ant *Acromyrmex ameliae* (Hymenoptera: Formicidae). *Ital. J. Zool.* 78, 405–408.
- Dias, G., Lino-Neto J., Mercati D., Dallai, R., 2016. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. *Micron* 82, 33–40.
- Dias, G., Dallai, R., Carapelli, A., Almeida, J.P.P., Campos, L.A.O., Faroni, L.R.A., Lino-Neto, J., 2017. First record of gregarines (Apicomplexa) in seminal vesicle of insect. *Sci. Rep.* 7, 175.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J., Bao, S.N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39, 1271–1280.
- Fitzpatrick, J.L., Baer, B., 2011. Polyandry reduces sperm length variation in social insects. *Evolution* 65, 3006–3012.
- Forattini, O.P., 1990. The Cimicidae and their importance in public health (Hemiptera-Heteroptera: Cimicidae). *Revista de Saúde Pública (Supl)* 1–37.
- Higginson, D.M., Pitnick, S., 2011. Evolution of intra-ejaculate sperm interactions: do sperm cooperate? *Biol. Rev.* 86, 249–270.

- Kaldun, B., Otti, O., 2016. Condition-dependent ejaculate production affects male mating behavior in the common bedbug *Cimex lectularius*. *Ecol Evol.* 14, 2548–2558.
- Karakaya, G., Özyurt, N., Candan, S., Suludere, Z., 2012. Structure of the male reproductive system in *Coreus marginatus* (L.) (Hemiptera: Coreidae) *Türk. Entomol. Derg.* 36, 193–204.
- Linford, M.R., Currie, W., 2006. Bedbugs put the bite on hotel business. Atlanta: Asian American Hotel Owners Association Lodging Business.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., Mancini, K., Mercati, D., Dallai, R., 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: Symphyta). *Tissue Cell* 40, 185–193.
- Mróz, E., 2012. The structure of the male reproductive system of the genus *Psallus* Fieber (Hemiptera: Heteroptera: Miridae) *Pol. Pismo Entomol.* 81, 107–118.
- Mróz, E., Wojciechowski, W., 2011. The systematic position of the tribe Stenodemini (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae: Mirinae) in the light of the male internal reproductive system. *J. Nat. Hist.* 45, 1563–1588.
- Nijhout, H.F., 1994. *Insect Hormones*. Princeton, Princeton University Press.
- Omori, N., 1941. Comparative studies on the ecology and physiology of common and tropical bedbugs, with special references to the reactions to temperature and moisture. *J. Med. Assoc. Taiwan* 60, 555–729.
- Özyurt, N., Candan, S., Suludere, Z., Amutkan, D., 2013. Morphology and histology of the male reproductive system in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) based on optical and scanning electron microscopy. *J. Entomol. Zool. Stud.* 1, 40–46.
- Özyurt, N., Candan, S., Suludere, Z., 2015. Ultrastructure of male reproductive system of *Eurydema ventrale* Kolenati 1846 (Heteroptera: Pentatomidae). *Microsc. Res. Tech.* 78, 643–653.
- Pascini, T.V., Martins, G.F., 2017. The insect spermatheca: an overview. *Zoology* 121, 56–71.

- Pires, E.M., Ferreira, P.S.F., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E., 2007. Morphology of the phytophagous bug *Platyscytus decempunctatus* (Carvalho) (Heteroptera: Miridae). *Neotrop. Entomol.* 36, 510–513.
- Pitnick, S., Hosken, D.J., Birkhead, T., 2009. Sperm morphological diversity. In: Birkhead, T., Hosken, D.J., Pitnick, S. (Eds.), *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press, Oxford, pp. 69–149.
- Reinhardt, K., Siva-Jothy, M.T., 2007. Biology of the bed bugs (Cimicidae). *Ann. Rev. Entomol.* 52, 351–374.
- Reinhardt, K., Wong, C., Georgiou, A., 2009. Detection of seminal fluid proteins in the bed bug, *Cimex lectularius*, using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasitology* 136, 283–292.
- Reinhardt, K., Dobler R., Abbott J., 2015. An ecology of sperm: sperm diversification by natural selection. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 46, 435–459.
- Rodrigues, A.R.S., Serrão, J.E., Teixeira, V.W., Torres, J.B., Teixeira, A.A., 2008. Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisus nigrispinus*. *J. Insect Physiol.* 54, 1543–1551.
- Ryckman, R.E., Bentley, D.G., Archbold, E.F., 1981. The Cimicidae of the Americas and Oceanic Islands, a checklist and bibliography. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 6, 93–142.
- Schuh, R.T., Štys, P., 1991. Phylogenetic analysis of cimicomorphan family relationships (Heteroptera). *J. New York Entomol. Soc.* 99, 298–350.
- Schuh, R.T., Slater, J.A., 1995. *True bugs of the world (Heteroptera: Hemiptera)*. New York Entomological Society, New York, p. 336.
- Schuh, R.T., Weirauch, C., Wheeler, W.C., 2009. Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis. *Syst. Entomol.* 34, 15–48.
- Snipes, B.T., Carvalho, J.C.M., Tauber, O.E., 1940. Biological studies of *Ornithocoris toledo* Pinto, the Brazilian chicken bedbug. *Iowa State Coll. J. Sci.* 15, 27–36.

Souza, H.V., Murakami, A.S, Moura, J., Almeida, E.C, Marques, I.F.G, Itoyama, M.M.,  
2011. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the  
family Pentatomidae (Heteroptera). *Eur. J. Entomol.* 108, 333–345.

Usinger, R.L., 1966. *Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera)*. College Park,  
Md., Entomological Society of America.

#### 4. Conclusões Gerais

- O sistema reprodutor de *Martarega bentoi* (Notonectidae) apresenta morfologia característica do gênero.
- O sistema reprodutor de *Ornithocoris pallidus* (Cimicidae) apresenta morfologia característica da família.
- A ultraestrutura dos espermatozoides de *M. bentoi* e *O. pallidus*, demonstraram vários caracteres comuns aos Heteroptera em geral. Entretanto, há outros caracteres que são compartilhados somente com as famílias à qual pertencem, e ainda, alguns caracteres foram exclusivos da espécie ou, possivelmente do gênero. Dessa forma, características derivadas da ultraestrutura dos espermatozoides constituem fonte de informações promissoras para estudos de sistemática dos Heteroptera.
- O sistema reprodutor de *O. pallidus* possui características peculiares que nos permitiram realizar inferências à respeito do comportamento reprodutivo dessa espécie.