

**VINÍCIUS DE MENEZES ESTRELA SANTIAGO**

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E FEMININO E  
MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE *Versigonalia ruficauda* (WALKER)  
(HEMIPTERA: CICADELLINI)**

Dissertação apresentada à Universidade de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
graduação em Entomologia, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Lino Neto  
Coorientadora: Luci Boa Nova Coelho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

S235m  
2023

Santiago, Vinícius de Menezes Estrela, 1997-  
Morfologia do sistema reprodutor masculino e feminino e  
morfometria espermática de *Versigonalia ruficauda* (Walker)  
(Hemiptera: Cicadellini) / Vinícius de Menezes Estrela Santiago.  
– Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 53-57.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.312>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cigarrinha (Inseto) - Espermatozoides. 2. Cigarrinha  
(Inseto) - Histologia. 3. Auchenorrhyncha. 4. Cicadellidae.  
5. Espermatogênese em animais. I. Lino Neto, José, 1959-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.752


**VINÍCIUS DE MENEZES ESTRELA SANTIAGO**

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E FEMININO E  
MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE *Versigonalia ruficauda* (WALKER)  
(HEMIPTERA: CICADELLINI)**

Dissertação apresentada à Universidade de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
graduação em Entomologia, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 VINICIUS DE MENEZES ESTRELA SANTIAGO  
Data: 26/05/2023 15:12:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Vinícius de Menezes Estrela Santiago  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 JOSE LINO NETO  
Data: 26/05/2023 15:34:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

José Lino Neto  
Orientador

Aos meus pais e ao meu amor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, José Lino Neto, e coorientadora, Luci Boa Nova Coelho, por todo o conhecimento compartilhado durante esses dois anos e ao programa de pós-graduação em Entomologia da UFV pelos ensinamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos

Gostaria de agradecer ao professor Elidiomar Ribeiro da Silva que junto Luci Boa Nova Coelho, estiveram presentes em minha vida acadêmica e pessoal desde a graduação e sempre me deram suporte em todas as dificuldades que encontrei.

Aos meus colegas de laboratório, por todas as experiências profissionais compartilhadas, em especial a professora Glenda Samara Dias Santos, a técnica Maura Pinheiro Alves, Paulo e Dayvson por toda a ajuda durante o meu aprendizado e na realização dos experimentos dessa dissertação.

Aos amigos que fiz em Viçosa, em especial Leandro Avellar, Maisa Carvalho, Francisco Witallo, Mauricio Paulo, Daniel Maciel e Gabriel Pantoja, que tornaram minha estadia, à 300 quilômetros de casa, em algo que eu pude aproveitar e ajudaram a ver essa pequena cidade como meu lar durante esse período.

Aos meus amigos do Rio de Janeiro, Erick, Fernanda, Geovanna, Mariana, Mayanne, Nathalia, Rayanne, Rodrigo e Sabrina, por continuarem me acompanhando e ajudando a superar os obstáculos que surgiram ao longo dessa caminhada.

Aos meus familiares, em especial ao meu avô Menezes, que foram motivo de saudade todos os dias que passei longe de casa. Aos meus irmãos Rafael e Bruno, que são exemplos pra mim de persistência e luta para chegar aonde eu quero e superar qualquer barreira. As minha primas-irmãs Bia e Carol, que são parte fundamental da minha vida.

Aos meus pais Vânia Cristina de Menezes e Gilberto Estrela por todo apoio. Sem vocês eu nunca chegaria a lugar algum.

As minhas filhas felinas Lira e Lulu. O carinho e companheirismo de vocês foi fundamental para a manutenção da minha saúde mental.

Ao amor da minha vida, Ligia Maria Rosalino Martins, por sempre ter sido meu maior suporte e meu refúgio. Sem você não existira esse trabalho, então dedico-o a você.

“Se você não gosta do seu destino, não aceite. Em vez disso, tenha a coragem de o mudar do jeito que você quer que seja.”

**(Naruto Uzumaki)**

## RESUMO

SANTIAGO, Vinicius de Menezes Estrela, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Morfologia do sistema reprodutor masculino e feminino e morfometria espermática de *Versigonalia ruficauda* (walker) (Hemiptera: Cicadellini)**. Orientador: José Lino Neto. Coorientadora: Luci Boa Nova Coelho.

Cicadellidae, família mais especiosa dentro de Auchenorrhyncha, é considerada de importância econômica por ter muitas espécies que são pragas de diversas culturas, como milho, citrus e café. Composta, dentre outras, pela subfamília Cicadellinae, que é dividida em duas tribos, Proconiini e Cicadellini. Na tribo Cicadellini está a espécie estudada nesse trabalho, *Versigonalia ruficauda*, a qual foi verificado a existência de dois padrões de cores, um padrão azul e outro verde. Os órgãos reprodutores dos insetos podem variar quanto ao número e a forma de algumas estruturas. Essas diferenças podem ser utilizadas para auxiliar na identificação taxonômica dos indivíduos. A necessidade de realizar trabalhos de morfologia do sistema reprodutor e dos espermatozoides da família Cicadellidae se torna clara ao perceber que houve pouco avanço nas descrições e no uso dessas estruturas como caráter taxonômico para identificação. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi descrever a morfologia e histologia do sistema reprodutor de macho e fêmea de *Versigonalia ruficauda* (Hemiptera: Cicadellinae), bem como a dos espermatozoides. Os indivíduos de *V. ruficauda* foram coletados, dissecados, os aparelhos reprodutores masculinos e femininos foram removidos, fotoregistrados e então descritos e destinados ao processamento para a histologia, para obtenção de espermatozoides ou fixados. O sistema reprodutor masculino e feminino foram semelhantes entre as duas variações de *V. ruficauda*, bem como entre outros Cicadellidae. Entretanto, foram encontradas diferenças na paráfise da genitália masculina, no comprimento total dos espermatozoides e da porção final do flagelo. O comprimento dos espermatozoides para a variação verde foi de 265  $\mu\text{m}$  e da porção final do flagelo de 86,2  $\mu\text{m}$ ; Já para a variação azul foi de 226  $\mu\text{m}$  e 56,1  $\mu\text{m}$ , respectivamente. As diferenças encontradas na genitália e na morfometria espermática sugerem que os indivíduos verdes e os azuis pertencem, na verdade, a espécies distintas.

Palavras-chave: Auchenorrhyncha. Cicadellidae. Espermatogênese. Espermatozoides.

Histologia.

## ABSTRACT

SANTIAGO, Vinicius de Menezes Estrela, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Morphology of the male and female reproductive system and sperm morphometry of *Versigonalia ruficauda* (walker) (Hemiptera: Cicadellini)**. Adviser: José Lino Neto. Co-adviser: Luci Boa Nova Coelho.

Cicadellidae, the most specious family within Auchenorrhyncha, is considered of economic importance because it has many species that are pests of various crops, such as corn, citrus and coffee. Composed, among others, by the subfamily Cicadellinae, which is divided into two tribes, Proconiini and Cicadellini. In the Cicadellini tribe is the species studied in this work, *Versigonalia ruficauda*, which was verified the existence of two-color patterns, a blue pattern and a green one. Insect reproductive organs can vary in the number and shape of some structures. These differences can be used to aid in the taxonomic identification of individuals. The need to carry out work on the morphology of the reproductive system and spermatozoa of the Cicadellidae family becomes clear when realizing that there has been little progress in the descriptions and use of these structures as a taxonomic character for identification. Thus, the objective of this work was to describe the morphology and histology of the male and female reproductive system of *V. ruficauda* (Hemiptera: Cicadellinae), as well as the spermatozoa. Individuals of *V. ruficauda* were collected, dissected, the male and female reproductive tracts were removed, photoregistered and then described and destined for processing for histology, for obtaining spermatozoa or fixed. The male and female reproductive systems were similar between the two variations of *V. ruficauda*, as well as between other Cicadellidae. However, differences were found in the paraphysis of the male genitalia, in the total length of the spermatozoa and in the final portion of the flagellum. The sperm length for the green pattern was 265  $\mu\text{m}$  and for the final portion of the flagellum, 86.2  $\mu\text{m}$ ; As for the blue pattern, it was 226  $\mu\text{m}$  and 56.1  $\mu\text{m}$ , respectively. The differences found in the genitalia and sperm morphometry suggest that the green and blue individuals belong to different species.

Keywords: Auchenorrhyncha. Cicadellidae. Spermatogenesis. Spermatozoa. Histology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

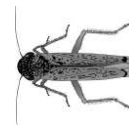
|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Cladograma das relações em Hemiptera.....  | 12 |
| Figura 2 – Indivíduo com e asas removidas e genitália das variações verde e azul de <i>V. ruficauda</i> .....   | 23 |
| Figura 3 – Aparelho reprodutor masculino de <i>V. ruficauda</i> .....   | 24 |
| Figura 4 – Cortes histológicos de folículos testiculares de <i>V. ruficauda</i> corados com Giemsa.....   | 26 |
| Figura 5 – Cortes histológicos de folículos testiculares de <i>V. ruficauda</i> corados com Dapi.....   | 27 |
| Figura 6 – Histologia da vesícula seminal e ducto deferente pós e pré vesicular da espécie <i>V. ruficauda</i> .....                                      | 29 |
| Figura 7 – Glândula acessória da espécie <i>V. ruficauda</i> clarificada com fixador Carnoy.....  | 31 |
| Figura 8 – Cortes longitudinais e transversais da glândula acessória e do ducto da glândula do sistema reprodutor masculino de <i>V. ruficauda</i> .....  | 32 |
| Figura 9 – Cortes longitudinais e transversais da glândula acessória.....   | 33 |
| Figura 10 – Esquema e cortes transversais dos ductos ejaculatórios laterais e do bulbo ejaculatório de <i>V. ruficauda</i> .....                          | 35 |
| Figura 11– Cortes longitudinais dos ductos ejaculatórios laterais e do bulbo ejaculatório de <i>V. ruficauda</i> .....                                    | 36 |
| Figura 12 – Sistema reprodutor feminino da espécie <i>V. ruficauda</i> e cortes transversais do oviduto comum, da espermateca e da bursa copulatória..... | 38 |
| Figura 13 – Cortes longitudinais do Sistema reprodutor feminino da espécie <i>V. ruficauda</i> .....  | 39 |
| Figura 14 - Espermatozoide da variação azul e verde da espécie <i>V. ruficauda</i> .....  | 45 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1 – Medida do acrossomo.....                                   | 43 |
| Gráfico 2 – Medida do Núcleo.....                                      | 43 |
| Gráfico 3 – Medida do Flagelo 1.....                                   | 43 |
| Gráfico 4 – Medida do Flagelo 2.....                                   | 43 |
| Gráfico 5 – Medida do Tamanho total.....                               | 43 |
| Gráfico 6 – Medida do Núcleo com intervalo de confiança de 95%.....    | 44 |
| Gráfico 7 – Medida do Flagelo 1 com intervalo de confiança de 95%..... | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Estatística Descritiva das medidas dos espermatozoides das variações verde e azul de <i>V. ruficauda</i> .....                      | 40 |
| Tabela 2 – Teste à Normalidade (Shapiro-Wilk) .....  | 41 |
| Tabela 3 – Teste t comparando as medidas dos espermatozoides das variações verde e azul de <i>V. ruficauda</i> .....                           | 41 |
| Tabela 4 – Teste à Homogeneidade de Variâncias das medidas dos espermatozoides das variações verde e azul de <i>V. ruficauda</i> (Levene)..... | 42 |
| Tabela 5 – Morfometria espermática de espécies da família Cicadellidae.....  | 51 |



## SUMÁRIO

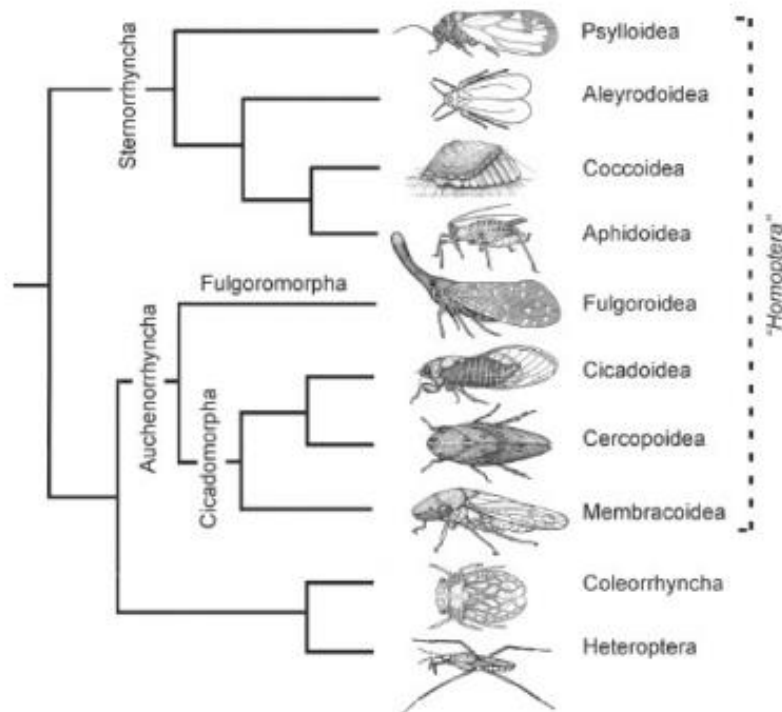
|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 12 |
| 1.1. BIOLOGIA E SISTEMÁTICA.....   | 12 |
| 1.2. SISTEMA REPRODUTOR.....   | 15 |
| 1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE OS ESPERMATOZOIDES DA FAMÍLIA<br>CICADELLIDAE ..... | 16 |
| 2. JUSTIFICATIVA.....  | 20 |
| 3. OBJETIVO.....   | 20 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 20 |
| 4.1. COLETA, TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO .....   | 20 |
| 4.2. MONTAGEM DE CORTES HISTOLÓGICOS .....   | 21 |
| 4.3. MORFOMETRIA DOS ESPERMATOZOIDES.....  | 21 |
| 5. LOCAL DE EXECUÇÃO .....   | 22 |
| 6. RESULTADOS.....   | 22 |
| 6.1. GENITÁLIA DE <i>V. RUFICAUDA</i> .....  | 22 |
| 6.2. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....   | 23 |
| 6.3. HISTOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO .....                                | 25 |
| 6.4. ANATOMIA E HISTOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO .....                      | 37 |
| 6.5. MORFOMETRIA E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES.....                               | 40 |
| 7. DISCUSSÃO.....  | 45 |
| 8. CONCLUSÃO .....   | 51 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 53 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. BIOLOGIA E SISTEMÁTICA

Hemiptera, uma das maiores ordens de insetos, com cerca de 145 famílias descritas, é um grupo monofilético baseado na perda dos palpos labiais e da maxila e na formação de uma estrutura denominada rostro, o qual possui um feixe de estilete com dois canais: um para alimentação e outro que libera saliva (Grimaldi & Engel, 2005; Beutel 2013; Gullan & Cranston 2017; Rafael 2017; Brusca *et al.* 2018 ). A alimentação do grupo em sua maioria se dá através da fitofagia, entretanto em Heteroptera existem alguns grupos adaptados à predação, dentro dos indivíduos hematófagos. A ordem compreende as subordens Auchenorrhyncha, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Heteroptera, sendo que, anteriormente, as duas primeiras eram tratadas como pertencentes à subordem Homoptera. Apesar de ainda ser utilizado em muitos textos científicos, o nome deixou de ser aceito por representar um grupo parafilético (Figura 1) (Grimaldi & Engel, 2005; Beutel 2013; Gullan & Cranston 2017; Rafael 2017; Brusca *et al.* 2018 ).

Figura 1 – Cladograma das relações em Hemiptera.



Fonte: Gullan e Cranston (2017).

Subordem Auchenorrhyncha ocorre em todo o globo, chegando até as regiões limites de ocorrência de plantas vasculares, com as quais estão associados devido ao seu comportamento alimentar preponderantemente de fluidos vasculares de plantas, com algumas poucas espécies se alimentando de fungos (Grimaldi & Engel, 2005; Beutel 2013; Rafael 2017; Gullan & Cranston 2017). A subordem possui como autapomorfias o seu sistema acústico timbal complexo, o flagelo da antena com formato de cerda e a região da base do primeiro par de asas membranizado ou reduzido. Ela é dividida nas infraordens Cicadomorpha e Fulgoromorpha (Grimaldi & Engel, 2005; Dietrich 2005; Cryan 2010; Beutel 2013; Gullan & Cranston 2017; Rafael 2017; Brusca *et al.* 2018).

A infraordem Cicadomorpha é considerada um dos grupos dominantes de insetos que se alimentam de plantas (Dietrich 2002). É considerada uma das grandes linhagens de insetos, com mais de 100 mil espécies descritas globalmente. Entretanto, acredita-se que foi descrita apenas uma amostra do real número de indivíduos existentes nessa infraordem (Cryan 2010; Beutel 2013; Dallai *et al.* 2016). No Brasil existem mais de 10 mil espécies descritas, mas estima-se que o número total existente ultrapasse 30 mil espécies (Rafael 2017). Os Cicadomorpha se distinguem dos outros hemípteros por um conjunto de caracteres, sendo eles: região do clípeo alargada; pedicelo antenal curto e sem sensilas; tégula ausente; veias anais da asa anterior separadas da base para a margem da asa; coxa média pequena (Dietrich 2005). A infraordem é composta por três superfamílias: Cercopoidea (cigarrinhas-da-pastagem), Cicadoidea (cigarras) e Membracoidea (cigarrinhas e soldadinhos). Nessas superfamílias estão alocadas 12 famílias, sendo as representantes de Cercopoidea: Aphrophoridae, Cercopidae, Clastopteridae, Epipygidae e Machaerotidae; de Cicadoidea: Cicadidae e Tettigarctidae; e de Membracoidea: Aetalionidae, Cicadellidae, Melizoderidae, Membracidae e Myerslopiidae (Gullan 2017; Rafael 2017; Cryan 2010; Dietrich 2005). Das superfamílias, Membracoidea se destaca por ser o grupo mais estudado, inclusive entre os Auchenorrhyncha, e o mais especioso com mais de 25 mil espécies nas cinco famílias (Cryan 2010). Seus indivíduos possuem uma grande variedade de formas, tamanhos, cores, além de apresentarem, em alguns casos, diferentes projeções no pronoto com formas únicas e complexas (Evangelista 2017; Deitz & Dietrich 1993). Em Membracoidea está a família Cicadellidae, sendo a mais numerosa do grupo com mais de 50 subfamílias descritas (Rafael 2017; Nielson 1985), tendo como principal característica a presença de quatro fileiras de cerdas conspicuas localizadas nas tíbias posteriores (Young 1968; Young 1977).

Os Cicadellidae são considerados de importância econômica por serem grandes pragas ou pragas em potencial de diversas culturas, como no milho, citrus e café (Albarracin 2021; Waquil 1997; Bhowmick 2016; Nielson 1985; Assis 2019). A sua alimentação é de fluido xilemático, possibilitada pela musculatura bem desenvolvida na região da cabeça, tornando as plantas hospedeiras suscetíveis a fitopatógenos transmitidos durante a alimentação (Young 1968; Mejdalani 1998; Janse & Obradovic 2010; Baldi & La Porta 2017; Assis 2019). Diversas bactérias simbiotes são transmitidas pelos os Cicadellinae, sendo uma das mais comuns a *Xylella fastidiosa* Wells (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae), que atinge culturas de citros, milho, café, dentre outras (Azevedo 2015; Bhowmick 2016). O controle das cigarrinhas em plantações é muitas vezes realizado com o uso de inseticidas sintéticos, mas já foi relatado o uso de produtos naturais, como o óleo de Neem para o controle de grandes infestações (Cabral 2021). Outra forma de controle relatada por Assis (2019) é o uso de plantas-armadilhas atrativas nas proximidades das culturas cultivadas, como o boldo-baiano (*Vernonia condensata* Becker)

A subfamília Cicadellinae possui cerca de 340 gêneros e mais de 2.000 espécies que ocorrem em todas as regiões do globo (Rafael 2017) e, segundo Young (1977), ela é dividida nas tribos Proconiini e Cicadellini. De acordo com Mejdalani (1998), o grupo é extremamente diversificado, tornando difícil caracteriza-lo por atributos específicos. Young (1968; 1977) descreveu as seguintes sinapomorfias para a subfamília: ocelos localizados na coroa próximos da margem posterior da cabeça; corpo não achatado dorsoventralmente; asa anterior com margem interna da célula apical paralela ao eixo longitudinal das asas; tíbias posterior com quatro fileiras de cerdas regulares; proepisterno exposto; suturas clipeais laterais estendendo-se até a coroa, chegando em alguns indivíduos até próximo dos ocelos.

O gênero *Versigonalia* compreende apenas três espécies: *V. ruficauda*, *V. vermiculata* e *V. lentiginosa*, localizadas no Brasil e na Argentina, sem distribuição específica determinada (Young 1977; Camisão 2014). De acordo com Young (1977), a espécie *V. ruficauda* pode ser diferenciada das outras duas por possuir um pronoto com a margem posterior convexa, além do macho apresentar paráfise conspicua como um processo ventral do edeagono. Quanto à cor, a espécie exibe dois padrões bem definidos, há indivíduos com a coloração azul e indivíduos com a coloração verde, não havendo nenhum trabalho que explique o motivo da ocorrência dessa diferença.

## 1.2. SISTEMA REPRODUTOR

A genitália é muito utilizada para a identificação de indivíduos da subordem Cicadomorpha através da técnica de clarificação, a qual possibilita a observação de estruturas no edeago do macho e também nas válvulas da fêmea. Contudo, ainda não há trabalhos utilizando estruturas do sistema reprodutor para a identificação de indivíduos da subfamília Cicadellinae (Oman 1949; Coelho 2016; Moulds 2012).

Nos insetos, os sistemas reprodutores possuem muitas características que se tornam comuns ao reduzir o nível taxonômicos, sendo possível encontrar grandes diferenças ao se comparar ordens de insetos e até mesmo entre espécies, apesar de ser incomum diferenças dentro de um mesmo gênero. No sistema reprodutor masculino pode ser observado variações no número e formato dos folículos testiculares, das vesículas seminais e das glândulas acessórias, estas últimas também podem variar quanto a função. Enquanto no sistema reprodutor feminino, as variações estão no número de ovariolos, na posição e forma da espermateca, na presença ou ausência de bursa copulatória e no número, forma e tipo de glândulas acessórias (Beutel 2013; Gullan & Cranston 2017). Essas variações na morfologia dos órgãos do sistema reprodutor podem ser utilizadas para auxiliar na identificação taxonômica dos indivíduos, para resolver problemas filogenéticos de alguns táxons e para compreender o seu processo evolutivo, bem como a sua biologia reprodutiva.

Gullan e Cranston (2017), trazem em seu livro que cada vez mais são utilizadas características do sistema reprodutor para a descrições das espécies, evidenciando assim relações filogenéticas. No trabalho de Kuznetsova *et al.* (2019) é utilizado a variação do número de folículos testiculares e de ovariolos para diferenciar e caracterizar filogeneticamente 18 espécies da ordem Neuroptera.

Nos insetos em geral, o sistema reprodutor masculino tem um par de testículos formados por folículos. Em cada testículo o número de folículos pode variar de um, como em Bryocorinae (Heteroptera: Miridae) (Rezende 2021), a mais de 300, como em *Palpares libelluloides* Linnaeus (Myrmeleontidae) (Kuznetsova 2019). Estes também pode variar, em formato, sendo tubulares, em forma de leque ou em pequenos lóbulos, e organização, que nos Pterygota a mais comumente observada se assemelha a cacho de uva ou pincel, já nos Archeognata e Zygentoma possui formato de pente (Beutel 2013). Os testículos são conectados através de um par de ductos deferentes a um par de vesículas seminais e, em seguida, a um ducto ejaculatório mediano. Além dessas estruturas, também estão presentes glândulas acessórias conectadas ao vaso

deferente e/ou ao ducto ejaculatório. A função destas é contribuir com a formação do líquido seminal (Chapman 1998; Beutel 2013; Gullan & Cranston 2017).

Em geral, o sistema reprodutor feminino dos insetos é constituído por um par de ovários conectados por um par de ovidutos laterais, que se encontram formando o oviduto médio, o qual pode ter a sua porção posterior modificada em uma câmara genital. Associada ao oviduto médio, as vezes dentro dele, tem-se a espermateca, órgão feminino de armazenamento dos espermatozoides, já associada à câmara genital pode ocorrer a bursa copulatória, cavidade para a qual os espermatozoides são transferidos durante a cópula (Chapman 2013; Beutel 2014; Gullan & Cranston 2017). Além dessas estruturas, é possível encontrar em associação ao oviduto médio uma glândula ou um par de glândulas acessórias, também denominadas glândulas coleteriais ou glândula de cimento por ter a função, em alguns grupos, de fixar os ovos ao substrato (Büning 1994; Chapman 2013; Gullan & Cranston 2017). Os ovários são formados por um número variado de ovaríolo, desde apenas um por ovário, como em alguns apterigotos, até aproximadamente 1000, como em rainhas de cupins (Hodin 2009; Kuznetsova *et al* 2019).

### 1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE OS ESPERMATOZOIDEOS DA FAMÍLIA CICADELLIDAE

Estudos sobre os espermatozoides de Cicadellidae ainda são escassos, tendo em vista que é a família com maior número de espécies dentro de Auchenorrhyncha (Mejidalani 1995). Os trabalhos que adicionam alguma informação sobre a espermatologia dessa família são: Folliot & Maillet (1970); Cruz-Landim & Kitajima (1972); Ammar (1985); Hayashi & Kamimura (2002); Bailey & Nuhardiyati (2005); Zhang (2010); Su (2014); Zhang *et al* (2016); Vitale *et al* (2016); Barcellos (2018 *et al.*). Desde a publicação do primeiro trabalho houve pouco avanço nas descrições dos espermatozoides do grupo correspondendo apenas a um total de 11 espécies. De acordo com Zhang & Dai (2012), é necessário um número representativo de espécies analisadas para que seja viável a utilização da morfologia dos espermatozoides em análises filogenéticas.

Os dois primeiros trabalhos supracitados trouxeram poucos detalhes na descrição dos espermatozoides das espécies *Dalbulus maidis* (DeLong), *Fagocyba douglasi* (*Typholocyba douglasi* Edwards) e *Ulopa reticulata* (Fabricius), ocorrendo a redescrição posteriormente da

espécie *D. maidis* por Barcellos *et al.* (2018). No trabalho de Ammar (1985) foi realizada a descrição dos espermatozoides das espécies *Graminella nigrifrons* (DeLong), *D. maidis*, *F. douglasi* e *U. reticulata* que compartilham características como um flagelo constituído por um axonema com 9+9+2 elementos microtubulares, dois corpos acessórios com formato de triângulos curvados e simetricamente posicionados em cada lado do axonema, dois derivados mitocondriais com formato de triângulos, arredondados ou hemisféricos.

Os trabalhos de Hayashi & Kamimura (2002) e Bailey & Nuhardiyati (2005) focaram em dinâmicas copulatória e com isso trouxeram poucas informações sobre os espermatozoides das espécies estudadas. Estes autores relatam a presença de feixes de espermatozoides na espécie *Bothrogonia ferrugínea* (Fabricius), onde nesse feixe, os espermatozoides estão fixados pela cabeça (acrossomo) em uma estrutura proteica hialina em formato de corda, também denominado espermatozeugmata (tipo de organização dos espermatozoides para transferência desprovido de membrana). Além disso, relataram que esses feixes são transferidos para a fêmea através de espermatóforo com cerca de 1,90 mm de comprimento e 1.06 mm de diâmetro e que, após a transferência, o espermatóforo e a estrutura proteica que organiza os espermatozoides em feixes são digeridas no ducto genital das fêmeas.

Bailey & Nuhardiyati (2005) relacionaram a variação do número de espermatozoides na espécie *Balclutha incisa* (Matsumara) com idade do macho (pós-emergência) e com o número e tempo de cópulas realizadas. Observaram que o número máximo de espermatozoides nessa espécie é de 700.000 (observado na idade máxima atingida por machos virgens). Os abdomes de machos e fêmeas foram colocados em fluido de maceração e o número de espermatozoides foi estimado através da contagem de suspensão diluída 10 a 20 vezes, espalhada em um hemocitômetro e depois deixada para secar. Foi mais comumente encontrado de 70.000 a 100.000 espermatozoides disponíveis em cada indivíduo. Além disso, foi observado que o número disponível aumenta com a idade do macho, a quantidade transferida para a fêmea é maior em cópulas mais longas e que o total máximo atingido pelos machos diminui após sequências de cópulas. Os autores também demonstraram que os indivíduos machos dessa espécie possuem a capacidade de se reproduzir logo após emergência, significando que já ocorre espermatogênese no penúltimo estágio de muda. O comprimento dos espermatozoides da *B. incisa* é de  $95 \pm 13,5$   $\mu\text{m}$ , sendo o flagelo seis vezes maior que o núcleo e, diferente da espécie anterior, observaram espermatozoides em feixes (espermatozeugmata) apenas nas vesículas seminais dos machos.

O primeiro trabalho focado em descrever em detalhes as estruturas dos espermatozoides de indivíduos da família Cicadellidae foi o de Zhang & Dai (2012), nele os autores descreveram a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Cicadella viridis* (Linnaeus). Nessa espécie os espermatozoides estão organizados em feixes espermatodesmata e não ocorre polimorfismo. A medida total é de 135 µm, a cabeça com aproximadamente 30 µm e o flagelo 105 µm. Possui um acrossomo curto (3,4 µm), composto por estruturas tubulares electro-densas, e um núcleo fino, alongado e linear. O adjunto centriolar é paralelo ao núcleo, conectando o mesmo aos componentes do flagelo. Este é formado por um axonema com 9+9+2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Esses autores também descrevem sete sinapomorfias para a morfologia dos espermatozoides de Auchenorrhyncha. Além disso, eles afirmam que a presença de corpo acessório, originário da matriz pericentriolar, ocorre em apenas algumas famílias dentro da subordem Auchenorrhyncha, sendo uma das principais diferenças entre as espécies da infraordem Cicadomorpha.

“(1) spermatozoa aggregate in a homogeneous matrix forming a spermatodesm; (2) a conical acrosome with electron-dense tubular substructures, which forms a ubacrosomal space; (3) absence of a perforatorium; (4) the base of the nucleus with condensed chromatin is laterally pointed forming a nucleus-flagellum transition region; (5) a centriolar adjunct parallel to the nucleus that terminates in a region where the mitochondrial derivatives start; (6) two mitochondrial derivatives located laterally and extending along the axoneme; (7) a single axoneme with a typical 9 + 9 + 2 pattern of microtubule arrangement.” (Zhang, 2012, p. 979)

O trabalho de Su *et al.* (2014) traz a descrição dos espermatozoides dos Deltocephalinae, *Psammotettix striatus* (Linnaeus) e *Exitianonus nanus* (Distant). Os autores observaram que os espermatozoides de *P. striatus* e *E. nanus* se diferenciam quanto ao comprimento, formato do núcleo, corpos acessórios e as regiões paracristalinas dos derivados mitocondriais. Nas duas espécies, os espermatozoides foram observados em feixes (espermatodesmata) nas vesículas seminais. Em *E. nanus* essas células tinham comprimento total de 270 µm, sendo a cabeça com 40 µm, o flagelo 230 µm, o acrossomo era curto e cônico com cerca de 2 µm. A cabeça era estreita em forma de agulha e o flagelo sinuoso e possuindo dois corpos acessórios. Já em *P. striatus* essas células possuíam comprimento total de 156 µm, sendo 30 µm a cabeça, 126 µm o flagelo e aproximadamente 3 µm o acrossomo. O núcleo de *E. nanus* varia do formato de “tachinha” para oval em cortes transversais e de *P. striatus* possui um formato oval em cortes transversais e com núcleo alongado com cromatina condensada.

Em 2016 foram publicados os trabalhos de Zhang *et al.* e Vitale *et al.*, com informações sobre os espermatozoides de *Cicadella viridis* (Linnaeus), *Kolla paulula* (Walker) e *Balclutha brevis* (Lindberg). O espermatozoide da *K. paulula* é organizado em feixes espermatozoides. As espermátides no início da espermiogênese possuem um proacrossomo esférico e granulado localizado entre o complexo de Golgi e o núcleo. Além disso, o axonema é formado do lado oposto ao núcleo e o nebenkern (formação mitocondrial) aparece nas células. Nas espermátides tardias, o núcleo já está alongado com cromatina densa e homogênea, enquanto os derivados mitocondriais aparecem cercados por microtúbulos, que desaparecem nos espermatozoides, mas que exercem um papel fundamental no alongamento do núcleo. O formato do núcleo varia de oval para forma de “tachinha” em cortes transversais. Uma grande diferença encontrada nos espermatozoides de *K. paulula* com relação às outras espécies de Cicadellidae é o espaço entre a região eletro-lúcida e eletro-densa nos derivados mitocondriais. Os corpos acessórios da espécie *C. viridis*, assim como o de *K. paulula*, são orbiculares-ovais, diferentemente das espécies anteriores que são em formato de “gota”. As outras características seguiram a sinapomorfia da família. No artigo não foi apresentado a morfometria espermática ou outras características do espermatozoide de *C. viridis*. Os espermatozoides de *B. brevis*, descrito por Vitale *et al.* (2016), possuem características diferentes dos outros indivíduos descritos anteriormente por outros autores. Uma das diferenças é na formação dos feixes de espermatozoides, que em *B. brevis* são formados nos cistos foliculares, mas são desorganizados nos ductos ejaculatórios laterais e são transferidos para as fêmeas de forma livre. Os espermatozoides foram descritos com comprimento de 125 µm ao todo, sendo a cabeça com 20 µm e o flagelo 105 µm. O final do flagelo é ramificado em quatro pontas com 15 µm cada. As características do acrossomo, derivado mitocondrial e corpos acessórios seguiram as sinapomorfias da família. Os feixes encontrados nos cistos foliculares tinham o formato de “cometa”.

O trabalho mais recente é o de Barcellos *et al.* (2018), que traz uma redescrição da morfologia dos espermatozoides de *D. maidis*. Nessa espécie, os espermatozoides foram encontrados em feixes do tipo espermatozoides nas vesículas seminais. Com cerca de 122 µm de comprimento total, diferente do trabalho anterior de Cruz-Landim & Kitajima (1972) que descreve o comprimento de 300 µm. O flagelo mede 100 µm e a sua porção final é ramificada em quatro ramos assim como em *B. brevis*, entretanto, com 10 µm de comprimento cada. O núcleo, de cromatina densa, é delgado medindo aproximadamente 21 µm de comprimento e com formato de “tachinha” em cortes transversais, exceto nas regiões anterior e posterior onde

é encontrado na forma oval. A base do acrossomo é bifurcada, com duas projeções inseridas em dois sulcos laterais ao longo da região anterior do núcleo. As outras características do espermatozoide seguiram a sinapomorfia da família.

## 2. JUSTIFICATIVA

A necessidade de realizar este trabalho fica claro por existir uma possível problemática na identificação da espécie *V. ruficauda* ao se observar dois padrões de coloração corporal para uma mesma espécie. Além disso, trabalhos de morfologia e histologia do sistema reprodutor e dos espermatozoides de Cicadellidae são escassos e existe pouco avanço nas descrições e no uso dessas estruturas como caráter taxonômico. A inserção de novos dados pode facilitar a identificação da espécie e acrescentar com informações sobre o sistema reprodutor de Cicadellidae.

## 3. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi descrever a morfologia do sistema reprodutor masculino e feminino, além da morfometria espermática da espécie *Versigonalia ruficauda* (Hemiptera: Cicadellinae) (Figura 1.1 e 1.2). Além disso, observar se ocorre variação na histologia e morfologia do sistema reprodutor masculino e feminino, e da morfometria do espermatozoide dentro das variações de cor de indivíduos pertencentes à espécie *Versigonalia ruficauda* (Hemiptera: Cicadellinae).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. COLETA, TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO

Os indivíduos machos e fêmeas adultos, além de ninfas para criação, de *V. ruficauda* foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa (MG). Os indivíduos de coloração verde foram encontrados em plantas de boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews) e de cóleus (*Solenostemon scutellarioides* (L.) R.Br.) no Herbário da UFV, no prédio de Biologia Geral e no Vale da Agronomia. Os exemplares da coloração azul foram encontrados em cássia (*Senna* sp.) na Mata do Paraíso. As coletas foram realizadas ao longo do dia com o auxílio de sugadores entomológicos manuais. Após a coleta, os exemplares foram levados ao Laboratório de Ultraestrutura Celular, onde os indivíduos adultos, após anestesiados com dióxido de carbono, foram submetidos aos procedimentos para confirmação da identificação e a dissecação em tampão fosfato de sódio 0,12 M e pH 7,2 (PBS) sob um estereomicroscópio de luz Olympus

SZH10. Para a identificação dos espécimes foram utilizadas as pranchas e chaves fornecidas por Young (1977) e Camisão (2014).

## **4.2. MONTAGEM DE CORTES HISTOLÓGICOS**

Para a histologia, os sistemas reprodutores masculinos e femininos, dos dois padrões de coloração, dissecados foram fixados em glutaraldeído 2,5%, em PBS acrescido de Sacarose a 3%. Após uma hora, eles foram lavados com tampão PBS e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas e lavados novamente. Posteriormente, foram desidratados em série alcóolica crescente (30%, 50%, 70%, 90%) e finalizado em dois banhos, de 15 minutos cada, com álcool 100%. Após a desidratação, o material foi infiltrado com uma mistura de historesina (base – sache) e álcool (proporção 1:1), e depois com historesina pura. O material foi emblocado em moldes com historesina adicionada de catalizador e colocados na estufa à 60° por algumas horas para a completa polimerização da resina. Os cortes semifinos (0,5 e 1 µm de espessura) foram feitos em um micrótomo Leica RM 2155, com navalhas de vidro. Esses cortes foram transferidos para lâminas histológicas, secos em placa aquecedora em temperatura média de 40°C e corados com Giemsa diluído em água destilada na concentração 3:15 por 30 minutos e lavados em água corrente. Alguns cortes foram corados com DAPI por uma hora para a observação dos núcleos celulares. A análise e fotodocumentação foram realizadas em um fotomicroscópio Olympus BX-60. As imagens obtidas foram feitas em grande aumento nas objetivas de 40X e 100X e montadas e editadas com o auxílio do software de edição de imagem (Photoshop versão 23.3.2). Para melhor definir determinadas regiões de estruturas de difícil visualização serão propostas terminologias informais.

## **4.3. MORFOMETRIA DOS ESPERMATOZOIDES**

Gotas de solução de espermatozoides, a partir de vesículas seminais de machos e espermateca ou bursa copulatória de fêmeas, foram espalhados sobre lâminas histológicas. Após confirmação de que o conteúdo foi espalhado uniformemente, em um microscópio Olympus CX40, as lâminas foram secas à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente e, depois, em água destilada. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Giemsa por 30 min, na proporção 3:15 em água destilada, lavados em água corrente e secas à temperatura ambiente. Para a medição dos núcleos, algumas lâminas foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão PBS por 20 min e lavados em água corrente. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em um fotomicroscópio Olympus BX-60. As lâminas coradas com DAPI foram cobertas com

lamínulas usando solução aquosa de sacarose a 50% e fotografadas no mesmo microscópio usando filtro de excitação BP 360-370 nm.

Para as medidas dos espermatozoides (comprimento total, do acrossomo e do flagelo) foram usados 20 indivíduos, sendo 10 da cor azul e 10 verdes. Para cada indivíduo foram medidos 10 espermatozoides, totalizando 100 espermatozoides para cada variação de cor. Para o comprimento nuclear (lâminas coloradas com Dapi), foram fotografados 30 núcleos de cada um dos 20 indivíduos, totalizando 300 núcleos medidos para cada variação de cor. Todas as medidas foram obtidas usando os softwares Sperm sizer versão 1.6.6 e o ImageJ versão 1.53o. As análises das medias forma feitas usando o software de estatística Jamovi na versão 2.3.21. Com ele foram feitas a estatística descritiva dos dados, os testes T, de Mann-Whitney, de normalidade e de homogeneidade da amostra e os gráficos boxsplot.

## **5. LOCAL DE EXECUÇÃO**

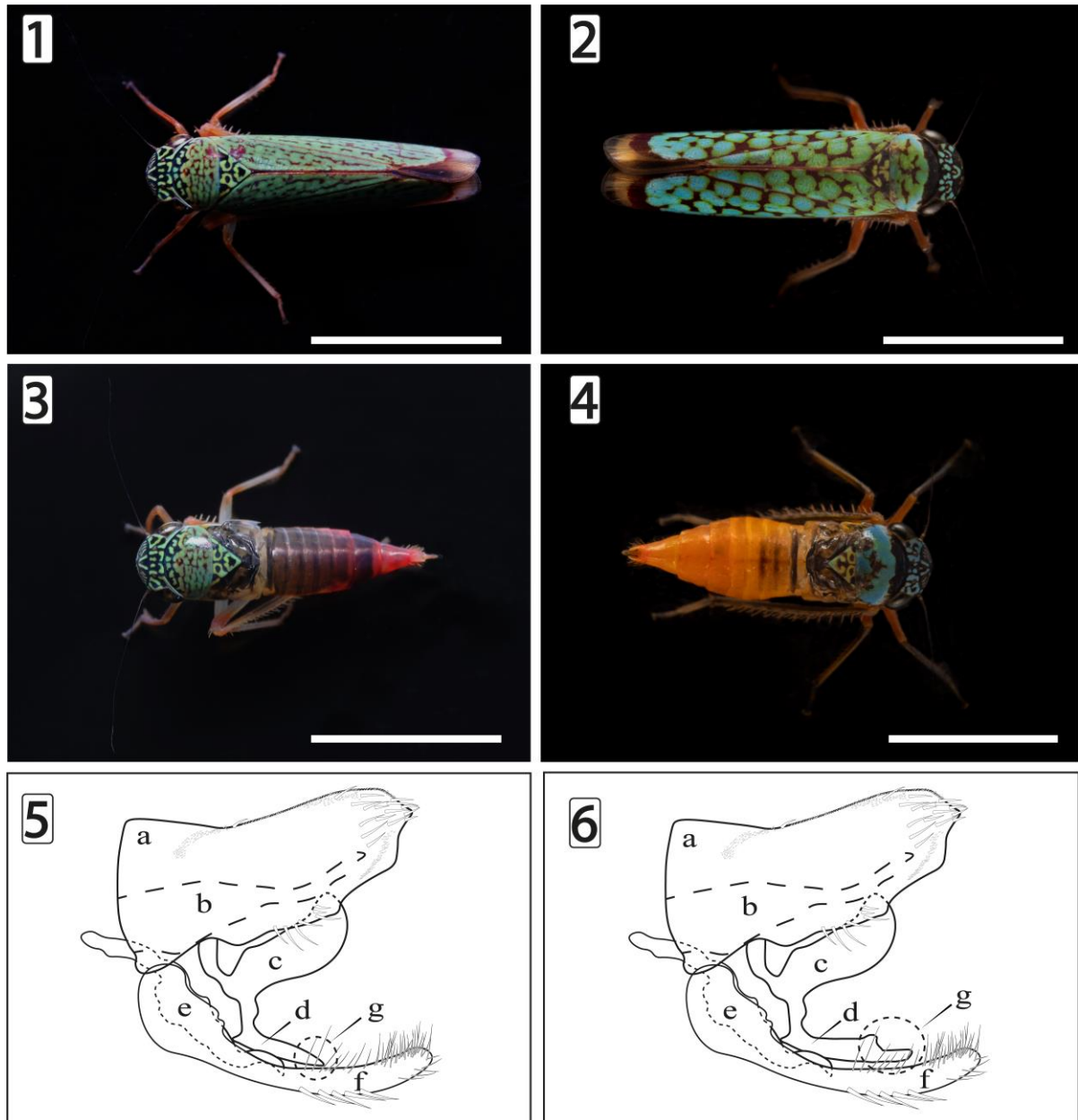
Todo o trabalho foi planejado e executado no Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, *campus* Viçosa, MG.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. GENITÁLIA DE *V. RUFICAUDA***

Foi observado durante o processo de clarificação, para identificação dos espécimes a serem utilizados nesse estudo, diferença em uma estrutura da genitália masculina entre as variações de cor da espécie *V. ruficauda* (Figura 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4. A paráfise do indivíduo da variação verde possui uma região distal afilada, enquanto que no individuo da variação azul foi observada uma região distal truncada (figura 2.5 e 2.6). Não foram encontradas diferenças morfológicas nas demais estruturas da genitália masculina.

Figura 2. Indivíduos e genitálias de *V. ruficauda*. 1-4- Indivíduos das cores verde (1 e 3) e azul (2 e 4) com asa (1 e 2) e com asas removidas (3 e 4). 5 e 6- Ilustrações das genitálias de indivíduo da cor verde e azul, respectivamente. a- Pigóforo; b- Processo do pigóforo; c- Edeago; d- Paráfise; e- Estilo com conectivo; f- Placa subgenital; g- Ápice da paráfise. Barras de escala = 4 cm.



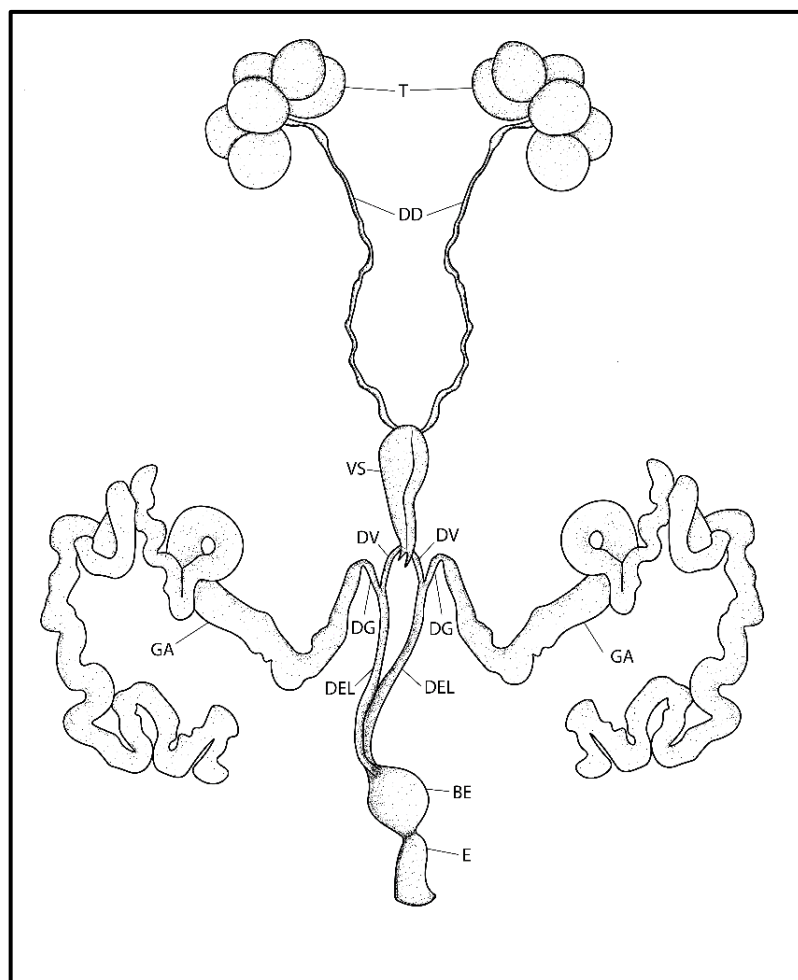
Fonte: Autoria própria

## 6.2. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

Não foram observadas diferenças na morfologia do sistema reprodutor masculino entre as duas variações de *V. ruficauda*. Nas duas, o sistema (Figura 3) é composto por um par de testículos, cada testículo com seis folículos arredondados e encapsulados individualmente por

uma membrana fina de cor amarela. De cada folículo sai um ducto eferente e os seis ductos desembocam em um ducto deferente, conectando cada testículo a uma vesícula seminal. As duas vesículas seminais são semifusionadas e encapsuladas por uma membrana fina também de cor amarela. A porção posterior de cada vesícula seminal é continua com um ducto deferente pós-vesicular que, em seguida, se funde à extremidade posterior do ducto da respectiva glândula acessória. Assim, os dois curtos ductos do par de longas glândulas acessórias mais os dois ductos deferente pós-vesicular formando os dois ductos ejaculatório laterais e, finalmente, esses ductos ejaculatórios se fusionam ao bulbo ejaculatório que conecta todo o sistema ao edeago.

Figura 3 – Esquema do sistema reprodutor masculino de *V. ruficauda*. T- Testículos; DD- Ductos deferentes; VS- Vesículas seminais; DV- Ductos deferentes pós-vesicular; DG- Ductos das glândulas acessórias; GA- Glândulas acessórias; DEL- Ductos ejaculatórios laterais; BE- Bulbo ejaculatório; E- Edeago.

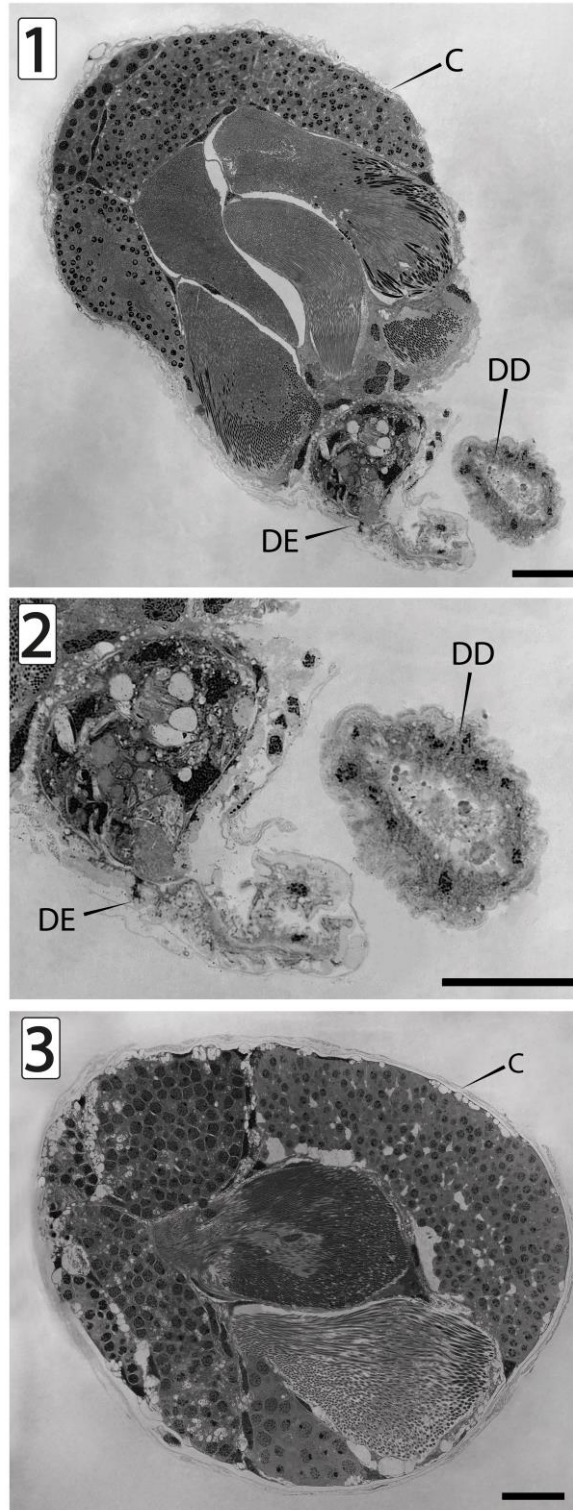


Fonte: Autoria própria

### **6.3. HISTOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO**

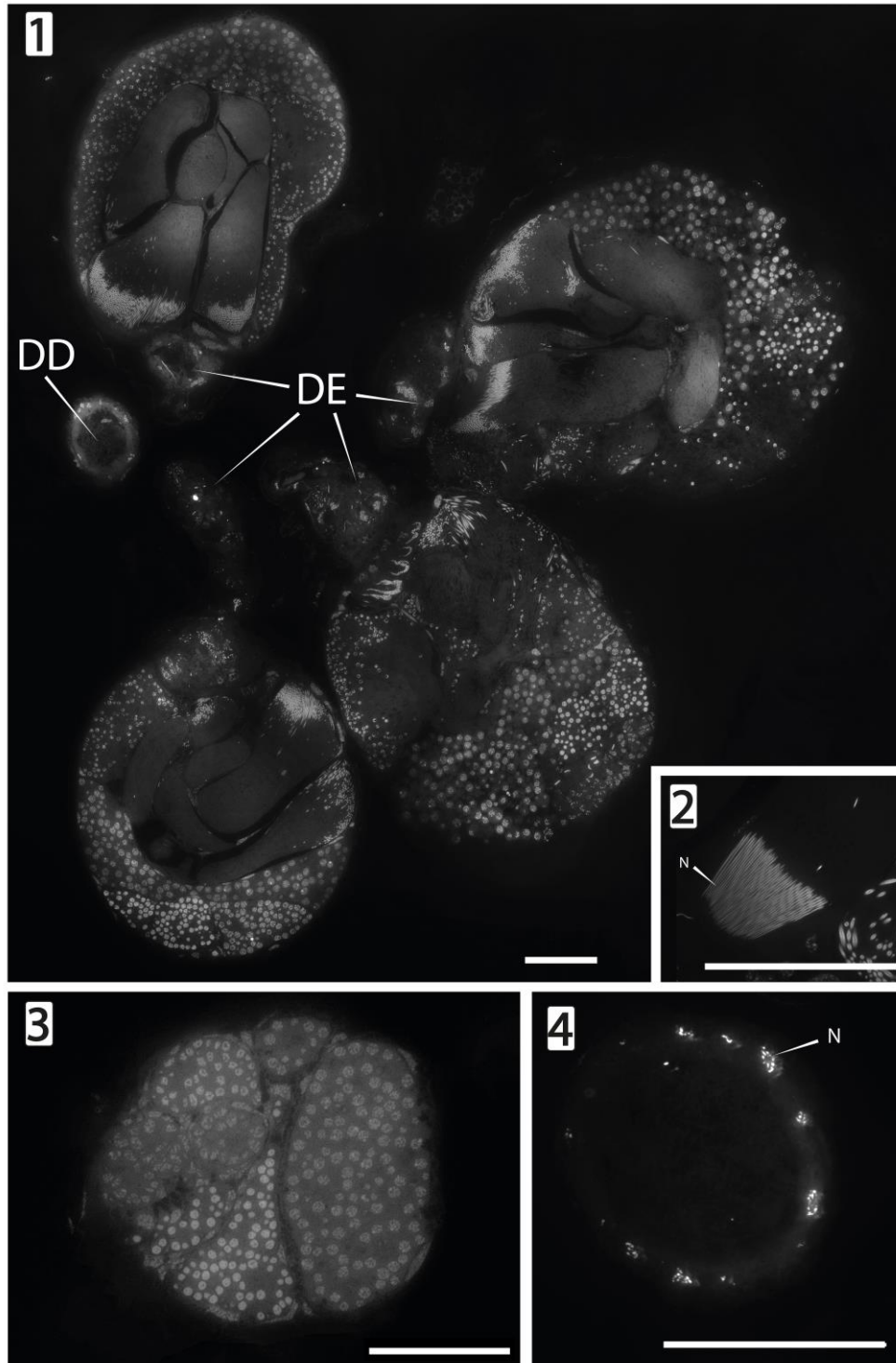
Foi observado que cada folículo testicular era circundado por uma capsula conjuntiva fina (Figura 4.1 e 4.3) conectado a um curto ducto eferente (Figura 4.1 e 4.2), que junto aos ductos dos outros folículos (Figura 5.1), formam o ducto deferente (Figuras 3 e 5.1). Os folículos são preenchidos por cistos com células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Figura 4.1 e 4.3), de modo que os cortes, especialmente longitudinais (Figuras 4.1), mostram células germinativas bem jovens na porção distal (5.3), espermatócitos e espermatídes jovens na porção média (Figura 4.3) e na região proximal, junto ao ducto eferente, observa-se espermatídes e estágios finais da espermiogênese (Figura 4.3) e até mesmo espermatozoides (Figura 5.2). No ducto deferente foi observado um tecido epitelial simples de células achatadas com núcleo de cromatina descondensada, mas exibindo grânulos densos (Figura 5.4).

Figura 4 - Cortes histológicos de folículos testiculares de *V. ruficauda* corados com Giemsa. 1- Corte longitudinal de um folículo; 2 – Detalhe do corte longitudinal do ducto eferente (DE) e do ducto deferente (DD); 3- Corte transversal na porção média do folículo DD- ducto deferente; DE- ducto eferente; C- capsula conjuntiva; N- núcleo. Barras de escala = 40  $\mu$ m.



Fonte: Autoria própria

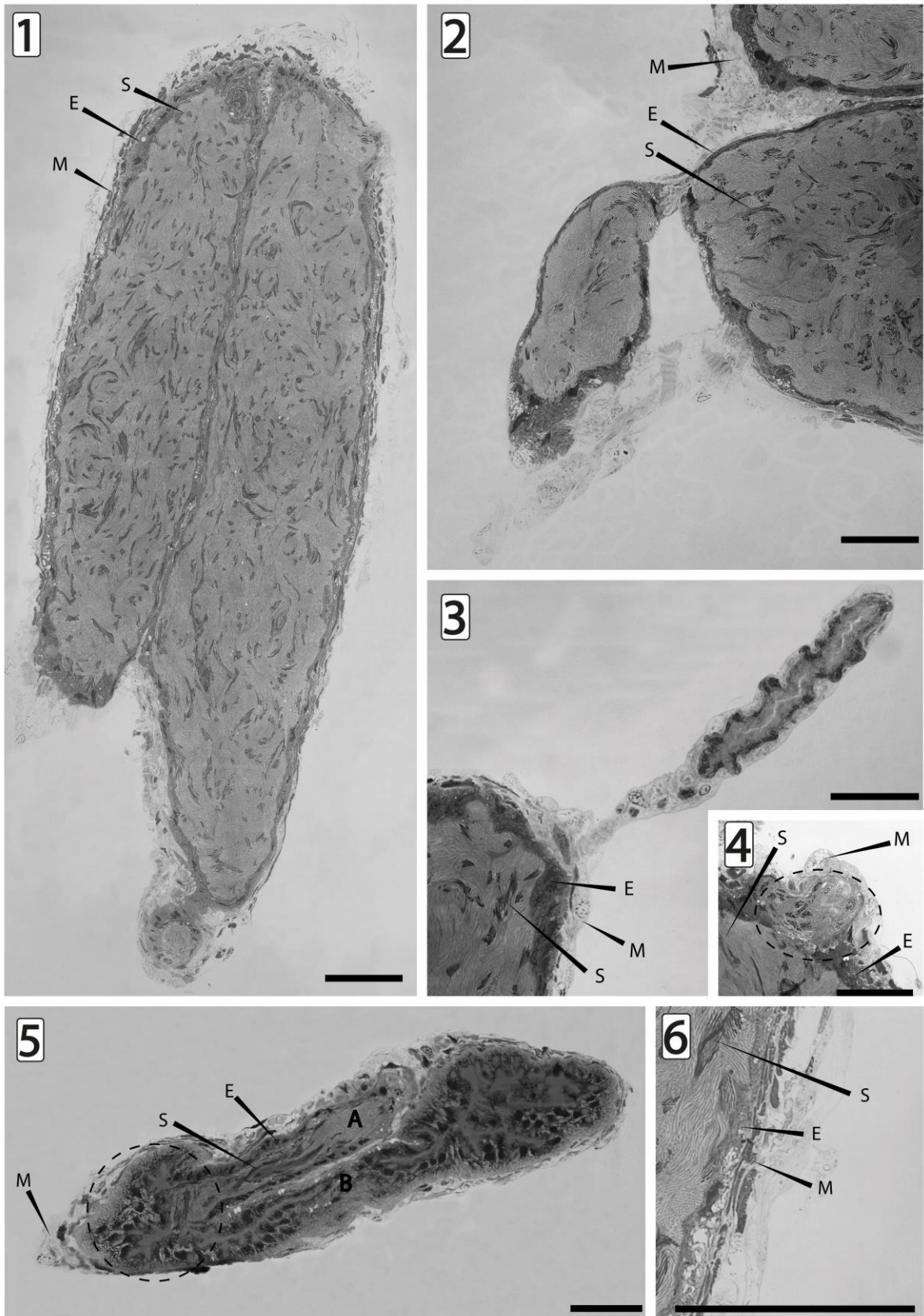
Figura 5 - Cortes histológicos de folículos testiculares de *V. ruficauda* corados com Dapi. 1- Corte longitudinal mostrando quatro folículos, os respectivos ductos eferentes e ducto deferente; 2- Detalhe do Corte longitudinal mostrando os núcleos dos espermatozoides em estágio mais avançado da espermiogênese em feixe na porção proximal de um folículo; 3- Corte transversal na porção distal do folículo; 4- Corte transversal de um ducto deferente mostrando os núcleos com cromatina descompactada das células epiteliais. DD- ducto deferente; DE- ducto eferente; N- núcleo. Barras de escala = 40  $\mu$ m.



Fonte: Autoria própria

Quando observadas na histologia, cada vesícula seminal era encapsulada individualmente, mas externamente eram circundadas por uma única e delgada camada de células musculares, trazendo um aspecto de fusionamento (Figura 6.1 e 6.6). Nelas é possível observar em seu lúmen uma grande quantidade de feixes de espermatozoides armazenados oriundos dos folículos testiculares que chegam a elas através dos ductos deferentes pré-vesiculares (Figura 6.3 e 6.4). De cada vesícula seminal sai um ducto deferente pós-vesicular (Figura 6.2) que se funde ao ducto da respectiva glândula acessória, formando o ducto ejaculatório lateral (Figura 6.5).

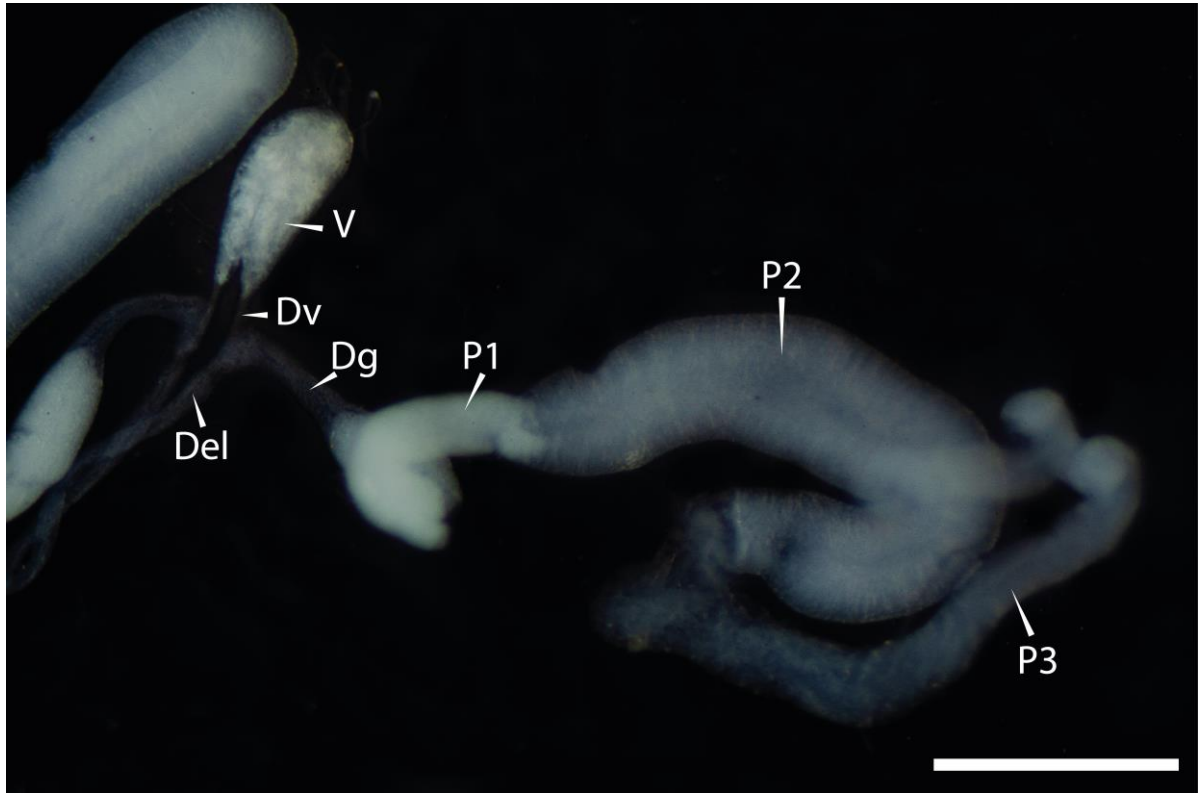
Figura 6 - Cortes longitudinais de vesículas seminais e ductos deferentes pré- e pós-vesicular de *V. ruficauda*. 1- Um par de vesículas seminais preenchido com espermatozoides organizados em feixes. 2- Região posterior de uma vesícula seminal e o início do respectivo ducto deferente pós-vesícula. 3- Região posterior de uma vesícula seminal e o final do respectivo ducto deferente pré-vesícula. 4- Detalhe da fusão do ducto deferente pré-vesícula com a vesícula. 5- Região da fusão de um ducto deferente pós-vesícula com o ducto oriundo da respectiva glândula acessória. 6- Detalhe do epitélio da vesícula. S- Feixe de espermatozoides; E- Epitélio; M- Músculo; A- Ducto deferente pós-vesicular; B- Ducto de uma glândula acessória; Áreas de fusão de epitélio com círculo pontilhado. Barra de escala = 40  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autoria própria

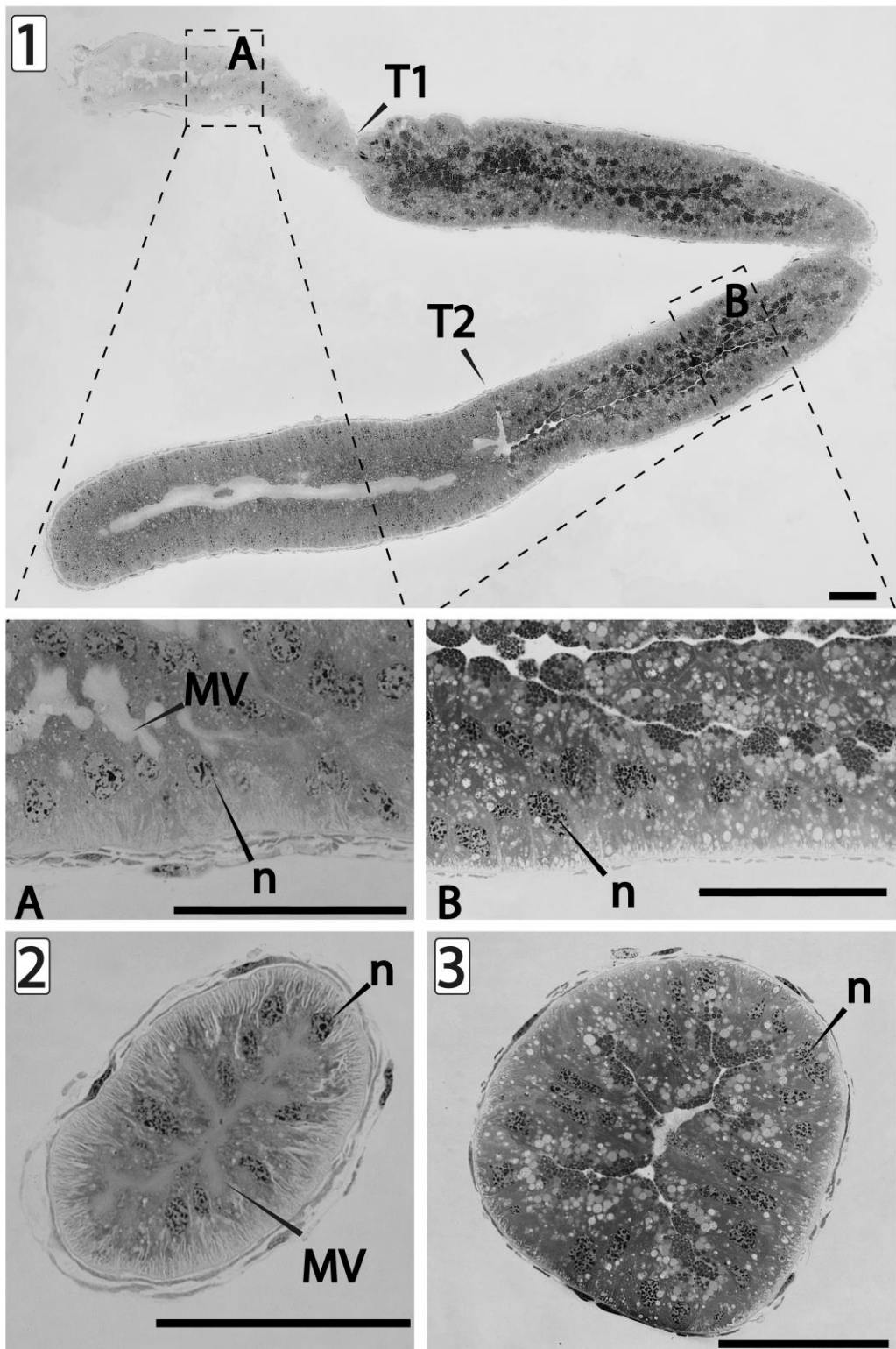
Já no processo de dissecação, bem como nos cortes histológicos, foi possível observar que as glândulas acessórias possuem três porções secretoras facilmente distinguíveis, além do ducto já acima mencionado. Essas porções foram aqui denominadas com base nos seus diâmetros em *porção fina*, a região mais distal, fina e longa, *porção grossa*, a região mediana, por fim a *porção condensada* que é uma curta região entre o ducto e a porção grossa que adquire a aparência esbranquiçada quando submetidas ao fixador Carnoy, possivelmente devido a coagulação de sua secreção (Figuras 3, 7, 8 e 9). A transição entre uma porção e outra é curta e facilmente reconhecida em montagem total (Figura 7, 8.1 e 9.1) ou a partir de cortes histológicos (Figura 8 e 9) devido às características das células do epitélio (o qual é simples ao longo de toda glândula) e especialmente do seu produto de secreção. O ducto (Figura 8.1, 8.1.A e 8.2) é caracterizada por seu epitélio possuir células cúbicas, com microvilosidades na borda apical, núcleo bem definido com cromatina descondensada, além de produzir invaginações entre as células e possuir uma camada muscular fina circundando o tecido. A porção condensada (Figura 8.1, 8.1.B e 8.3) possui células apócrinas caliciformes, apresenta núcleo com cromatina descondensada, invaginações entre grupamentos celulares e uma camada muscular fina em volta de todo o tecido. A porção grossa (Figura 9.1, 9.1.C e 9.2) é caracterizada por ser a região com maior circunferência da glândula, formada por células colunares longas e com inúmeras microvilosidades, possui vesículas intracelular, nucléolo com núcleo bem definido com cromatina descondensada e um fina camada muscular circundando o tecido. A porção fina da glândula (Figura 9.1, 9.1.D e 9.3), e também a mais comprida, possui células cúbicas estratificadas holócrinas.

Figura 7- Glândula acessória da espécie *V. ruficauda* clarificada com fixador Carnoy. V- Vesícula; Dv- Ducto pós-vesícula; Dg- Ducto da glândula; Del- Ducto ejacutório lateral; P1- Porção condensada da glândula acessória; P2- Porção grossa da glândula acessória; P3- Porção fina da glândula acessória. Barra de escala = 1 cm.



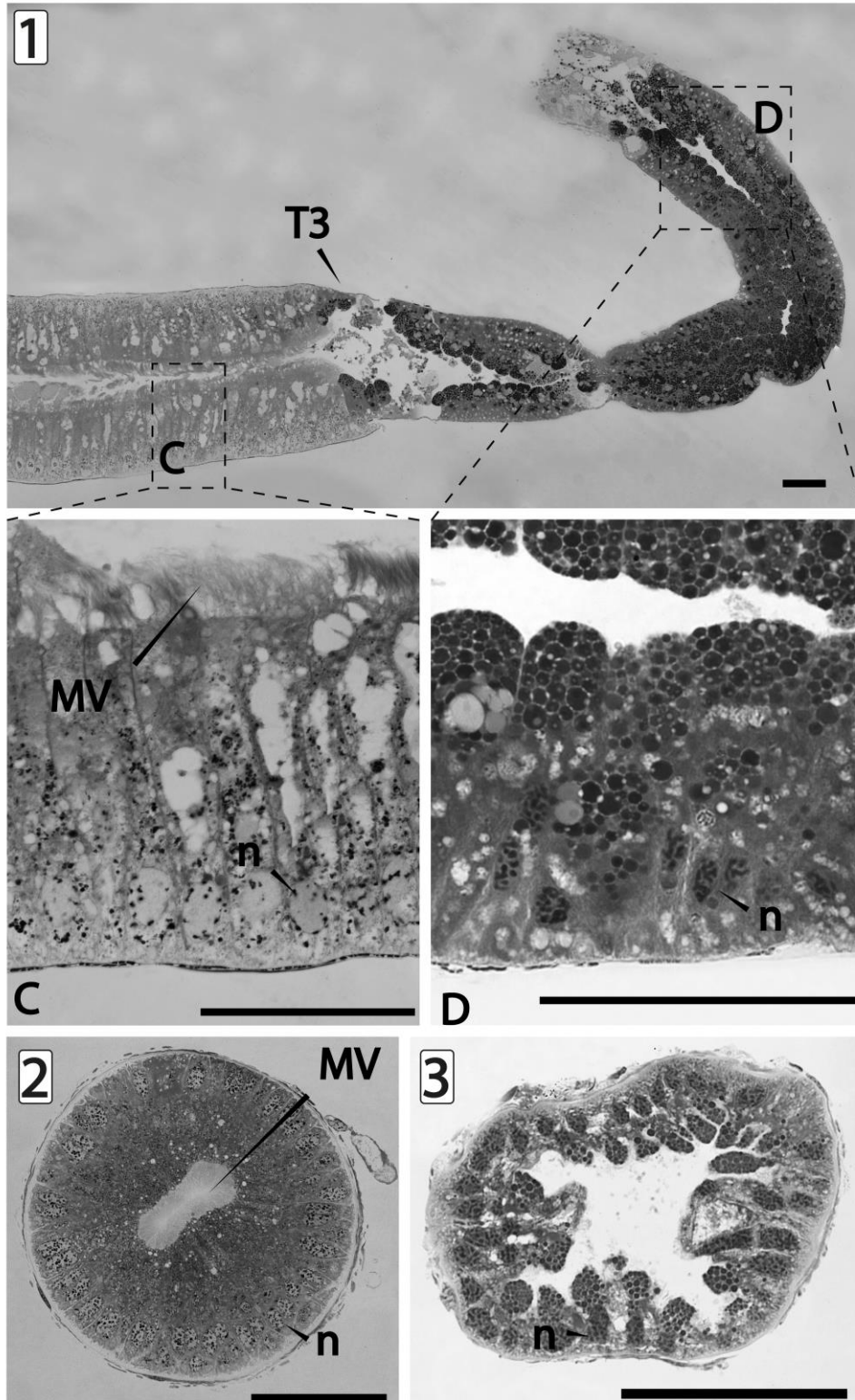
Fonte: Autorial própria

Figura 8 - Cortes longitudinais (1) e transversais (2 e 3) da glândula acessória e do ducto da glândula do sistema reprodutor masculino de *V. ruficauda*. 1- Corte de uma glândula mostrando as transições entre ducto e a porção condensada e ente esta última e a porção grossa; 1.A- Detalhe do epitélio do corte longitudinal do ducto da glândula; 1.B- Detalhe do epitélio do corte longitudinal da porção condensada da glândula; 2 e 3- Cortes transversais do ducto e da porção condensada, respectivamente. T1- Transição entre ducto e porção condensada; T2- Transição entre porção condensada e porção grossa; T3- Transição entre porção grossa e porção fina; MV- microvilosidades; n- núcleo. Barras de escala = 60  $\mu$ m.



Fonte: Autoria própria

Figura 9 - Cortes longitudinais (1) e transversais (2 e 3) da glândula acessória. 1- Corte de uma glândula destacando a transição entre as porções grossa e fina; 1.C- Detalhe do epitélio do corte longitudinal a porção grossa da glândula; 1.D- Detalhe do epitélio do corte longitudinal da porção fina da glândula; 2 e 3- Cortes transversais porção grossa e fina, respectivamente. T3- Transição entre porção grossa e porção fina; MV- microvilosidades; n- núcleo. Barras de escala = 60 µm.

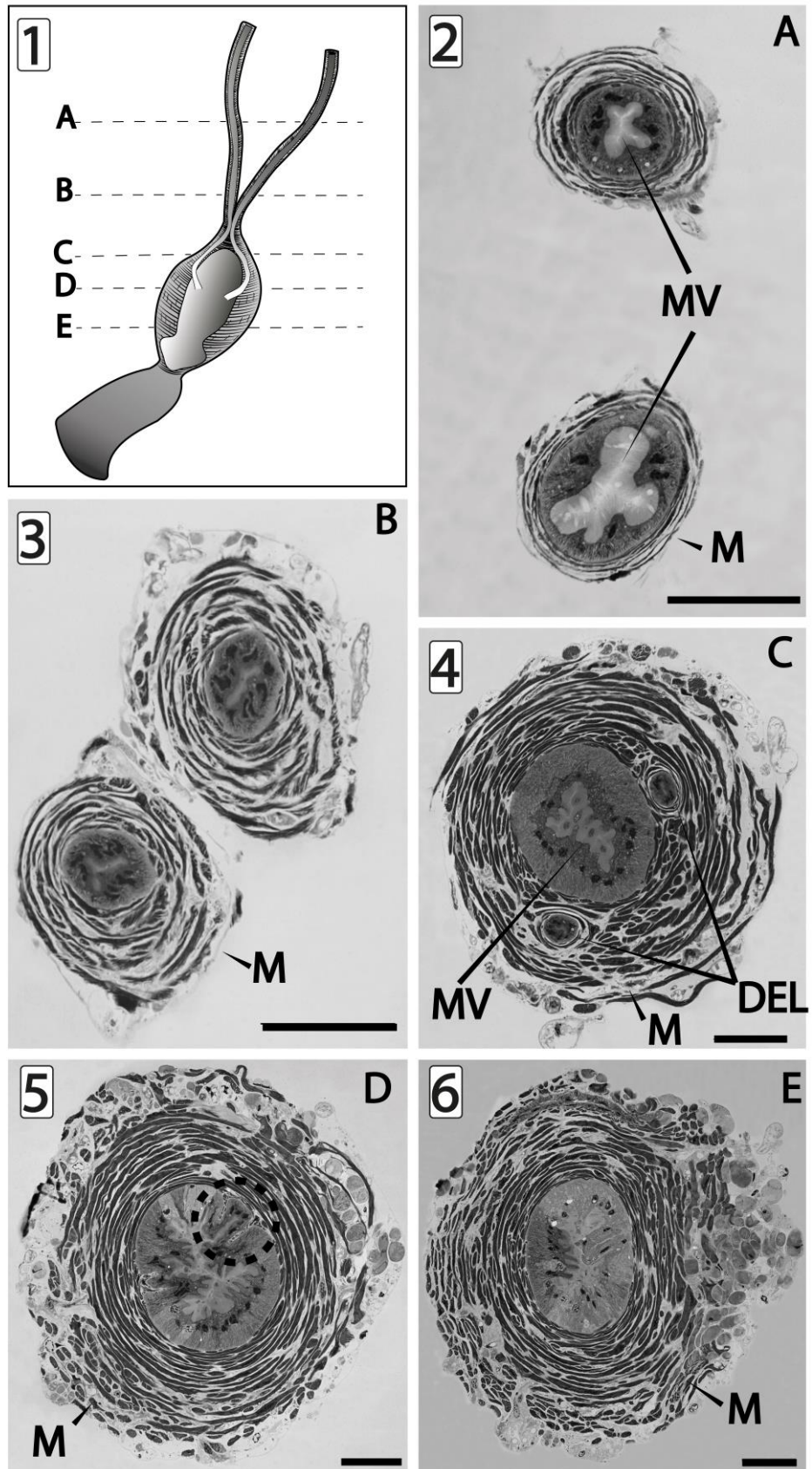


Fonte: Autoria própria

O bulbo ejaculatório, em montagem total, aparenta ter um formato ovóide, com os ductos ejaculatórios laterais se fundindo em seu ápice (Figura 3). Entretanto, a partir de cortes histológicos longitudinais foi possível perceber que ele possui formato de violino (Figura 10.1 e 11.2) e, em cortes transversais em série, os ductos ejaculatórios laterais fundem com ele lateralmente (Figura 10.5), com uma grande camada muscular circundando todo eles. Na região mediana dos ductos ejaculatórios, as células epiteliais têm microvilosidades bem evidentes e é circundada por uma camada muscular fina (Figura 10.2) Contudo a camada muscular vai ficando cada vez mais espessa à medida que se aproxima do bulbo ejaculatório (Figura 10.3 e 10.4). Além de ser possível, no corte longitudinal, observar espermatozoides na porção do ducto ejaculatório próxima ao bulbo (Figura 11.4).

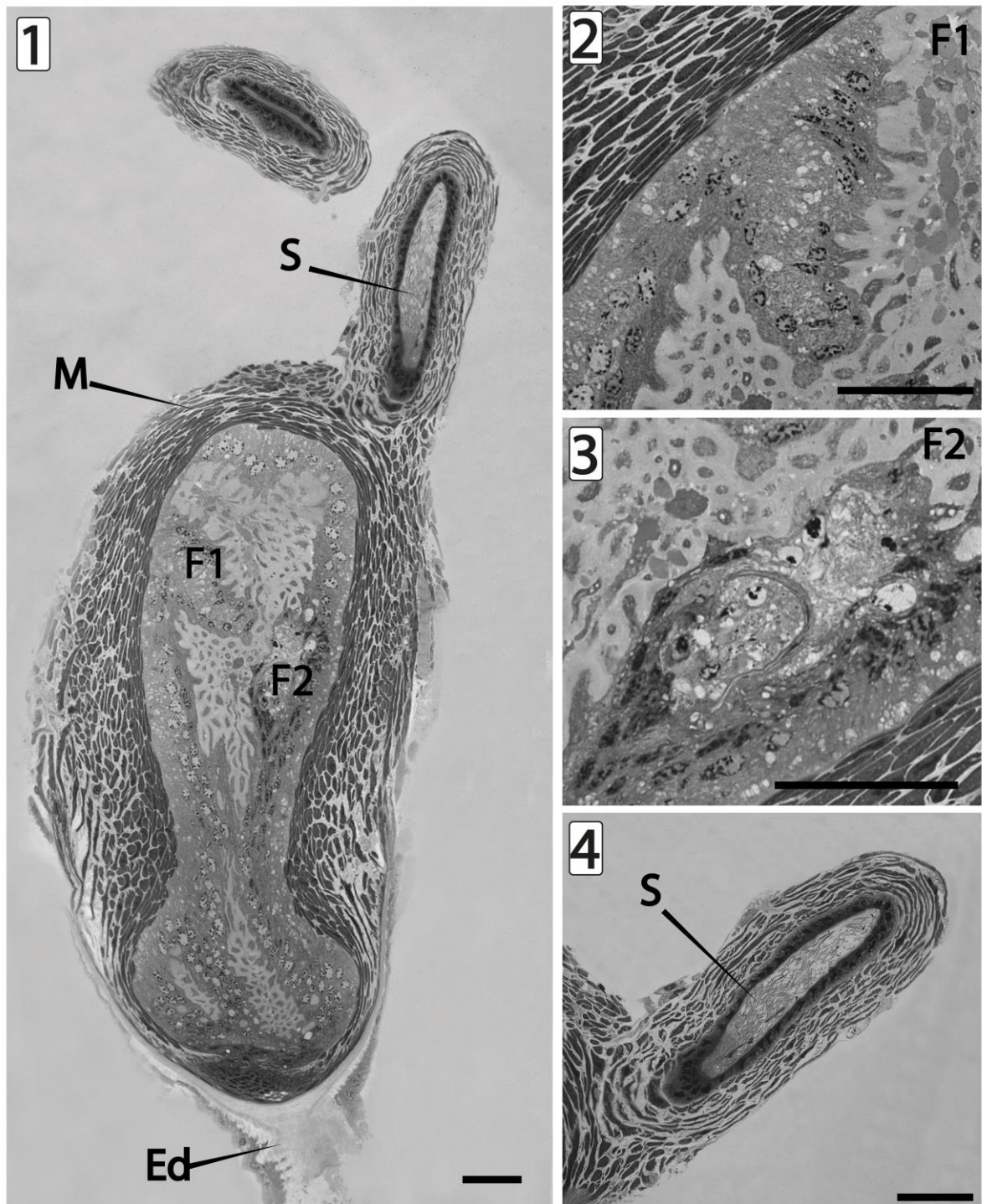
O bulbo ejaculatório é caracterizado por possuir um epitélio com invaginações e células cilíndricas com microvilosidades e, externamente, uma camada muscular muito espessa (Figura 10.6). Em lados opostos da região mediana do bulbo, ocorre a fusão dos dois ductos ejaculatórios (Figura 10.5, 11.1, 11.2 e 11.3). Ao final, o bulbo se conecta ao edeago e sua camada muscular torne-se menos espessa (Figura 10.1 e 11.1).

Figura 10 – Esquema (1) e cortes transversais (2 - 6) dos ductos ejaculatórios laterais e do bulbo ejaculatório de *V. ruficauda*. 1- Esquema indicando a posição dos cortes transversais. 2- Os dois ductos ejaculatórios cortados na região mediana (posição A), mostrando que o ducto é formado por um epitélio simples colunar, com microvilosidades, delimitando o lúmen irregular. Note que externamente o ducto é envolvido por poucas camadas concêntricas de músculo e tecido conjuntivo. 3- Corte dos ductos ejaculatórios em uma região mais posterior (posição B), mostrando que a camada muscular se torna mais espessa e uma redução do lúmen. 4 a 6- Cortes dos ductos ejaculatórios laterais e do bulbo ejaculatório (posições C-E), mostrando que a fusão dos ductos ocorre em lados opostos (4) na região mediana do bulbo. Região pontilha em 5 região de fusão do ducto com o bulbo. MV- microvilosidades; M- músculo; DEL – ducto ejaculatório lateral; Ed- edeago; S- espermatozoide. Barras de escalas = 40 µm.



Fonte: Autoria própria

Figura 11– Cortes longitudinais dos ductos ejacutórios laterais e do bulbo ejacutório de *V. ruficauda*. 1- Bulbo ejacutório e as porções finais dos ductos ejacutórios laterais. 2- Detalhe longitudinal da fusão do ducto ejacutório com o bulbo mostrado na figura 11.1. na marcação F1. 3- Detalhe longitudinal da fusão do ducto ejacutório com o bulbo mostrado na figura 11.1. na marcação F2. 4- Detalhe da porção final de um dos ductos ejacutórios mostrado na figura 11.1. MV- microvilosidades; M- músculo; DEL – ducto ejacutório lateral; Ed-edeago; S- espermatozoide. Barras de escalas = 40 µm.



Fonte: Autoria própria

#### 6.4. ANATOMIA E HISTOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

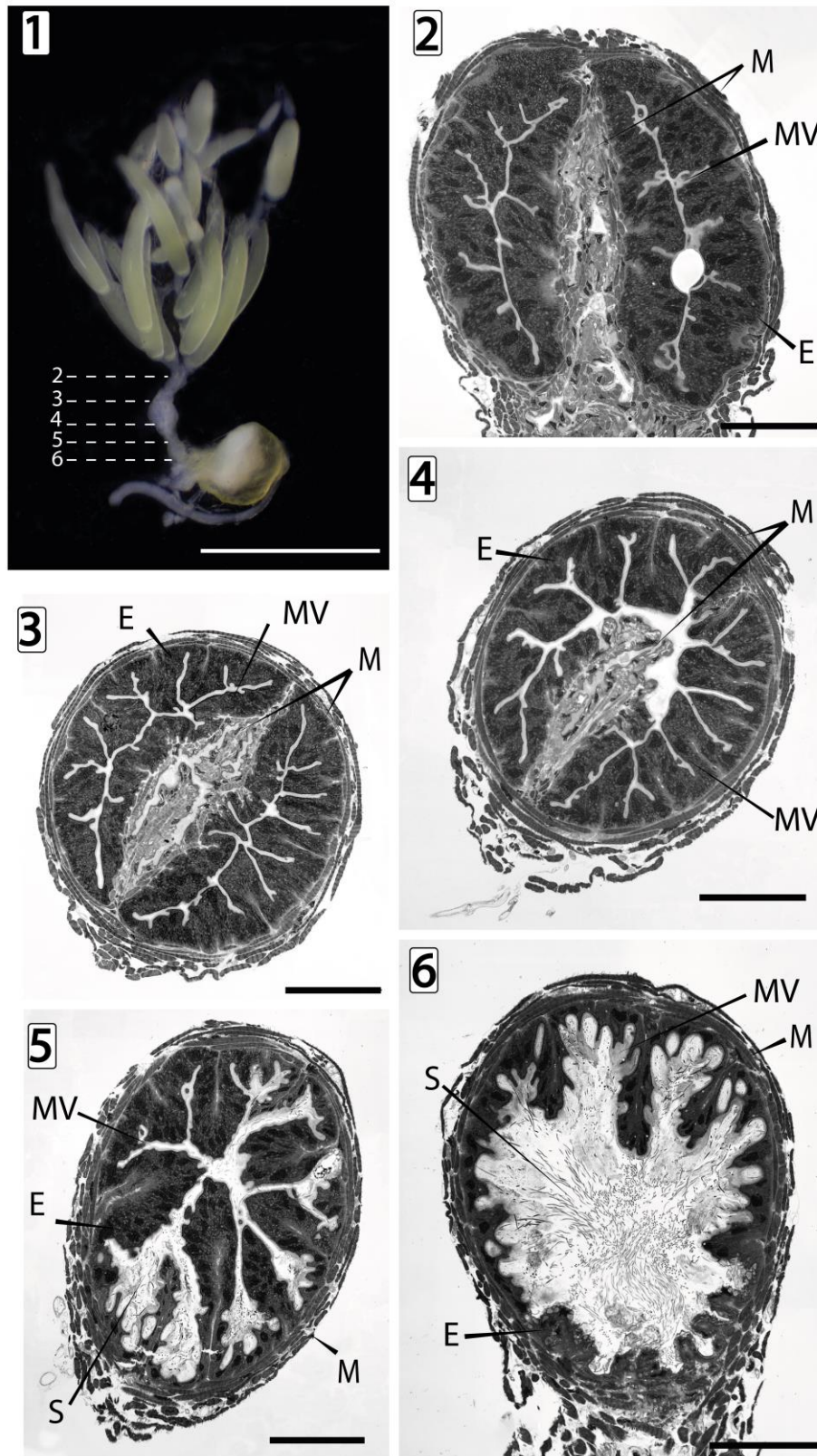
O sistema reprodutor feminino (Figuras 9.1 e 10.3) de *V. ruficauda* é formado por dois ovários, cada um com seis ovariolos do tipo meroístico telotrófico, portanto com células nutridoras permanecem no germário (Figura 10.5). De cada ovário sai um oviduto lateral curto, os dois ovidutos laterais desembocam no oviduto comum. Na região média do oviduto comum foi possível observar uma porção dilatada onde são armazenados os espermatozoides, portando corresponde à espermateca (Figura 10.1). Lateralmente à porção final do oviduto comum observa-se uma estrutura bem desenvolvida e aproximadamente esférica, denominada bursa copulatória, a qual é revestida externamente por uma cápsula conjuntiva amarela (Figura 9.8 e 10.2). Ainda, associado a porção final do oviduto comum há uma glândula coleterial, a qual é fina e longa e, em geral, ligada á membrana da bursa copulatória.

A partir dos cortes transversais do oviduto comum foi possível observar a fusão dos dois ovidutos laterais (Figura 9.2 a 9.4) e um aumento progressivo do lúmen do ducto comum (Figura 9.2 a 9.6). Inicialmente foram observados dois ductos lateralizados envolvidos por uma mesma camada muscular a qual se projetava para entre eles (Figura 9.2 e 9.3). Esses ductos se caracterizaram por apresentar invaginações e microvilosidades, além de serem formados por células pseudoestratificadas com núcleo alongado bem marcado. Na região da espermateca (Figura 9.3) ocorreu um aumento da região entre os ductos laterais e, em fêmeas copuladas, é possível observar espermatozoides e no interior do ducto comum (Figura 10.1). Após a espermateca, a região muscular central foi reduzindo até desaparecer e dos ductos laterais se fundirem gerando o lúmen do oviduto comum (Figura 9.4 a 9.6).

A bursa copulatória possui um formato periforme (Figura 9.7), com epitélio simples formado por células cúbicas de núcleo bem marcado. Seu lúmen é repleto de secreções e, em fêmeas recém copuladas, há um elevado número de feixes de espermatozoides, entretanto por conta da elevada quantidade de secreções, não foi possível identificar espermatozoides nos cortes histológicos da bursa (Figura 9.8 e 10.2), diferente da espermateca onde foi observado espermatozoides livres (Figura 10.1). A glândula coleterial tem epitélio simples composto por células cúbicas de núcleo arredondado com cromatina descondensada e, em seu lúmen, há vesículas com secreções (Figura 10.4).

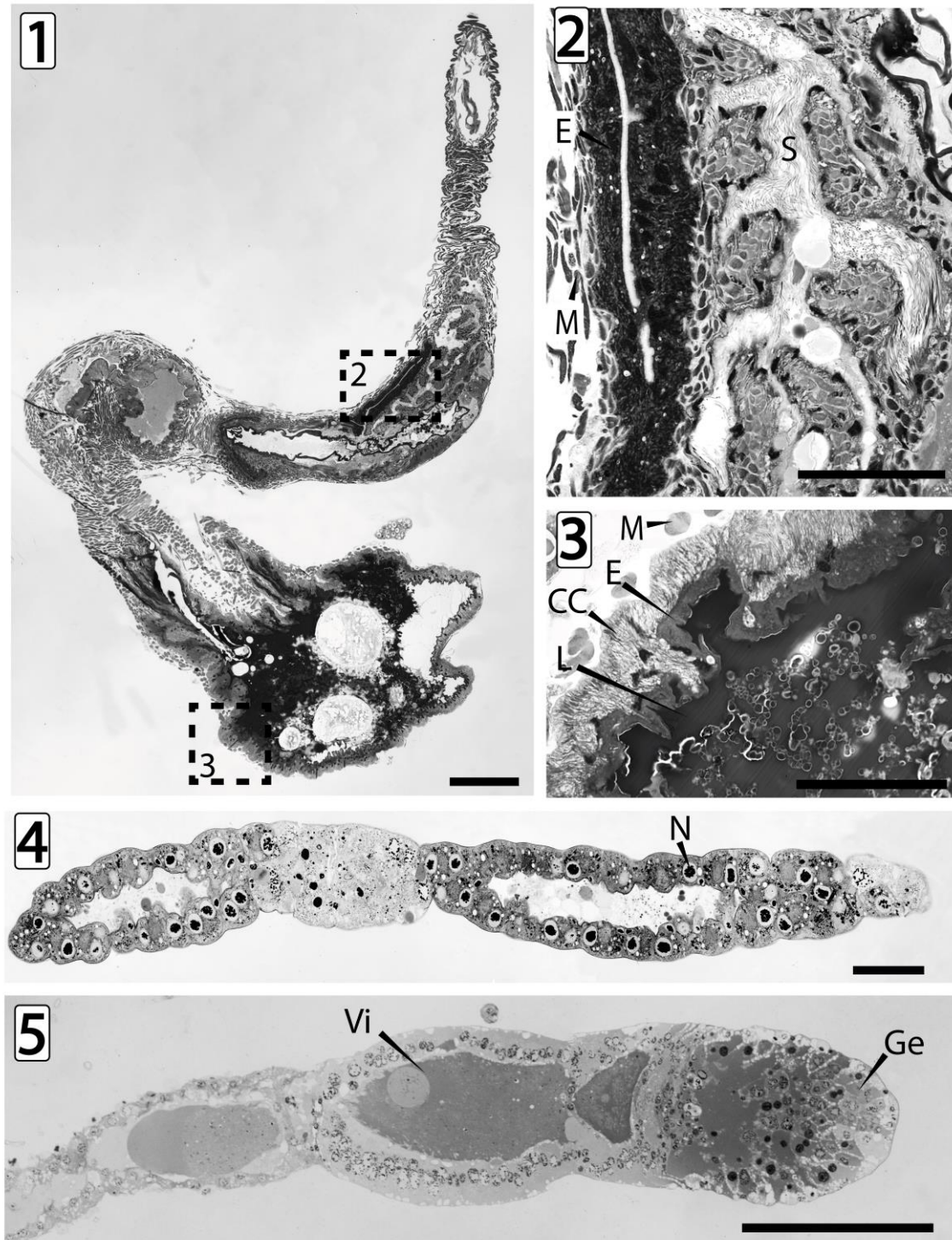
Figura 12 – Sistema reprodutor feminino de *V. ruficauda*. 1- Sistema reprodutor em montagem total, nele os números indicam os planos de cortes das figuras 2 a 6. 2 a 6- Cortes transversais da região enumerada na figura

mostrando progressivamente a fusão dos dois ductos laterais ao oviduto comum. S- espermatozoides; MV- microvilosidades; E- epitélio; M- músculo; Barras de escala: 1 = 2 cm; 2 a 6 = 60  $\mu$ m.



Fonte: Autoria própria

Figura 13 – Sistema reprodutor feminino da espécie *V. ruficauda* em cortes longitudinais. 1- Corte longitudinal mostrando as diferentes regiões ao longo do oviduto comum e da burça. 2 e 3- Detalhes da espermateca na região do oviduto comum e da bursa copulatória, respectivamente. 4 e 5- Glândula coleterial e um ovariolo, respectivamente. S- espermatozoide; N- núcleo; E- epitélio; M- músculo; CC- cápsula conjuntiva; L- lúmen; Vi- vitelário; Ge- germário. Barras de escala: 1, 2 e 4 = 60 µm; 3 e 5 = 200 µm.



Fonte: Autoria própria

## 6.5. MORFOMETRIA E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES

Indivíduos da espécie com diferentes padrões de cores apresentaram variações no tamanho dos espermatozoides, sendo observado espermatozoides maiores nos indivíduos de cor azul. Na morfologia dos espermatozoides de *V. ruficauda*, identificou-se que o flagelo pode ser dividido em duas porções (Figura 11.1 e 11.2), sendo a primeira uma região mais grossa, formada provavelmente por um par de derivados mitocondriais e um axonema (as vezes se separam nas preparações), e uma região fina formada provavelmente apenas pelo axonema. Nas vesículas seminais, os espermatozoides foram encontrados, nas duas variações de cor de *V. ruficauda*, em feixes do tipo espermatozeugmata, nos qual os espermatozoides são aderidos ao espermatóstilo (haste proteica) pela região do acrossomo (Figura 11.5 e 11.6).

Quanto a morfometria, observando os gráficos iniciais, não foram encontradas diferença significativas no comprimento e morfologia dos núcleos espermáticos entre as duas variações (Figura 11.3 e 11.4) (Gráfico 2). Contudo, no comprimento total, espermatozoides foram mais longos nos indivíduos de cor azul (Tabela 1). Nestes o acrossomo mediu 3,60  $\mu\text{m}$ , o núcleo 28,0  $\mu\text{m}$ , a primeira porção do flagelo 147,0  $\mu\text{m}$ , a segunda 86,2  $\mu\text{m}$  e o comprimento total 265,0  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Os espermatozoides da variação verde tiveram em média o acrossomo com 3,83  $\mu\text{m}$ , o núcleo com 25,6  $\mu\text{m}$ , a primeira porção do flagelo com 140,0  $\mu\text{m}$ , a segunda com 56,1  $\mu\text{m}$  e o comprimento total de 226,0  $\mu\text{m}$  (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística Descritiva das medidas (em  $\mu\text{m}$ ) dos espermatozoides e suas partes das variações verde e azul de *V. ruficauda*.

|               | Varição | Acrossomo | Núcleo | Flagelo 1 | Flagelo 2 | Total |
|---------------|---------|-----------|--------|-----------|-----------|-------|
| Média         | verde   | 3.83      | 25.6   | 140       | 56.1      | 226   |
|               | azul    | 3.60      | 28.0   | 147       | 86.2      | 265   |
| Mediana       | verde   | 3.65      | 25.4   | 140       | 56.1      | 228   |
|               | azul    | 3.47      | 28.0   | 147       | 86.4      | 263   |
| Desvio-padrão | verde   | 1.05      | 1.26   | 6.46      | 8.11      | 11.4  |
|               | azul    | 0.991     | 0.936  | 3.21      | 4.83      | 6.67  |
| Mínimo        | verde   | 2.32      | 23.4   | 129       | 38.3      | 202   |
|               | azul    | 2.01      | 26.3   | 142       | 78.3      | 254   |
| Máximo        | verde   | 6.30      | 28.5   | 155       | 73.2      | 242   |
|               | azul    | 5.82      | 30.3   | 154       | 94.9      | 277   |

Fonte: Autoria própria

Foi realizado teste de normalidade para definir qual análise utilizar. Apenas as medidas do flagelo 2 houve resultado positivo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2), sendo assim foi realizado teste t para analisar as amostras com resultado positivo para o teste de normalidade e teste de Mann-Whitney para amostras com resultado negativo, verificando assim, se havia diferença estatística entre o tamanho das estruturas dos espermatozoides das variações de *V. ruficauda*. Não foi encontrada diferença estatística entre as medidas do acrossomo das duas variações ( $p > 0,05$ ). Entretanto, foi observado um retorno positivo para a hipótese de as estruturas serem diferentes no núcleo, primeira porção do flagelo, segunda porção do flagelo e para o tamanho total ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 2. Teste à Normalidade (Shapiro-Wilk)

|           | <b>W</b> | <b>p</b> |
|-----------|----------|----------|
| Acrossomo | 0.957    | 0.002    |
| Núcleo    | 0.981    | < .001   |
| Flagelo 1 | 0.974    | 0.045    |
| Flagelo 2 | 0.994    | 0.961    |
| Total     | 0.965    | 0.010    |

Fonte: Autoria própria

Tabela 3. Teste t comparando as medidas dos espermatozoides das variações verde e azul de *V. ruficauda*.

|               |                   | <b>Estatística</b>  | <b>gl</b> | <b>p</b> |
|---------------|-------------------|---------------------|-----------|----------|
| Acrossomo     | t de Student      | 1.12                | 98.0      | 0.264    |
|               | t de Welch        | 1.12                | 97.6      | 0.264    |
|               | U de Mann-Whitney | 1096                |           | 0.290    |
| Núcleo        | t de Student      | -26.19 <sup>a</sup> | 598.0     | < .001   |
|               | t de Welch        | -26.19              | 553.0     | < .001   |
|               | U de Mann-Whitney | 6866                |           | < .001   |
| Flagelo 1     | t de Student      | -7.25 <sup>a</sup>  | 98.0      | < .001   |
|               | t de Welch        | -7.25               | 71.8      | < .001   |
|               | U de Mann-Whitney | 396                 |           | < .001   |
| Flagelo 2     | t de Student      | -21.73 <sup>a</sup> | 93.0      | < .001   |
|               | t de Welch        | -22.28              | 81.2      | < .001   |
|               | U de Mann-Whitney | 0                   |           | < .001   |
| Tamanho total | t de Student      | -20.61 <sup>a</sup> | 98.0      | < .001   |
|               | t de Welch        | -20.61              | 79.2      | < .001   |
|               | U de Mann-Whitney | 0                   |           | < .001   |

Fonte: Autoria própria

Foi realizado o teste à homogeneidade de variâncias (ou teste de Levene) (Tabela 4) para avaliar se as diferenças obtidas nas variâncias poderiam ser ocasionadas por uma amostragem aleatória de uma mesma população. Foi observado um p de valor menor que 0,05 para as amostragens do núcleo, primeira porção do flagelo, segunda porção do flagelo e para o tamanho total dos espermatozoides, demonstrando que a hipótese de que são variâncias iguais deve ser rejeitada e que as medidas foram realizadas em duas populações distintas.

Tabela 4. Teste à Homogeneidade de Variâncias das medidas dos espermatozoides das variações verde e azul de *V. ruficauda*. (Levene)

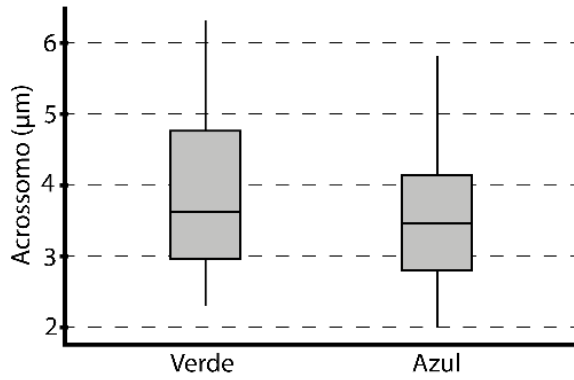
|           | <b>F</b> | <b>gl</b> | <b>gl2</b> | <b>p</b> |
|-----------|----------|-----------|------------|----------|
| Acrossomo | 1.23     | 1         | 98         | 0.271    |
| Núcleo    | 32.01    | 1         | 598        | < .001   |
| Flagelo 1 | 17.66    | 1         | 98         | < .001   |
| Flagelo 2 | 10.45    | 1         | 93         | 0.002    |
| Total     | 17.07    | 1         | 98         | < .001   |

Fonte: Autoria própria

Apesar de ter sido encontrada diferença estatística entre os valores do núcleo, da primeira e segunda porções do flagelo e do comprimento total, analisando os gráficos com todas as comparações foi possível perceber que somente os valores para a medida da segunda porção do flagelo (Gráfico 4) e do comprimento total dos espermatozoides (Gráfico 5) se mantiveram sem que ocorresse sobreposição entre a medida obtida pelo indivíduo da variação verde e da azul.

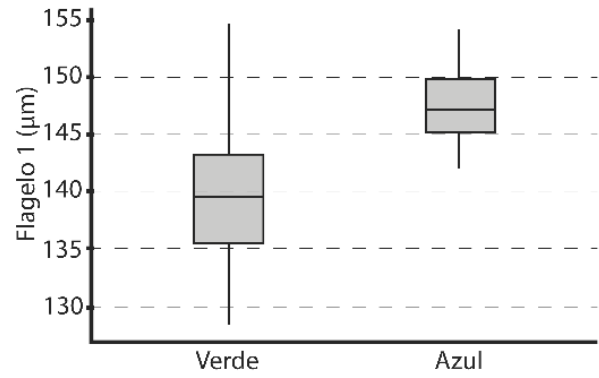
Nas comparações das medidas no núcleo (Gráfico 2) e da primeira porção do flagelo (Gráfico 3), apesar de não ocorrer sobreposição nas medidas entre o primeiro e terceiro quartil, houve sobreposição do limite superior das medidas dos indivíduos da variação verde com o limite inferior dos indivíduos da variação azul. Entretanto, ao analisar esses gráficos com intervalos de confiança de 95% (Gráfico 6 e 7), representando os testes estatísticos realizados, não ocorre sobreposição entre essas medidas, diferentemente da comparação entre as medidas do acrossomo onde houve sobreposição em todas as análises estatísticas e gráficas (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Medida do Acrossomo



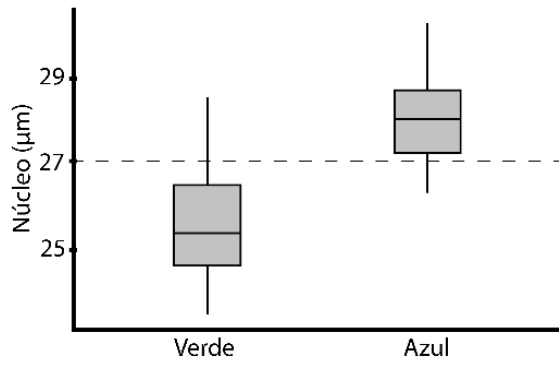
Fonte: Autoria própria

Gráfico 3 – Medida do Flagelo 1



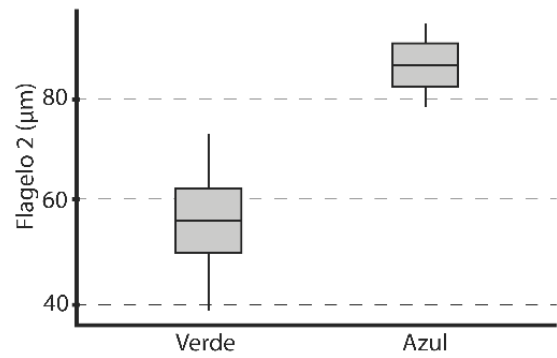
Fonte: Autoria própria

Gráfico 2 - Medida do Núcleo



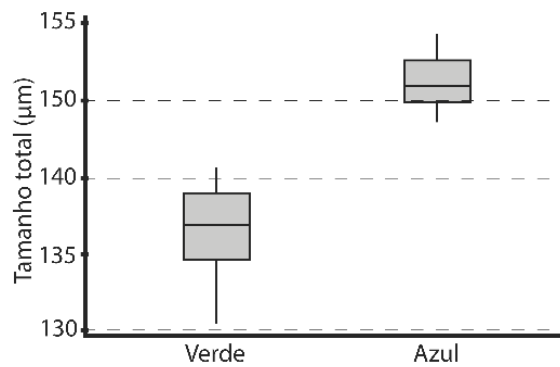
Fonte: Autoria própria

Gráfico 4 – Medida do Flagelo 2



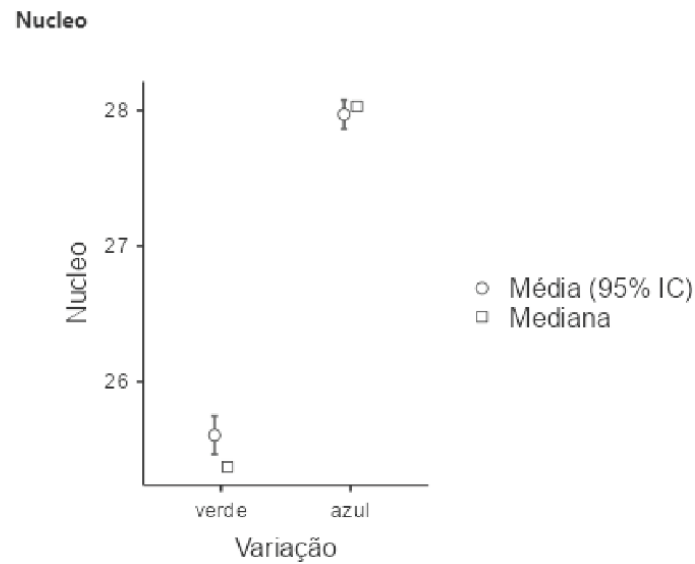
Fonte: Autoria própria

Gráfico 5 – Medida do Tamanho total



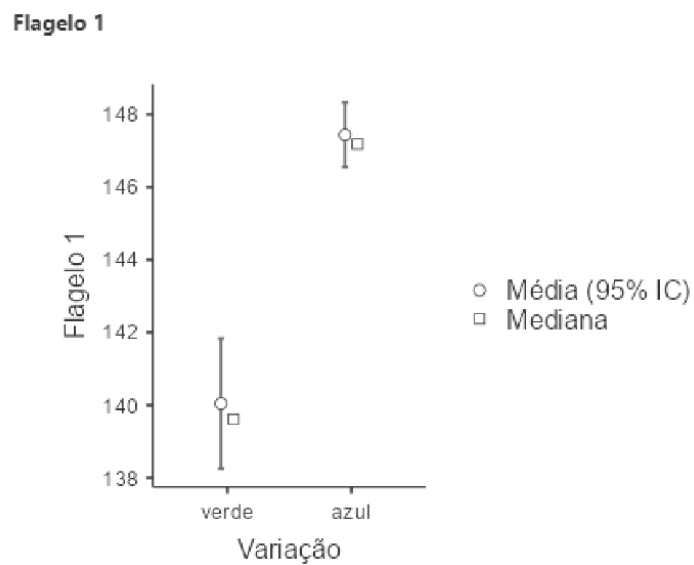
Fonte: Autoria própria

Gráfico 6 – Medida do Núcleo com intervalo de confiança de 95%



Fonte: Autoria própria

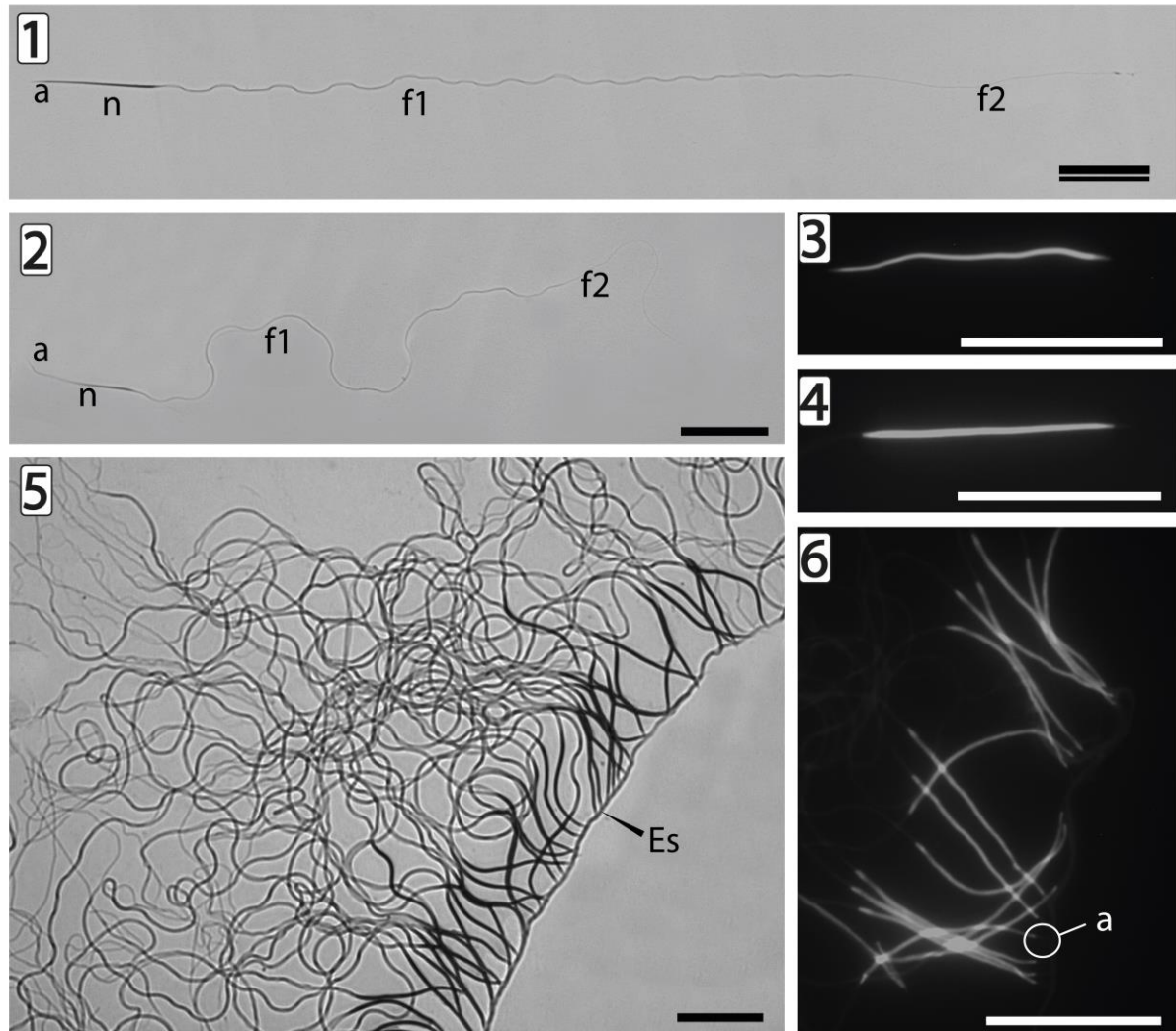
Gráfico 7 - Medida do Flagelo 1 com intervalo de confiança de 95%



Fonte: Autoria própria

Figura 14 – Espermatozoides da variação azul (1, 3) e verde (2, 4 a 6) de *V. ruficauda*. 1 e 2 Espermatozoides corados com Giemsa mostrando as regiões do acrossomo (a), núcleo (n) e as duas porções do flagelo (F1 e F2). 3

e 4- Núcleos corados com DAPI. 5- Feixe do tipo espermatzeugmata mostrando os espermatozoides associados ao espermatóstilo pela região do acrossomo. 6- Detalhe do feixe de espermatozoides corados com DAPI. a- acrossomo; n- núcleo; f1 e f2- primeira e segunda regiões do flagelo, respectivamente; Es- espermatóstilo. Barras de escala: 1, 2, 5 e 6 = 60  $\mu$ m; 2 e 3 = 20  $\mu$ m.



Fonte: Autoria própria

## 7. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi analisado se existe evidências para corroborar a hipótese de que as variações cromáticas dentro de *V. ruficauda* podem representar duas espécies distintas, dito isso, foi encontrado diferença na paráfise da genitália masculina e na morfometria espermática entre as duas variações. Além disso foi realizada a descrição histológica e a comparação dos resultados da morfometria espermática da espécie estudada com outras espécies da família cicadellidae encontradas em trabalhos já publicados.

As estruturas da genitália masculina costumam ser muito diversas e específicas para cada espécie, tendo pequenas diferenças até em espécies muito próximas (Gullan & Cranston 2017). Essas pequenas diferenças as vezes são passadas despercebidas, levando a erros de identificação. Acredita-se que por serem semelhantes, a diferença na genitália masculina de *V. ruficauda* verde e azul, encontrada nesse trabalho, possa ter passado despercebida.

Algo que pode ser utilizado para a confirmação de que indivíduos são de espécies diferentes é a morfometria espermática, o que já foi comprovada em diversos trabalhos que possui características específicas para cada espécie, (Rezende *et al* 2019; Dias *et al* 2020; Dalai *et al* 2016).

O sistema reprodutor masculino e feminino das duas variações de *V. ruficauda* foram semelhantes àqueles observados em outras espécies de Cicadellidae. Entretanto, há diferenças entre espécies quanto a posição da espermateca e bursa copulatória nas fêmeas e quanto a presença ou ausência de um bulbo ejaculatório nos machos.

De modo geral, a morfologia do sistema reprodutor dos Cicadellidae é bastante conservada, não observamos diferenças entre *V. ruficauda* e as demais espécies da família já estudadas (Gil-Fernandez & Black 1965; Cheung 1994; Cheung 1995; Tsai & Perrier 1996; Hayashi & Kamimura 2002; Hummel 2006; Vitale 2015; Pappalardo 2016; Vitale 2016; Zhang 2016), da mesma forma que não se teve diferença entre indivíduos da cor azul e os indivíduos da cor verde. Entretanto, houve uma variação no número de folículos testiculares quando comparado *V. ruficauda* com outras espécies estudadas nos trabalhos acima.

O número de folículos testiculares em Cicadomorpha variam de quatro em algumas espécies de Membracoidea (Golub 2014), até mais de 100 em algumas espécies de Cicadoidea (Moulds 2005; Andrade 2015; Andrade 2017). Entretanto, na maioria dos insetos o mais comum é entre quatro e dez folículos testiculares, como ocorrem em Aetalionidae e Membracidae (Kuznetsova & Kirillova 1993; Kuznetsova 2019; Araújo *et al.* 2020; Golub 2014 apud Kuznetsova 2015). Em Cicadellidae o número de folículos costuma variar de cinco até 13 por testículo, (Gil-Fernandez & Black 1965; Cheung 1994; Cheung 1995; Tsai & Perrier 1996; Hayashi & Kamimura 2002; Hummel 2006; Vitale *et al.* 2015; Pappalardo *et al.* 2016; Vitale *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016), podendo ser utilizados para diferenciar superfamílias, entretanto, foi observado que não é uma ferramenta útil para a diferenciação de espécies dentro de Cicadellidae.

Assim como em *A. constricta*, *G. nigrifrons*, *D. maidis*, *B. brevis* e *C. viridis*, foram observados seis folículos testiculares por testículo em *V. ruficauda*. Diferente do encontrado em *B. ferrugínea*, 11 a 13 folículos, em *K. paulula*, cinco folículos, e em *C. spectra*, 3 folículos, demonstrando que ocorre igualdade no número de folículos testiculares em diferentes subfamílias (Gil-Fernandez & Black 1965; Cheung 1994; Cheung 1995; Tsai & Perrier 1996; Hayashi & Kamimura 2002; Hummel 2006; Mishra 1979 apud Vitale *et al* 2015; Vitale 2015; Pappalardo *et al.* 2016; Vitale 2016; Zhang *et al.* 2016).

As vesículas seminais em algumas espécies de Cicadomorpha são fusionadas e em outras são individualizadas (Gil-Fernandez & Black 1965; Tsai & Perrier 1996; Maryańska-Nadachowska 2008; Golub *et al.* 2014; Pappalardo *et al.* 2016; Vitale *et al.* 2016). Diferente do observado na espécie desse estudo, as vesículas seminais do Cicadellidae *A. constricta* (Agalliini) não são fusionadas, mas são apenas na porção distal formando um único ducto ejaculatório (Gil-Fernandez & Black 1965).

Foi observado um par de vesículas fusionadas por uma bainha comum em *B. ferrugínea* (Hayashi & Kamimura 2002), *G. nigrifrons* e *D. maidis* (Tsai & Perrier 1996). Entretanto, em *V. ruficauda* cada vesícula possui sua própria bainha e elas são circundadas por uma camada muscular comum, assim como encontrado em *B. brevis* por Vitale *et al* (2015), não ocorrendo o fusionamento e sim um compartilhamento de uma mesma camada muscular. Zhang *et al?* (2016) descreve que nas espécies *K. paulula* e *C. viridis* as vesículas possuem uma túnica externa e uma camada espessa de bainha muscular.

As secreções produzidas pelas glândulas acessórias possuem um papel muito importante na formação do esperma, produzindo um fluido rico em aminoácidos e lipídeos que podem servir para manter a viabilidade dos espermatozoides e até ajudar na nutrição dos óvulos produzidos pelas fêmeas (Chapman 2012; Beutel 2014). As glândulas são ausentes em apterigotos, aparecem somente um par em Lepidóptera, um ou dois pares em Coleoptera e Hemiptera, e até 15 pares ou mais em Orthoptera (Beutel 2014). De acordo com Moulds (2005), em Cicadidae encontra-se dois tipos de glândulas acessórias, sendo um par de glândulas longas e outro de glândulas curtas. A espécie aqui estudada, apresentou apenas um par e glândulas acessórias, seguindo o encontrado na maioria dos indivíduos de Membracoidea e Cercopoidea (Gil-Fernandez & Black 1965; Tsai & Perrier 1996; Maryanska-Nadachowska *et al* 2008; Golub *et al* 2014; Pappalardo *et al* 2016; Vitale *et al* 2016).

Vitale *et al* (2015) demonstraram que as glândulas acessórias de *B. brevis* exibem duas porções facilmente diferenciadas externamente por sua pigmentação. Apenas em uma dessas porções, da glândula de *B. brevis*, observou-se semelhança no tipo celular encontrado na porção fina da glândula acessória de *V. ruficauda*, indicando que essas porções são funcionalmente correspondentes. Na espécie aqui estudada, três porções são identificáveis externamente, entretanto, a porção condensada só foi possível ser diferenciada quando submetida a solução fixadora Carnoy, possivelmente por coagular as proteínas dessa porção. Zhang *et al* (2016) observou apenas uma região no par de glândulas das espécies *K. paulula* e *C. viridis*.

Considerando que as glândulas acessórias possam apresentar diferentes morfologias, tipos celulares, além de diferentes tipos de como secreções, é possível que, investigando mais espécies, seja demonstrado que essas características das glândulas acessórias possam ser utilizadas como carácter taxonômico. Pois, comparando a anatomia e os tipos celulares epiteliais descrito para *B. brevis* (Vitale *et al* 2015) com os observados na espécie em estudo, nota-se diferenças que separam as duas espécies da mesma família.

Assim como nesse trabalho, Vitale *et al* (2015) encontrou, em *B. brevis*, no ducto ejaculatório lateral, microvilosidades e uma camada muscular circundante maior do que visto nas estruturas anteriores. Nos trabalhos de Tsai & Perrier (1996), Vitale *et al* (2015) e Zhang (2016), foi encontrado na porção final do sistema reprodutor masculino um ducto ejaculatório central ou ducto ejaculatório comum em *D. maidis*, *G. nigrifrons*, *B. brevis*, *V. viridis* e *K. paulula*, entretanto, nesse trabalho observou-se através dos cortes histológicos a alta concentração de feixes musculares nessa região, caracterizando a porção final do sistema reprodutor masculino da espécie desse trabalho como bulbo ejaculatório. Em seus trabalhos, Tsai & Perrier (1996), Vitale *et al* (2015) e Zhang *et al* (2016) não examinaram a anatomia interna do que eles chamaram de ducto ejaculatório comum.

Em Cicadellidae foram descritos os sistemas reprodutores femininos de seis espécies (Gil-Fernandez & Black 1965; Tsai & Perrier 1996; Hayashi & Kamimura 2002; Hummel *et al* 2006; Pappalardo *et al* 2016). Assim como em *V. ruficauda*, em *A. constricta*, *D. maidis*, *G. nigrifrons* e *B. brevis*, cada ovário é formado por seis ovariólos do tipo meroístico, isso é, possuem um grupamento de células germinativas no ápice do ovariolo, e são formados por um filamento terminal, germário, vitelário e um pedicelo (Gil-Fernandez & Black 1965; Tsai & Perrier 1996; Pappalardo *et al* 2016). Em *H. coagulata* é observado a presença de oito a 10 ovariólos telotróficos nas fêmeas (Hummel *et al* 2006). Tsai & Perrier (1996) relatam a importância taxonômica dos ovariólos, indicando que os sistemas reprodutores femininos se

diferenciam principalmente por essa estrutura, entretanto, foi observado comparando o resultado obtido nesse trabalho com outros já publicados que ocorre variação na presença ou não de bursa copulatória, glândulas acessórias, localização da espermateca e o fusionamento ou não da espermateca.

Em *A. constricta*, *D. maidis* e *G. nigrifrons*, a espermateca abre-se na parte anterior da câmara genital, estando assim associada e não fusionada ao oviduto comum como em *V. ruficauda*, *H. coagulata* (Hummel *et al* 2006) e *B. Ferruginea* (Hayashi & Kamimura 2002), possui um formato semelhante a uma gota. Em insetos jovens, sua visualização é difícil, uma vez que se encontra vazia e fortemente colada à parede do oviduto, já uma vez copuladas, seu tamanho aumenta, mantendo-se ligada ao oviduto, exceto na região anterior. (Gil-Fernandez & Black 1965; Tsai & Perrier 1996). Diferentemente das espécies anteriores, em *B. brevis* (Pappalardo *et al* 2016) foi observado um receptáculo genital (ou bursa copulatória) ligado a um ducto, descrito como espermateca, que o conecta ao oviduto comum.

Em *H. coagulata* (Hummel *et al* 2006), *B. ferrugínea* (Hayashi & Kamimura 2002) e *B. brevis* (Pappalardo *et al* 2016), assim como em *V. ruficauda*, foi observado uma bursa copulatória, entretanto, em *H. coagulata* foi observado que a bursa é formada por quatro compartimentos, diferente da espécie deste trabalho e das outras citadas onde, quando observado, só foi encontrado um único compartimento. Apenas em *B. ferrugínea* (Hayashi & Kamimura 2002) foi encontrado espermátóforo dentro da bursa copulatória.

Em *A. constricta* ocorre a presença de duas glândulas acessórias de finos tubos, abrindo-se para a câmara genital na região ventral, enquanto em *D. maidis* e *G. nigrifrons* ocorre a presença de dois tipos de glândulas, as coleteriais e as acessórias, que, junto à vagina, estão ligadas à abertura do ovipositor, sendo observado em *V. ruficauda* apenas uma glândula coleterial (Gil-Fernandez & Black 1965; Tsai & Perrier 1996). Em *D. maidis* e *G. nigrifrons* (Tsai & Perrier 1996) a glândula coleterial é longa e tubular podendo estender-se até o tórax do animal, assim como em *A. constricta* (Gil-Fernandez & Black 1965) e diferente de *V. ruficauda*, que se estende apenas até a bursa copulatória. A glândula acessória em *D. maidis* e *G. nigrifrons* (Tsai & Perrier 1996) é pequena, de aparência translúcida e tubular, originando-se de dentro da parede vaginal, inicialmente como uma única estrutura, que se dividem em dois dutos. Em *H. coagulata* (Hummel *et al* 2006) é destacado a presença de uma glândula acessória e um par de glândulas semelhantes a um colar de pérolas que se abrem na câmara genital.

Espermatozoides em feixe do tipo espermatozeugmata, como ocorrem em *V. ruficauda*, também foram observados em *B. ferruginea* (Hayashi & Kamimura 2002) e *B. incisa* (de Bailey & Nuhardiyati 2005). Os espermatozoides de *C. viridis*, *K. paulula*, *E. nanus* e *P. striatus* foram

encontrados também em feixe, mas do tipo espermatodesmata (Zhang *et al* 2016; Su 2014). Vitale *et al* (2016) relatam que os feixes espermáticos *B. brevis* são formados nos cistos foliculares, são desorganizados nos ductos ejaculatórios laterais e transferidos de forma livre. Em *B. ferruginea* foi descrito que a transferência dos espermatozoides para a fêmea durante a cópula é feita em espermatóforos. Na espécie em estudo não se observou feixes de espermatozoides na espermateca e nem no oviduto comum das fêmeas, sugerindo que esse material é consumido na bursa copulatória, assim como observado em *A. constricta* (Gil-Fernandez & Black 1965).

Diferente dos espermatozoides da espécie aqui estudada, nos Deltocephalinae *B. brevis* (Vitale *et al* 2016) e *D. maidis* (Barcelos *et al* 2018), a extremidade final do flagelo é dividida em quatro ramos curtos (~ 10 e 15  $\mu\text{m}$  de comprimento, respectivamente). Mais estudos poderão demonstrar que essa será uma característica taxonômica importante, por exemplo, em nível de subfamília.

Foi encontrado na literatura a morfometria para espécies das subfamílias Cicadellinae e Deltocephalinae (Tabela 5). Na subfamília Cicadellinae, além da espécie desse estudo, foi encontrado a medida do espermatozoide de *C. viridis* (Zhang *et al* 2016). Na subfamília Deltocephalinae foram encontradas as medidas dos espermatozoides de *B. brevis*, *B. incisa*, *D. maidis*, *E. nanus* e *P. striatus*. Na subfamília Cicadellinae foi observado pouca diferença no tamanho do núcleo, entretanto, houve grandes variações no tamanho total do espermatozoide (135 $\mu\text{m}$  à 265 $\mu\text{m}$ ), demonstrando que o comprimento do flagelo e do núcleo são caracteres distintos. Na subfamília Deltocephalinae o comprimento dos espermatozoides varia de 95  $\mu\text{m}$  a 270  $\mu\text{m}$  e os núcleos de 14  $\mu\text{m}$  a 42  $\mu\text{m}$ , considerando as medidas mais recentes para *D. maidis* (Tabela 5). Ao se comparar as medidas encontradas nas duas subfamílias (Tabela 5), é observado que as medidas dos dois Cicadellinae (*C. viridis* e *V. Ruficauda*) estão entre aqueles dos Deltocephalinae, indicando que os comprimentos dos espermatozoides variam muito, mesmo entre espécies próximas, portanto o comprimento dessas células pode separar espécies que as vezes outros caracteres não o fazem. Como observado na tabela 5, *P. striatus* tem espermatozoides com 156  $\mu\text{m}$  e núcleo com 30  $\mu\text{m}$ , tendo mesmo comprimento de núcleo que *V. ruficauda* (verde), que tem espermatozoides bem mais longos.

Tabela 5. Morfometria espermática de espécies da família Cicadellidae

| Espécie                               | Tamanho total do espermatozoide ( $\mu\text{m}$ ) | Tamanho do núcleo ( $\mu\text{m}$ ) | Autor                         |
|---------------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------|
| Subfamília Cicadellinae               |   |                                     |                               |
| <i>Cicadella viridis</i>              | 135   | 34                                  | Zhang <i>et al</i> (2012)     |
| <i>Versigonalia ruficauda</i> (azul)  | 265   | 32                                  | Este estudo                   |
| <i>Versigonalia ruficauda</i> (verde) | 226   | 30                                  | Este estudo                   |
| Subfamília Deltocephalinae            |   |                                     |                               |
| <i>Balclutha brevis</i>               | 125   | 20                                  | Vitale <i>et al</i> (2016)    |
| <i>Balclutha incisa</i>               | 95  | 14                                  | Bailey & Nuhardiyati (2005)   |
| <i>Dalbulus maidis</i>                | 122   | 23                                  | Barcellos <i>et al</i> (2018) |
| <i>Dalbulus maidis</i>                | 300   | 50                                  | Cruz-Landim & Kitajima (1972) |
| <i>Exitianus nanus</i>                | 270   | 42                                  | Su <i>et al</i> (2014)        |
| <i>Psammotettix striatus</i>          | 156   | 30                                  | Su <i>et al</i> (2014)        |

Fonte: Autoria própria

Os autores desses estudos acordam com Zhang *et al* (2012) que ainda é necessário estudar um número maior, e que seja representativo, de espécies para que seja viável a utilização da morfologia e morfometria espermática para auxiliar na taxonomia e identificações das espécies. Todavia, com as medidas já disponíveis, é possível observar que essas células podem ser utilizadas para diferenciar as espécies.

## 8. CONCLUSÃO

As diferenças encontradas na genitália e na morfometria espermática entre indivíduos azuis e indivíduos verdes de *V. ruficauda* sugerem fortemente que essa variação de cor na verdade seja referente a duas espécies distintas. Ainda, analisando a descrição feita por Young (1977) e Camisão (2014), é possível ver que o nome *Versigonalia ruficauda* seja apenas da variação verde, entretanto é necessário realizar análise do material tipo em coleções para que seja confirmado o indivíduo utilizado pelo padrão de cor e pelo formato da paráfise.

Não foi encontrado espermatozoides da medida referente aos indivíduos de coloração verde em fêmeas da variação azul e vice-versa, entretanto os indivíduos não foram encontrados coabitando um mesmo local e em tentativas de criação não foi observado cópula entre indivíduos de variações de cor diferentes. É necessário analisar se em regiões onde ocorra a coabitação dessas duas variações ocorre cópula cruzada entre os indivíduos de diferentes populações.

As análises histológicas mostraram que conhecer a morfologia dos sistemas reprodutores de machos e fêmeas, que ainda é muito escasso na família Cicadellidae, pode oferecer um bom conjunto de informações entre as espécies do grupo e auxiliar na identificação. Mesmo a partir dos poucos trabalhos disponíveis, já é possível observar que há diferenças significativas, especialmente nas vesículas seminais (machos), glândulas acessórias (machos e fêmeas) e bursa copulatória (fêmeas), que podem contribuir nos estudos de taxonomia, filogenia e biologia reprodutiva desse importante grupo de insetos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarracin, E.L., Virla, E.G., Ordano, M. (2021) Influence of the site of oviposition on the level of egg parasitism in the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* [online], 93(1).

Ammar, E.D. (1985) Internal morphology and ultrastructure of leafhoppers and planthoppers. In: Nault, L.R., Rodriguez, J.G. (Eds.), *The Leafhoppers and Planthoppers*. Wiley, New York, pp. 127–162

Andrade, S.C. (2015) Aspectos morfológicos dos aparelhos reprodutores, maturação de ovários e avaliação do desenvolvimento de ninfas de *Quesada gigas* (Olivier, 1790) (Hemiptera: Cicadidae) em relação a diferentes hospedeiros. vii, 62 p.

Andrade, S.C., Martinelli, N.M., Rossi, G.D., Andrade, D.J. (2017) Giant Cicada Emergence, Protandry and Chorus Centers Formation as Revealed by Studies Using a Sound Trap. *Journal of Insect Behavior*, 30(3), 300–307.

Araújo, V.A., Bacca, T., Gomes-Dias, L. (2020) Estructura histológica del sistema reproductor masculino de la cigarrita *Aethalium reticulatum* (Hemiptera: Aethalionidae). *Boletim Científico Do Centro De Museus Da Universidade De Caldas, Manizales*, 24( 2), 127–137.

Assis, D.P., Oliveira, I.S., Miranda, M.P., Azevedo Filho, W.S., Melo, R.L., Barbosa, C. J., Nascimento, A.S. (2019). Atratividade a cigarrinhas de xilema (Hemiptera: Cicadellidae) por plantas de boldo (*Vernonia condensata* Becker), em pomar de laranja 'Pera'. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, BA. Brasil*.

Azevedo, R.L., Lima, M.F. (2015). Cigarrinhas dos Citros, Vectors da Bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al.: Pragas Potenciais para a Citricultura Sergipana. *EntomoBrasilis*, 8(1), 01–07.

Bailey, W., & Nuhardiyati, M. (2005). Copulation, the dynamics of sperm transfer and female refractoriness in the leafhopper *Balclutha incisa* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Physiological Entomology*, 30(4), 343–352.

Baldi, P., & La Porta, N. (2017). *Xylella fastidiosa*: Host Range and Advance in Molecular Identification Techniques. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Barcellos, M.S., Dias G, Lino-Neto J. (2018) Re-description of the sperm morphology of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Tissue Cell*, 51, 56–61.

Beutel, R. G. (2013) *Insect Morphology and Phylogeny: A textbook for students of entomology*.

Bhowmick, T. S., Das, M., Heinz, K. M., Krauter, P. C., and Gonzalez, C. F. (2016). Transmission of phage by glassy-winged sharpshooters, a vector of *Xylella fastidiosa*. *Bacteriophage*, 6:e1218411.

- Boulard, M. (1973) Classification raisonnee des *Platypleures africaines* (Homoptera-Cicadidae). Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 3(90), 2.
- Brusca, R.C.; Moore W. & Shuster, S.M. (2018). Invertebrados. 3a edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 1010pp.
- Büning J. (1994) The ovary of Ectognatha, the Insecta s. str. In: The Insect Ovary. Springer, Dordrecht.
- Cabral, M. J., & Pinheiro, R. A. (2021). Bioatividade do óleo de Neem em adultos de Cigarrinha *Empoasca kraemeri* (Hemiptera: Cicadellidae). Diversitas Journal, 6(2), 1910–1919
- Camisão, Beatriz M. and Takiya, Daniela M. (2014) On the sharpshooter *Versigonalia* (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellini): *Versigonalia lentiginosa* nom. nov., redescription of *V. vermiculata* comb. nov., and key to species of the genus. Zoologia (Curitiba) [online], 31(4).
- Chapman, R.F. (1998) The Insects: structure and function. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cheung, W.W.K. (1994). Ultrastructural Studies on the Female Reproductive System of the Leafhopper *Euscelidium variegatus* Kirshbaum (Homoptera: Cicadellidae) I. The germarium. CYTOLOGIA, 59(1), 93–101.
- Cheung, W.W.K. (1995). Ultrastructural Studies on the Female Reproductive System of the Leafhopper *Euscelidium variegatus* Kirshbaum (Homoptera: Cicadellidae) II. The vitellarium oocytes and follicular epithelium. Cytologia, 60, 395–405.
- Coelho, L.B.N., Da-Silva, E.R., Ferreira, P.S.F. (2016) Two new species of genus *Joruma* McAtee (Hemiptera: Cicadellidae: Typhlocybinae) from Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. Zootaxa (Online), 4162, 304–312.
- Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W. (1972) The ultrastructure of male spermatozoa of corn leafhopper *Dalbulus maidis* Del. and W. (Homoptera: Cicadellidae). Journal of submicroscopic cytology. 4, 75–82.
- Cryan, J.R., Svenson, G.J. (2010) Family-level relationships of the spittlebugs and froghoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Cercopoidea). Systematic entomology, 35, 393–415.
- Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R. (2016) Structure and Evolution of Insect Sperm: New Interpretations in the Age of Phylogenomics. Annual Review of Entomology, 61, 1–23.
- Deitz, L.L., Dietrich, C.H. (1993) Superfamily Membracoidea (Homoptera: Auchenorrhyncha). I. Introduction and revised classification with new family-group taxa. Systematic Entomology, 18(4), 287–296.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Dallai, R., Mercati, D., Lupetti, P. (2020) Sperm ultrastructure of three species of ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). Arthropod Structure & Development, 55, 100919.
- Dietrich, C.H., Wallner, A.M. (2002) Diversity and taxonomic composition of Cicadellidae in the Amazonian rainforest canopy (Hemiptera, Cicadomorpha, Membracoidea). In: 11th International Auchenorrhyncha Congress. Abstracts.

Dietrich, C.H. (2005) “Keys to the Families of Cicadomorpha and Subfamilies and Tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha).” *The Florida Entomologist*, vol. 88, no. 4, Florida Entomological Society, pp. 502–17,

Evangelista, O., Sakakibara, A.M., Cryan, J.R., Urban, J. (2017) A phylogeny of the treehopper subfamily Heteronotinae reveals convergent pronotal traits (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Membracidae). *Systematic Entomology*. 42, 410–428.

Folliot, R., Maillet, P.L., (1970) Ultrastructure de la spermiogenese et du spermatozoïde de divers insects Homopteres. In: Baccetti, B. (Ed.), *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, pp. 289–300.

Fox, J., Weisberg, S. (2020) *car: Companion to Applied Regression*. [R package]. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=car>.

Gil-Fernandez, C., Black, L.M. (1965) Some aspects of the internal anatomy of the leafhopper *Agillia constricta* (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 58(3), 275–84.

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

Grimaldi, D.A.; Engel, M. S. (2005) *Evolution of the insects*. Cambridge [U.K.]; New York: Cambridge University Press.

Gullan, P.J., Cranston, P.S. (2017) Figura recortada do Cladograma das relações postuladas dentro de Hemiptera. 2017. Disponível em: Gullan, P.J & Cranston, P.S. *Insetos: Fundamentos da Entomologia*. 5. Ed. – Rio de Janeiro: Roca.

Gullan, P.J., Cranston, P.S. (2017) *Insetos: fundamentos da entomologia*. 5. Ed. – Rio de Janeiro: Roca.

Hayashi, F., Kamimura, Y. (2002) The potential for incorporation of male derived proteins into developing eggs in the leafhopper *Bothrogonia ferruginea*. *Journal of Insect Physiology*. 48(2),153–159.

Hodin, J., Whitman, D.W., Ananthkrishnan, T. (2009). She shapes events as they come: plasticity in female insect reproduction.

Hummel, N., Zalom, F., Peng, C. (2006) Anatomy and Histology of Reproductive Organs of Female *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae: Proconiini), with Special Emphasis on Categorization of Vitellogenic Oocytes. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 920–932.

Janse, J. D., Obradovic, A. (2010) *Xylella fastidiosa*. Its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*. 92, S35–S48.

Kuznetsova, V., Aguin-Pombo, D. (2015) Comparative cytogenetics of Auchenorrhyncha (Hemiptera, Homoptera): a review. In: Lukhtanov VA, Kuznetsova VG, Grozeva S, Golub NV (Eds) *Genetic and cytogenetic structure of biological diversity in insects*. *ZooKeys*, 538, 63–93.

Kuznetsova, V.G., Kirilova, V.I. (1993) Karyotype and male internal reproductive system of *Aetalion reticulatum* L. (Aetalionidae, Cicadelloidea, Cicadina): phylogenetic aspect. *Beitrage zur Entomologie*, 43, 119–122.

Kuznetsova, V.G., Maryńska-Nadachowska, A., Khabiev, G.N., Karagyan, G., Krivokhatsky, V.A. (2019). Variation in the number of testicular follicles and ovarioles among 18 lacewing species of the families Myrmeleontidae, Ascalaphidae, and Nemopteridae (Insecta, Neuroptera, Myrmeleontiformia). *ZooKeys*, 894, 33–51.

Maryńska-Nadachowska, A., Kuznetsova, V.G., Abdul-Nour, H. (2008) A chromosomal study on a Lebanese spittlebug *Philaenus arslani* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aphrophoridae). *European Journal of Entomology*, 105, 205–210.

Mejdalani, G. (1998) Morfologia externa dos cicadellinae (homoptera, cicadellidae): comparação entre *Versigonalia ruficauda* (walker) (cicadellini) e *tretoгония cribrata melichar* (proconiini), com notas sobre outras espécies e análise da terminologia. *Revista Brasileira de Zoologia*, 15(2).

Mejdalani, G., (1995) *Scopogonalia paula* Young, 1977: morphology of the female genitalia and comparative notes on the *Juliaca* Generic Group (Homoptera, Cicadellidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 39, 193–202.

Moulds, M.S. (2005) An appraisal of the higher classification of cicadas (Hemiptera: Cicadoidea) with special reference to the Australian fauna. *Records of the Australian Museum*, 57(3), 375–446.

Moulds, M.S. (2012) A review of the genera of Australian cicadas (Hemiptera: Cicadoidea). *Zootaxa*, 3287(1), 1–262.

Nielson, M.W. (1985) Leafhopper systematics. In: Nault, L.R. & Rodriguez, J.G. (eds.), *The leafhoppers and planthoppers*. John Wiley and Sons, New York, 500p.

Nielson, M.W. (1985) Leafhopper Systematics. In: Nault, L.R., Rodriguez, J.G. (Eds.), *The Leafhoppers and Planthoppers*. Wiley, New York, pp. 127–162

Oman, P.W. (1949) The Nearctic leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). A generic classification and check list. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 3, 1–253.

Pappalardo, A., D'Urso, V., Viscuso, R., Ferrito, V., Giunta, M.C., Cupani, S., Vitale, D. (2016). Morphostructural investigation of the female reproductive system and molecular evidence for Wolbachia in *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Hemiptera, Cicadellidae). *Micron*, 81., 23–33.

Pereira, R.A.S., Lino-neto, J., Prado, A.P. (2008). Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. *Symbiosis*. 45, 143–147.

R Core Team (2021) R: A Language and environment for statistical computing. (Version 4.1) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2022-01-01).

Rafael, J.A., G.A.R. Melo; C.J.B. de Carvalho; Casari, S.A., Constantino R.. (2017) *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto, Holos Editora, 810p.

Rezende, P.H., Dias, G., Folly, C., Lino-Neto, J. (2021) Male reproductive system and sperm morphology of Eccritotarsini plant bugs (Heteroptera: Miridae). *Zoomorphology*, 140, 257–267.

Su, M., Dietrich, C.H., Zhang, Y., Dai, W. (2014) Ultrastructure of the spermatozoa of *Psammotettix striatus* (Linnaeus) and *Exitianus nanus* (Distant) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Arthropod Structure & Development*. 43(6), 559–70.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Tsai, J.H., Perrier, J.L. (1996) Morphology of the Digestive and Reproductive Systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae).” *The Florida Entomologist*, Florida Entomological Society, 79(4), 563–78.

Vitale, D., D'Urso, V., Viscuso, R. (2016) Morphostructural investigation on spermatozoa and sperm bundles of the leafhopper *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Hemiptera: Deltocephalinae).

Vitale, D., Viscuso, R., D'urso, S., Gibilras, A., Sardella, A., Marletta, A., Pappalardo, A. (2015) Morphostructural analysis of the male reproductive system and DNA barcoding in *Balclutha brevis* Lindberg 1954 (Homoptera, Cicadellidae). *Micron*, 79, 36–45.

Waquil, J.M. (1997) Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* [online], 26(1), 27–33.

Young, D.A. (1968) "Taxonomic Study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae) pt. 1: Proconiini." *Bulletin of the United States National Museum*. 1–287, 261 figures.

Young, D.A. (1977) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 2. New World Cicadellini and the genus *Cicadella*. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 239. vi + 1135 pp. [91 n.gen., 395 n.sp.]

Zhang, B., Dai, W. (2012) Ultrastructure of the spermatozoa of *Cicadella viridis* (Linnaeus) and its bearing on the phylogeny of Auchenorrhyncha. *Micron*, 43(9), 978 –84.

Zhang, B., Zhang, C., Dietrich, C., Dai, W. (2016) Anatomy and Ultrastructure of Male Reproductive System in Two Leafhoppers *Cicadella viridis* and *Kolla paulula* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 109(3), 447–462.