

IGOR LUIZ ARAÚJO MUNHOZ

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO EM ESPÉCIES
DE HETERÓPTEROS AQUÁTICOS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Setembro, 2016

IGOR LUIZ ARAÚJO MUNHOZ

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO EM ESPÉCIES
DE HETERÓPTEROS AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Departamento de Zoologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Zoologia

Orientador: Prof. Alan Lane de Melo

Colaborador: Prof. Vinicius Albano Araújo

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Setembro, 2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao programa de Pós-graduação em Zoologia, pelo ensino de qualidade. À Fundação CAPES pela bolsa concedida, possibilitando os meus estudos.

Ao meu orientador Alan Lane de Melo, referência no Brasil em Heteroptera aquáticos, por ter me aceitado como orientando, pela confiança, ensinamentos e apoio.

Ao grande colaborador e amigo Vinicius Albano Araújo, que sempre esteve ao meu lado desde a UFV e atualmente na UFRJ, sendo essencial para o desenvolvimento de todo o trabalho, pelos conselhos, palavras de incentivo e principalmente pelas críticas, sempre construtivas.

À Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba pela disponibilidade dos equipamentos e laboratórios, em especial Prof. Edmilson Amaral de Souza.

À minha mãe Sueli Terezinha Araújo Munhoz, por todo o AMOR, estando ao meu lado em todos os momentos da minha vida, mantendo a minha cabeça erguida e me incentivando a seguir em frente. Ao meu pai Jorge Luiz de Oliveira Munhoz e irmão Pablo Luiz Araújo Munhoz, pela cumplicidade e por completar a base dessa família sempre unida.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

Oliver Goldsmith

RESUMO

A ordem Hemiptera é uma das maiores dentro da Classe Insecta, exibindo grande variedade morfológica, de estratégias reprodutivas e hábitos alimentares, ocupando os mais diversos ambientes terrestres e aquáticos. Dentro da subordem Heteroptera, a infraordem Nepomorpha contém os percevejos verdadeiramente aquáticos, que vivem em ambientes lóticos e lênticos. Os diferentes nichos ecológicos ocupados refletem em diferentes adaptações e estratégias reprodutivas. As variações na morfologia dos sistemas reprodutores podem ocorrer com a presença ou ausência de estruturas, número e posição ao longo do trato reprodutivo. Quando as características morfológicas externas não são suficientes para resolução de problemas taxonômicos, informações complementares podem ser obtidas pela análise morfológica e histológica dos órgãos internos. Estas variações interespecíficas em tais estruturas têm gerado caracteres capazes de suportar análises filogenéticas. A inclusão de novos caracteres, somados aos caracteres morfológicos comumente utilizados, visam contribuir para a sistemática de vários grupos de insetos que ainda não possuem uma filogenia totalmente aceita. Além disso, estes estudos auxiliam no entendimento da biologia reprodutiva, como as diferentes estratégias de cópula. Nesta dissertação, descrevemos a morfologia e histologia do sistema reprodutor masculino espécies das famílias Belostomatidae e Naucoridae, da ordem Hemiptera. Para isso, utilizamos técnicas de microscopia de luz. Os resultados demonstram similaridades e diferenças com outros estudos da literatura e apontam caracteres como: (1) anatomia geral; (2) número de folículos por testículo; (3) número de espermatozoides por cisto e (3) histologia do sistema reprodutor; potenciais para futuras inferências na sistemática, enfatizando a necessidade da descrição da anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino em um maior número de espécies.

Palavras-chave: sistema reprodutor masculino, histologia, heterópteros aquáticos

ABSTRACT

The Hemiptera order is one of the largest in the Class Insecta, displaying great morphological variety of reproductive strategies and eating habits, occupying the most diverse terrestrial and aquatic environments. Within the Heteroptera suborder, the infraorder Nepomorpha contains the truly aquatic bugs that live in lotic and lentic environments. Different occupied ecological niches reflect in different adaptations and reproductive strategies. Variations in the morphology of reproductive systems can occur in the presence or absence of structures, number and position along the reproductive tract. When the external morphological characteristics are not enough to resolve taxonomic problems, additional information may be obtained by morphological and histological analysis of the internal organs. These interspecific variations in such structures have generated characters able of supporting phylogenetic analyzes. The inclusion of new characters added to the morphological characters commonly used, are intended to contribute to the system of various groups of insects that do not have a phylogeny fully accepted. Furthermore, these studies assist in the understanding of reproductive biology such as different mating strategies. In this thesis, we describe the morphology and histology of the male reproductive system in species of Belostomatidae and Naucoridae families of the order Hemiptera. For this, we used techniques of light microscopy. The results demonstrate similarities and differences with other studies in the literature and point characters such as: (1) general anatomy; (2) number of follicles per testis; (3) the number of cysts by sperm, and (3) histology of the reproductive system; potential for future inferences in systematic, emphasizing the need for description of the anatomy and histology of the male reproductive system in a larger number of species.

Keywords: male reproductive system, histology, aquatic heteropteran

SUMÁRIO

1 Introdução geral	1
1.1 Família Belostomatidae	3
1.2 Família Naucoridae	4
1.3 Sistema reprodutor de insetos.....	5
2 Objetivos	8
3 Material e métodos	9
3.1 Coleta de insetos.....	9
3.2 Manutenção dos insetos em laboratório	10
3.3 Identificação e depósito.....	10
3.4 Morfologia do sistema reprodutor	10
4 Resultados	12
4.1 - Capítulo 1: Morfologia do sistema reprodutor masculino em três espécies do gênero <i>Belostoma</i> (Heteroptera: Belostomatidae)	12
1. Introdução	13
2. Material e métodos.....	15
3. Resultados	16
4. Discussão.....	17
Referências bibliográficas	23
4.2 - Capítulo 2: Morfologia do sistema reprodutor masculino em duas espécies da família Naucoridae (Hemiptera: Heteroptera).....	27
1. Introdução	28
2. Material e métodos.....	29
3. Resultados	30
4. Discussão.....	31
Referências bibliográficas	40
5 Conclusões gerais	43
Referências bibliográficas	44

LISTA DE FIGURAS

Fig 1. . Locais de coleta: 1) Rio Paranaíba - MG; 2) Curvelo - MG; Serra do Cipó - MG
.....09

Capítulo 1

Fig 1. Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*. **A-** Testículo (T) dividido em duas regiões: a – Folículos enovelados e b – folículos individualizados, ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs) e ducto ejaculatório (ej). **B-** Desenho esquemático do sistema reprodutor de *Belostoma plebejum* apontando o local das seções relativas aos cortes histológicos das figuras 2, 3 e 4 para *B. plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum*.19

Fig 2. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*, *Belostoma stollii* e *Belostoma testaceopallidum*. **A-** Seção longitudinal do testículo de *B. plebejum* mostrando os folículos (f). Os asteriscos indicam a presença de diferentes fases da espermatogênese e a seta a cápsula conjuntiva que envolve os testículos. **B-** Seção longitudinal do testículo de *B. stollii* demonstrando as duas regiões do testículo, folículos (f) alongados (a) e folículos enovelados (b). **C-** Cisto de *B. plebejum* contendo 348 espermatozoides. **D-** Cisto de *B. stollii* contendo 359 espermatozoides. **E-** Cisto de *B. testaceopallidum* contendo aproximadamente 485 espermatozoides **F-** Seção longitudinal da região posterior dos folículos (f) e início do ducto deferente (dd). A seta indica epitélio cúbico com núcleos centrais.. **G-** Seção transversal da região anterior dos folículos demonstrando a presença dos espermatozoides em feixes (spz). A seta indica o epitélio cúbico com núcleos medianos. **H-** Seção transversal da região posterior de um foículo demonstrando o lúmen repleto de espermatozoides (spz) e o epitélio cúbico com núcleos centrais (ep).....20

Fig 3. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*, *Belostoma stollii* e *Belostoma testaceopallidum*. **A-** Seção longitudinal da porção final do ducto deferente (dd), vesícula seminal (vs) e a camada muscular (m) de *B. plebejum*. **B-** Seção longitudinal do ducto deferente (dd) de *B. stollii* demonstrando o epitélio o epitélio simples, cúbico com núcleos medianos (seta), a grande camada muscular (asterisco) e o lúmen repleto de espermatozoides (spz). **C-** Seção transversal da vesícula seminal demonstrando o epitélio simples, pavimentoso com núcleos esféricos e basais (seta), a camada muscular (m) e os espermatozoides (spz).....21

Fig 4. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*, *Belostoma stollii* e *Belostoma testaceopallidum*. **A-** Seção transversal do ducto ejaculatório (ej) de *B. plebejum*. O asterisco indica a ampla camada muscular: a – Camada circular e b – Camada longitudinal e a seta indica o epitélio simples pseudoestratificado. **B-** Seção longitudinal do ducto ejaculatório (ej) de *B. plebejum* que termina em um edeago esclerotizado (aed).22

Capítulo 2

Fig 1. Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros*. **A-** Sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus*: Testículos (T), ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs), glândulas acessórias gal e gall e ducto ejaculatório (ej). **B** - Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* apontando os locais das seções relativas aos cortes histológicos das figuras 2, 3 e 5. **C** - Sistema reprodutor masculino de *Limnocoris porphyros*: Testículos (T), ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs), glândulas acessórias ga1 e ga2 e ducto ejaculatório (ej). **D** - Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de *Limnocoris porphyros* apontando os locais das seções relativas aos cortes histológicos das figuras 2, 4 e 5.35

Fig 2. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros*. **A-** Seção transversal do testículo de *P. subflavus* mostrando os sete folículos (f). **B-** Seção transversal do testículo de *L. porphyros* mostrando os sete folículos (f). **C-** Folículo (f) de *P. subflavus* evidenciando as três zonas da espermatogênese: a- Zona de crescimento, b- Zona de maturação e c- Zona de diferenciação. **D-** Seção transversal do testículo de *L. porphyros* demonstrando a redução testicular e a presença de espermatozoides diferenciados (spz) e cistos (setas). **E-** Seção longitudinal do longo e fino ducto deferente (dd) de *P. subflavus*. **F-** Seção longitudinal do ducto deferente (dd) de *P. subflavus* demonstrando a ampla camada muscular (m). **G-** Seção transversal do ducto deferente (dd) de *P. subflavus* mostrando a presença de espermatozoides no lúmen (setas).36

Fig 3. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus*. **A-** Seção longitudinal da região das glândulas acessórias mostrando os dois tipos: Tipo I (gal) e tipo II (gal) e as vesículas seminais (vs). **B-** Seção longitudinal das glândulas do tipo I demonstrando os multilóbulos (lob) na região ovalada, canal coletor comum (cc) e a região dos ductos (setas). **C-** Seção transversal da glândula do tipo II mostrando a secreção transparente (asterisco). **D-** Seção transversal da vesícula seminal que

apresenta epitélio simples, pavimentoso com núcleos achatados e apicais (seta) e o lúmen repleto de espermatozoides (spz).37

Fig 4. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Limnocoris porphyros*. **A-** Seção longitudinal da longa vesícula seminal (vs) e glândulas acessórias do tipo I (gal). **B-** Seção transversal das glândulas acessórias demonstrando os dois tipos: Tipo I (gal) e tipo 2 (gall). O asterisco indica a secreção transparente da glândula do tipo 2. **C-** Seção transversal da glândula acessória do tipo 1 demonstrando a secreção translúcida (asterico). **D-** Seção transversal das vesículas seminais (vs), demonstrando o epitélio simples, pavimentoso com núcleos achatados e basais (seta) e o lúmen repleto de espermatozoides (spz).....38

Fig 5. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros*. **A-** Seção longitudinal do ducto ejaculatório (ej) de *Pelocoris subflavus* demonstrando a extensa camada muscular (m) e epitélio simples, cúbico com núcleos esféricos e medianos (seta) **B-** Seção transversal do ducto ejaculatório (ej) de *Limnocoris porphyros*. O asterisco indica a ampla camada muscular: a – Camada circular e b – Camada longitudinal e a seta indica a cutícula ectodérmica que reveste o epitélio.39

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Hemiptera é uma das maiores dentro da Classe Insecta, exibindo uma grande variedade morfológica, de estratégias reprodutivas e hábitos alimentares, fazendo com que ocupem os mais diversos tipos de ambientes, terrestres e aquáticos. Atualmente cerca de 89.000 espécies foram descritas, as quais encontram-se distribuídas por todo o mundo (Weirauch & Schuh, 2011; Grazia *et al.*, 2012). A característica mais uniforme que permite distinguir os membros de Hemiptera dos integrantes de outras ordens de insetos consiste nas peças bucais adaptadas à perfuração e sucção (lábio inserido à frente do prosterno), alojadas em uma longa tromba ou bico, tanto na forma adulta como em ninfas (Schuh & Slater, 1995). Além disso, outra característica diagnóstica é o reduzido número de veias alares, alguns representantes adultos não possuem asas, enquanto outros podem ter asas reduzidas (Carver *et al.*, 1991).

Das quatro subordens de Hemiptera (Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha, e Auchenorrhyncha), a subordem Heteroptera apresenta mais de 40.000 espécies descritas, divididas em 89 famílias (Henry, 2009; Weirauch & Schuh, 2011). A maioria das espécies apresenta hábito fitófago, alimentando-se de seiva e outros sucos produzidos por plantas e apresentam grande importância econômica por serem pragas em diversos tipos de culturas vegetais (atuando inclusive como vetores fitopatogênicos); ou predadores utilizados para controle biológico de vetores de doenças humanas; ou mesmo como próprios vetores, como, por exemplo os reduvídeos na transmissão do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Santamarina-Mijares & Gonzáles-Broche, 1985; Schaefer & Panizzi, 2000; Redak *et al.*, 2004; Ringenberg *et al.*, 2010; Reyes & Estévez, 2006; Zappalà, 2013; Zanuncio *et al.*, 2014; Panizzi & Grazia, 2015).

Os heterópteros tem sido amplamente estudados por se tratar de um grupo de insetos cosmopolitas de grande interesse econômico, ecológico e para saúde pública (Damgaard *et al.*, 2005; Papáček & Soldán, 2008; Horton & Lewis, 2011).

Atualmente, estão distribuídos em sete infra-ordens: Cimicomorpha, Dipsocoromorpha, Enicocephalomorpha, Pentatomomorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha e Nepomorpha, sendo que nas três últimas encontramos espécies associadas a ambiente aquáticos (Wheeler *et al.*, 1993; Schuh & Slater, 1995). Existem registros fósseis para hemípteros aquáticos datados desde o final do permiano e durante o Jurássico (Nieser & Melo, 1997; Ryzhkova, 2012, 2013; Melo, 2015). Além de algumas famílias extintas, atualmente, são consideradas válidas 26 famílias (Panizzi & Grazia, 2015), cujas espécies ocupam os mais diversos nichos em comunidades aquáticas de ambientes lóticos e lênticos, em diferentes estados de conservação e assim como os demais insetos, respondem rapidamente a perturbações ambientais de origem antrópica ou não (Vianna & Melo, 2003).

As relações filogenéticas da infraordem Nepomorpha, assim como de níveis superiores é ainda confusa. De acordo com o estudo de Hebsgaard *et al.* (2004), combinando dados moleculares e morfológicos, todas as superfamílias e famílias de Nepomorpha são consideradas monofiléticas, com exceção de Naucoroidea, que se mostrou parafilética. Os dados obtidos ao apontarem uma forte relação entre Potamocoridae e Aphelocheiridae, deram origem a superfamília Aphelocheiroidea para alocar essas duas famílias e restando Naucoroidea com apenas a família Naucoridae. O monofiletismo de Nepomorpha é amplamente aceito (Wheeler *et al.*, 1993; Mahner, 1993; Xie *et al.*, 2008), no entanto, o estudo de Hua *et al.* (2009), baseado em análises de genomas mitocondriais, sugere que a infraordem é parafilética e que a família Pleidae deve ser elevada ao nível de infraordem, sendo classificada como grupo irmão de Nepomorpha. Além disso, os resultados apontaram novamente Naucoroidea como sendo monofilética (Aphelocheiridae + Naucoridae). Outra questão amplamente discutida é quanto a classificação do gênero *Abedus* em Belostomatidae, uma vez que utilizando caracteres obtidos a partir da morfologia externa, alguns autores o colocam como um subgênero de *Belostoma* (De Carlo, 1968; Schnack & Estévez, 1990). Devido

aos poucos táxons examinados e a falta de análises combinadas utilizando caracteres morfológicos as dúvidas quanto a posição dos táxons ainda persistem, incluindo, *Appasus*, *Benacus*, *Kirkaldyia* e *Limnogeton*, todos provavelmente oriundos de Belostomatidae.

1.1. Família Belostomatidae

A família Belostomatidae com aproximadamente 160 espécies descritas (Polhemus & Polhemus, 2008) atualmente apresenta três subfamílias: Lethocerinae com o gênero *Lethocerus*, Horvathiinae com *Horvathinia* e Belostomatinae com os gêneros *Weberiella*, *Limnogeton*, *Hydrocyrius*, *Diplonychus*, *Belostoma* e *Abedus* (Lauck & Menke, 1961). Essa subdivisão foi feita com base em aspectos da morfologia da genitália masculina e em uma análise mais crítica de outras características, tais como a condição dos esternitos abdominais e o grau de desenvolvimento das garras tarsais do primeiro par de pernas (Lauck & Menke, 1961). Somente *Lethocerus* ocorre nos dois hemisférios (Ocidental e Oriental). *Abedus*, *Belostoma*, *Horvathinia* e *Weberiella* são gêneros americanos, enquanto *Limnogeton*, *Hydrocyrius* e *Diplonychus* são gêneros do velho mundo. Não há registro para esse grupo na Região Ártica e em grande parte da Europa e no nordeste da Ásia (Lauck & Menke, 1961).

Uma característica marcante para a família é o cuidado parental. Em Lethocerinae os machos são encarregados de manter a umidade dos ovos, um vez que as fêmeas os depositam em substratos emersos. O macho mergulha e leva a água até a postura, distribuindo-a entre os ovos. Além desse comportamento, o macho também defende a prole contra predadores, permanecendo durante alguns períodos do dia sobre a postura (Macías-Ordoñez, 2003). Em Belostomatinae as fêmeas depositam os ovos no dorso dos machos, que são transportados até a eclosão. Os machos então são responsáveis por manter a oxigenação e proteção dos ovos, aumentando significativamente o

sucesso de eclosão (Crowl & Alexander, 1989). O local de postura dos Horvathiniinae não é conhecido.

Os belostomatídeos são conhecidos no Hemisfério Norte como “*electric-light bugs*”, devido ao fato de serem atraídos por luz elétrica (Hungerford, 1919; Nieser, 1975) e em algumas regiões do Brasil conhecidos como “barata d'água”. São caracterizadas pelo corpo achatado, de forma elíptica, oblonga ou oval. Possuem rostro forte triarticulado, olhos grandes e salientes, com ausência de ocelos. As pernas anteriores são raptorais, enquanto as tíbias das pernas posteriores são achatadas e providas de longas cerdas. Apresentam também um par de sífões respiratórios retráteis (Costa Lima, 1940).

As espécies do gênero *Belostoma* atuam como controladores biológicos, uma vez que predam uma grande variedade de invertebrados, entre eles, larvas de dípteros da família Culicidae e caramujos do gênero *Biomphalaria*, que apresentam grande importância médica por estarem associados a doenças com potencial epidemiológico (Consoli *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 1993).

1.2 Família Naucoridae

A família Naucoridae consiste em cinco subfamílias: Cheirochelinae, Cryphocricinae, Laccocorinae, Limnocorinae e Naucorinae, com cerca de 400 espécies descritas, distribuídas em 40 gêneros (Schuh & Slater, 1995). Entre os Nepomorpha, os naucorídeos apresentam a maior diversidade morfológica, sendo conhecidos por serem os mais adaptados a viver em ambientes lóticos (Nieser & Melo, 1997). Os naucorídeos são comumente conhecidos por atuarem como controladores biológicos naturais de larvas de dípteros das famílias Culicidae e Simuliidae, porém vários trabalhos tem apontado naucorídeos como possíveis vetores da úlcera de Buruli na África Ocidental (Marsollier *et al.*, 2002; Merritt *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007; Ebong *et al.*, 2012). Embora a transmissão aos seres humanos não tenha sido demonstrada, os naucorídeos

abrigavam o agente etiológico causador da doença (*Mycobacterium*) em suas glândulas salivares (Marsollier *et al.*, 2002; Merritt *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007).

1.3 Sistema reprodutor de Insetos

A grande abundância dos insetos e o sucesso em ocupar os mais diversos ambientes estão intimamente associados a alta capacidade reprodutiva, as estruturas associadas a reprodução e a diversidade nos comportamentos de cópula. Por apresentarem geralmente um curto período de vida, o comportamento, a reprodução e história de vida devem ser sincronizados, permitindo um maior êxito e menores perdas dos descendentes (Chapman, 1998; Gillot, 2005; Triplehorn & Johnson, 2011). Sendo assim, podem ocorrer variações nos sistemas reprodutores como a presença ou ausência de estruturas, tamanho, número e posição das mesmas ao longo do trato reprodutivo (Rawat, 1939; Grassé, 1982; Pápacek & Soldán, 1987, 1992, 1996, 2008; Chapman, 1998).

Morfologicamente, o sistema reprodutor dos machos consiste de, em geral, um par de testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e ducto ejaculatório (Chapman, 1998; Özyurt *et al.*, 2013). Cada testículo contém uma série de tubos testiculares ou folículos, onde ocorre o processo espermatogênico, e o número destes pode variar entre as espécies, constituindo uma característica que pode ser utilizada na sistemática (Glowacka *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2008).

As vesículas seminais são, na grande maioria dos insetos, regiões dilatadas e modificadas, onde os espermatozoides ficam estocados até serem transferidos para as fêmeas. As glândulas acessórias podem ser classificadas em dois tipos de acordo com a sua derivação, mesodérmica ou ectodérmica. Quase todos os estudos demonstram origem mesodérmica, enquanto pouco se sabe sobre aqueles que têm uma origem ectodérmica (Özyurt *et al.*, 2013). Suas secreções estão associadas a diversas funções,

como, por exemplo, a maturação e ativação dos espermatozoides, indução e aceleração da oviposição nas fêmeas e a formação do espermatóforo (Chen, 1984; Gillot, 1988; Raina *et al.*, 1994; Gillot, 2003).

Nos casos em que somente as características morfológicas externas não são suficientes para resolução dos problemas taxonômicos, informações complementares podem ser obtidas pela análise morfológica e histológica dos órgãos internos. Existem vários estudos enfocando a anatomia do sistema reprodutor masculino para diferentes famílias terrestres de heterópteros, tais como Miridae (Akingbohunge, 1983; Leston, 1961), Nabidae (Woodward, 1949), Psylloidea (Glowacka, 1995), Anthocoridae (Horton & Lewis, 2011) e Reduviidae (Louis & Kumar, 1973; Freitas *et al.*, 2008; Chiang *et al.*, 2012). Outros descreveram a histologia do sistema reprodutor masculino para as famílias Pentatomidae (Lemos *et al.*, 2011; Özyurt *et al.*, 2013, 2014, 2015); Coreidae (Karakaya *et al.*, 2012); Miridae (Mróz, 2007; Uceli *et al.*, 2011); Reduviidae (Freitas *et al.*, 2010); Aphididae (Wieczorek, 2008, 2009). Entretanto, para os heterópteros aquáticos poucos foram os estudos abordando a anatomia do sistema reprodutor masculino, entre eles, para a família Belostomatidae (Montgomery, 1900; Bhargava, 1967; Grozeva *et al.*, 2013), Naucoridae, Aphelocheiridae, Notonectidae e Veliidae (Pendergrast, 1957; Papáček & Gelbič, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008; Pápacek & Soldán, 1992 apud Papáček & Soldán, 2008). Ao compararem a morfologia dos testículos em espécies de heterópteros (Belostomatidae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae), Pereira *et al.* (2015) verificaram que em Belostomatidae os testículos são enovelados na região distal do ducto ejaculatório e alongados na região proximal, de modo diferente, em Gelastocoridae, eles se apresentam alongados e espiralados na extremidade distal. Em Notonectidae, além de alongados, os testículos podem se apresentar em espiralados ou enovelados e, em Gerridae e Veliidae, enovelados.

Além dos estudos morfológicos, os aspectos histológicos do sistema reprodutor masculino de heterópteros aquáticos, foram relatados, até o momento apenas para as

famílias Hebridae (Battum & Heming, 1989) e Aphelocheiridae (Papácek & Soldán, 2008).

As relações filogenéticas de Heteroptera ainda permanecem controversas, mesmo havendo trabalhos utilizando caracteres morfológicos externos (Li *et al.*, 2005; Brozek, 2014), moleculares (Hua *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012) e ambos (Damgaard *et al.*, 2005; Guilbert *et al.*, 2014). As dúvidas persistem quanto a posição de alguns táxons e a monofilia e posição de Heteroptera dentro de Hemiptera (Weirauch & Schuh, 2011).

Neste sentido, a busca por novos caracteres oriundos do estudo histológico descritivo da morfologia do sistema reprodutor masculino torna-se relevante para auxiliar no conhecimento da história evolutiva e comportamento reprodutivo da subordem Heteroptera e dos hemípteros em geral.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino em espécies de Belostomatidae e Naucoridae, uma vez que a morfologia destas células tem se mostrado bastante variada e, portanto, relevantes em estudos comportamentais e filogenéticos de insetos.

Os objetivos específicos foram:

- Estudar morfologicamente por análise histológica, o sistema reprodutor masculino de três espécies de *Belostoma*;
- Estudar comparativamente e morfologicamente, o sistema reprodutor masculino das espécies *Limnocoris porphyros* e *Pelocoris subflavus* da família Naucoridae;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de insetos

Coletas sistemáticas de insetos aquáticos pertencentes às famílias Belostomatidae e Naucoridae foram realizadas entre maio de 2015 e junho de 2016, com auxílio de rede entomológica em forma de D (puçá), confeccionada com nylon (50 cm de largura, 40 cm de altura e 30 cm de abertura) adaptada a um cabo de alumínio.

Coletou-se em uma lagoa artificial (19°12'22.4"S, 46°07'51.2"W) situada no *Campus* Rio Paranaíba, da Universidade Federal de Viçosa, município de Rio Paranaíba, e em córregos às margens da rodovia, próximos ao município de Curvelo (18°44'22"S, 44°26'37"W) e Serra do Cipó (19°12'S, 43°30'W), Minas Gerais, Brasil. Em todos os pontos as coletas foram realizadas ao longo da orla, às margens, coluna d'água e junto ao sedimento do leito.

O material coletado foi transferido para uma cuba plástica, os espécimes foram separados dos detritos, acondicionados em recipientes de vidro contendo água, etiquetados e transportados para o laboratório.

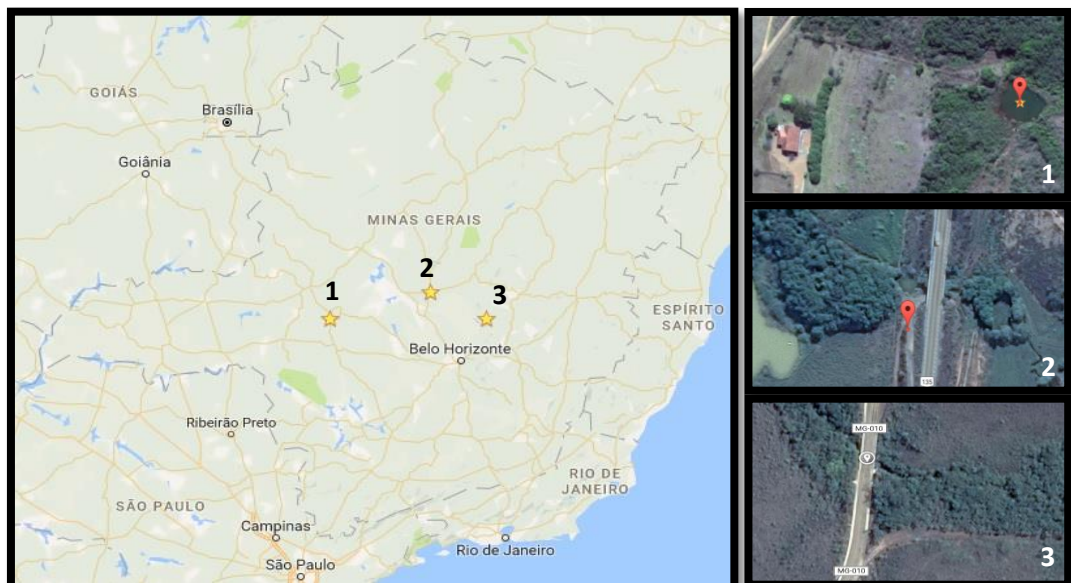


Fig1. Locais de coleta: 1) Rio Paranaíba - MG; 2) Curvelo - MG; Serra do Cipó - MG

3.2 Manutenção dos insetos em laboratório

Os espécimes, após separação por família ou gênero, foram mantidos individualmente em recipientes plásticos (copos plásticos descartáveis com capacidade para 200ml) contendo água desclorada e alimentados com larvas de Culicidae, coleópteros aquáticos, moluscos (planorbídeos e tiarídeos) e ou pequenos peixes (poecilídeos) até o momento de sua utilização. Alguns heterópteros, objeto do presente estudo, foram transferidos para tubos contendo álcool a 70° GL, para posterior identificação específica.

3.3 Identificação e depósito

Os exemplares de heterópteros foram identificados segundo critérios morfológicos do inseto adulto com o auxílio de chaves de identificação propostas por Nieser & Melo (1997) e Nieser & Chen (2002). Em seguida, alguns exemplares de cada espécie foram depositados na coleção do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados da Universidade Federal de Minas Gerais (DPIC).

3.4 Morfologia do sistema reprodutor

Dos exemplares obtidos, dez machos adultos de *Belostoma plebejum* (Stål, 1858), cinco de *Belostoma stollii* (Amyot & Serville, 1843), cinco de *Belostoma testaceopallidum* Latreille, 1807, dez de *Pelocoris subflavus* Montandon, 1898 e seis de *Limnocoris porphyros* Nieser & Lopez Ruf, 2001, foram dissecados e os sistemas reprodutores extraídos e transferidos para recipientes contendo solução fixadora de Zamboni (Paraformaldeído, tampão fosfato Sorensen e solução saturada de ácido pícrico) 2.5% 0.1 M, pH 7 (Stefanini & Martino, 1967), onde permaneceram por um período de 4 a 6 horas. Após o período de fixação, o material foi lavado em água destilada por três vezes a cada quinze minutos e em seguida desidratado em série alcoólica crescente (50° GL, 70° GL, 90° GL e absoluto) por quinze minutos cada etapa. Posteriormente o material

foi embebido e incluído em resina glicol-metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha). Cortes semifinos de 2 μm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo automatizado (Leica RM2265, Alemanha) corados com azul de Toluidina 0,05% por 25 segundos e fotografados em microscópio (Olympus BX-60, Japão). Após a montagem permanente em lâminas de vidro utilizando Entellan, os cortes foram analisados com auxílio de microscopia de luz acoplada a um sistema de análise de imagem (Microscópio Olympus BX-60, Japão)

Para análise anatômica, logo após a fixação, alguns sistemas reprodutores foram fotografados em microscópio de luz (Olympus BX-60, Japão) e em seguida, produzidas ilustrações esquemáticas em nanquim.

4. RESULTADOS

Capítulo 1

**Morfologia do sistema reprodutor masculino em três espécies do gênero
Belostoma (Heteroptera: Belostomatidae)**

1. Introdução

A classe Insecta compreende atualmente os organismos mais diversificados, com uma ampla gama de exploração de habitats e recursos. Dentre os hemimetábolos, a ordem Hemiptera é a mais diversa, com uma história evolutiva que envolve a invasão e distribuição nos ambientes terrestres e de água doce (Rafael *et al.* 2012). Os diferentes nichos ecológicos ocupados refletem em diferentes adaptações e estratégias reprodutivas (Gullan & Cranston, 2010).

Os representantes de Belostomatidae desempenham um papel importante como agentes biológicos em ambientes aquáticos por serem predadores de uma grande diversidade de organismos invertebrados e vertebrados (Menke, 1979; Smith, 1997; Reyes & Estévez, 2006). A família apresenta distribuição cosmopolita, com representantes em todas as regiões biogeográficas, com exceção das polares (Polhemus & Polhemus, 2008). Na América do Sul, o gênero *Belostoma* Latreille, 1807 é o mais diverso, incluindo mais de 70 espécies distribuídas na região Neotropical, com cerca de 50 registradas no Brasil (Ribeiro, 2007). A partir de uma avaliação de similaridade morfológica geral entre esses táxons, *Belostoma* foi organizado em 16 grupos de espécies (Lauck, 1961). No entanto, a sistemática do gênero *Belostoma* ainda permanece confusa devido a similaridade morfológica entre as espécies e a escassez de estudos realizados.

O sistema reprodutor masculino dos insetos geralmente é formado por um par de testículos, ductos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e ducto ejaculatório (Chapman, 1998; Özyurt *et al.*, 2013). Alguns autores descreveram a morfologia do sistema reprodutor para várias espécies de hemípteros de famílias terrestres: Psyllidae (Glowacka *et al.*, 1995), Aphididae (Wieczorek, 2008), Reduviidae (Freitas *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2012), Coreidae (Karakaya *et al.*, 2012), Miridae (Mróz & Wojciechowski, 2011; Uceli *et al.*, 2011) e Pentatomidae (Adams, 2001, Araújo *et al.*, 2011, Özyurt *et al.*, 2014, 2015); e aquáticas: Hebridae (Battum & Heming 1989),

Aphelocheiridae (Pápacek & Soldán, 2008), Naucoridae (Papáček & Gelbic, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008), Gelastocoridae (Alevi *et al.*, 2015), Notonectidae (Papáček & Soldán, 1992 apud Papáček & Soldán, 2008) e Belostomatidae (Bhargava, 1967; Jawale & Ranade, 1990). Tais estudos demonstraram que as variações na morfologia do sistema reprodutor poderiam fornecer novos caracteres capazes de auxiliar no entendimento do comportamento reprodutivo e em análises sistemáticas.

Segundo Mróz & Wojciechowski (2011), os resultados obtidos confirmaram a utilidade da investigação anatômica na sistemática, sendo que a variação no número de folículos entre as espécies da família Miridae era suficiente para confirmar o monofiletismo da tribo Stenodemini e corroborar a hipótese de mudanças na classificação de algumas espécies. Além disso, outras informações como as características durante o processo de espermatogênese, o número de espermatozoides por cisto e o tamanho e posição das estruturas do trato reprodutivo também podem contribuir para o entendimento das relações entre os grupos (Araújo *et al.*, 2010; 2011; Alevi *et al.*, 2015). Entretanto, devido a grande diversidade da ordem Hemiptera ainda são escassos tais estudos e para a família Belostomatidae, existindo poucos sobre a anatomia do sistema reprodutor masculino (Montgomery, 1900, Pendergrast, 1957; Bhargava, 1967; Grozeva *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015), até o presente, nenhum estudo histológico mais aprofundado e apenas um sobre a morfologia dos espermatozoides (Lee & Lee, 1992).

A morfologia dos testículos nos Heteroptera aquáticos é bastante variável e tem apresentado diferenças entre os táxons analisados, com um a sete folículos por testículo, organizados de forma arredondada, espiral ou alongada. Estas variações no número de folículos e morfologia dos testículos, quando relacionados a filogenia de Heteroptera, se tornam potenciais para propor uma hipótese filogenética para explicar as diferenças entre as espécies terrestres, aquáticas e semi-aquáticas, abrindo novos caminhos e perspectivas para o uso da morfologia reprodutiva (Pereira *et al.*, 2015). No

presente estudo, é descrita a morfologia do sistema reprodutor masculino em três espécies do gênero *Belostoma*, com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva e fornecer dados que possam futuramente ser utilizados na sistemática.

2. Material e Métodos

Foram utilizados dez machos adultos de *Belostoma plebejum* (Stål, 1858), coletados em uma lagoa artificial (19°12'22.4"S 46°07'51.2"W) situada no *Campus* Rio Paranaíba, Universidade Federal de Viçosa, município de Rio Paranaíba, cinco machos de *B. stollii* (Amyot & Serville, 1843) coletados em um corpo d'água (18°44'22"S 44°26'37"O) às margens da rodovia no município de Curvelo e cinco machos de *B. testaceopallidum* Latreille, 1807 coletados em um córrego (19°12' S, 43°30' W) às margens da rodovia na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. As coletas foram realizadas com auxílio de redes entomológicas.

Microscopia de luz: Os sistemas reprodutores de cada espécie foram fixados em solução de Zamboni (Paraformaldeído, Tampão fosfato de Sorensen e solução saturada de ácido pícrico) 2.5%, 0.1 M, pH 7 (Stefanini & Martino, 1967) por um período de 4 a 6 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série alcoólica crescente (50° GL, 70° GL, 90° GL e absoluto) e incluído em resina glicol-metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha). Cortes de 2 µm foram corados pelo azul de Toluidina 0,05 %, montados em lâminas e, posteriormente fotografados em microscópio de luz (Olympus BX-60, Japão). Para análise anatômica, logo após a fixação, alguns sistemas reprodutores foram fotografados em microscópio de luz (Olympus BX-60, Japão) e em seguida, foram obtidas as ilustrações esquemáticas.

3. Resultados

A anatomia do sistema reprodutor em machos sexualmente maduros das espécies *Belostoma plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum* compreende um par de testículos, ductos deferentes, vesículas seminais e um ducto ejaculatório. Os testículos são divididos em duas regiões e envolvidos por uma cápsula conjuntiva transparente (Fig. 1 A-B e 2A). Cada testículo possui cinco folículos que são enovelados na região distal e individualizados na região proximal do ducto ejaculatório (Fig. 2B). Na região distal e enovelada os folículos apresentam células em diferentes fases da espermatogênese (Fig. 2A). Dentro dos folículos, os espermatozoides se desenvolvem sincronicamente em cistos mantidos pela célula cística. Esta célula é responsável pela secreção do envelope para formação do cisto. Em cada cisto foram encontrados em média para *B. plebejum* 348 espermatozoides (Fig. 2C), para *B. stollii* 359 espermatozoides (Fig. 2D) e para *Belostoma testaceopallidum*, 485 espermatozoides (Fig. 2E).

Os espermatozoides migram para a região testicular proximal aos ductos e neste local os espermatozoides permanecem em feixes, diferenciando esta porção dos folículos, que apresenta-se com aspecto mais denso (Fig. 1B e 2G). Em seguida os feixes são desfeitos, percorrem os folículos até alcançar os ductos deferentes e, então, alcançam uma região dilatada, as vesículas seminais, onde ficam armazenados até o momento da cópula (Fig. 3A). As regiões do folículo que se aproximam dos ductos deferentes apresentam epitélio simples, formado por células cúbicas com núcleos esféricos e medianos (Fig. 2F). Os ductos deferentes apresentam epitélio simples, cúbico com núcleos centrais e o lúmen repleto de espermatozoides (Fig. 3B).

As vesículas seminais são formadas por um epitélio simples, composto por células cúbicas com núcleos esféricos e basais (Fig. 3C) e desembocam no ducto ejaculatório único (Fig 1B).

O ducto ejaculatório possui epitélio simples, prismático com núcleos em alturas variadas (Fig. 4A). Esta região é caracterizada por muitas camadas de musculatura

circular e longitudinal (Fig. 4A). A porção terminal do ducto ejaculatório é esclerotizada formando o edeago (Fig. 4B).

4. Discussão

A anatomia geral dos sistemas reprodutores de *Belostoma plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum* se assemelha ao de outras famílias de heterópteros aquáticos, como Gerridae e Veliidae, pela forma como os folículos testiculares se enovelam na região de espermatogênese (Pereira *et al.*, 2015). Em outras famílias a morfologia testicular apresenta diferenças, como testículos alongados e espirais na extremidade distal para Gelastocoridae e alongados, espirais ou enovelados para Notonectidae (Pereira *et al.*, 2015). Assim como Belostomatidae, as famílias Hebridae, Hydrometridae e Veliidae não apresentam glândulas acessórias (Pendergrast, 1957).

O número de folículos varia amplamente entre as espécies de Heteroptera (Freitas *et al.*, 2010; Karakaya *et al.*, 2012; Özyurt *et al.*, 2013). Em Nepomorpha de modo geral o número de folículos mais comumente encontrados são de 5 ou 7 por testículo (Papáček & Soldán, 2008). Em algumas outras espécies de heterópteros como *Rheumatobates crassifemur* Esaki, 1926 (Gerridae), *Gelastocoris* (= *Montandonius*) *angulatus* Melin, 1929 (Gelastocoridae), *Martarega membranacea* White, 1879 e *M. brasiliensis* Truxal, 1949 (Notonectidae) os testículos consistem de 2 folículos (Pereira *et al.*, 2015). Em *Aphelocheirus aestivalis* (Fabricius, 1794) (Aphelocheiridae) 4 folículos são observados (Papáček & Soldán, 2008).

As três espécies aqui estudadas apresentam cinco folículos enrolados na região anterior e individualizados na região posterior, similar ao descrito recentemente para *B. anurum* (Herrich-Schäffer, 1848), *B. micantulum* (Stål, 1858) (Pereira *et al.* 2015) e também para *Lethocerus indicus* (Lepeletier & Serville, 1825) (Bhargava, 1967), porém

diferente de *L. patruelis* (Stål, 1854) que apresenta um único folículo enrolado e arredondado (Grozeva *et al.*, 2013).

Os folículos testiculares contendo células em diferentes fases da espermatogênese, demonstram que estes insetos possuem produção contínua de espermatozoides, permitindo múltiplas cópulas na fase adulta (Buschini, 2007; Moreira *et al.*, 2008).

Nos folículos testiculares, a organização das células germinativas em cistos é uma característica comum para os insetos e o número de espermatozoides nos feixes representa o número final de células que se desenvolveram em sincronia dentro dos cistos, a partir de uma única espermatogônia (Lino-Neto *et al.*, 2008).

Em abelhas o número de ciclos mitóticos tem sido uma característica apontada para uso em análises sistemáticas. No estudo de Araújo *et al.*, (2012), foi demonstrado que a quantidade de espermatozoides por cistos em adição a outros caracteres contribuiu para as análises filogenéticas da família Crabronidae. No entanto, até o presente, para os hemípteros em geral, não há estudos determinando o número de espermatozoides por cisto.

No presente estudo, foi observado que nas espécies *Belostoma plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum* a quantidade de espermatozoides nos cistos indica a ocorrência de 8 ciclos mitóticos.

Ainda, neste sentido, para um melhor conhecimento da biologia reprodutiva masculina de *Belostoma* e dos possíveis caracteres que podem ser úteis para estudos futuros na sistemática de Heteroptera, estudos histológicos envolvendo novas espécies devem ser realizados para se obter uma melhor comparação de tais caracteres.

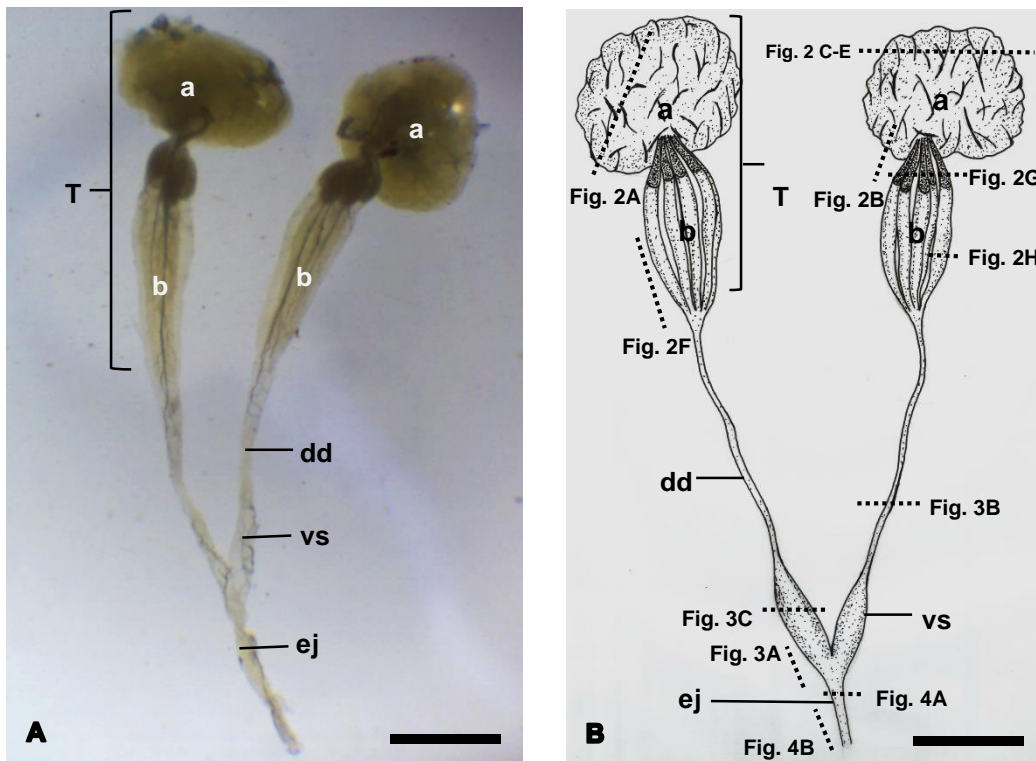


Fig 1. Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*. **A-** Testículo (T) dividido em duas regiões: a – Folículos enovelados e b – folículos individualizados, ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs) e ducto ejaculatório (ej). **B-** Desenho esquemático do sistema reprodutor de *Belostoma plebejum* apontando o local das seções relativas aos cortes histológicos das figuras 2, 3 e 4 para *B. plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum*. Barra: 40 mm.

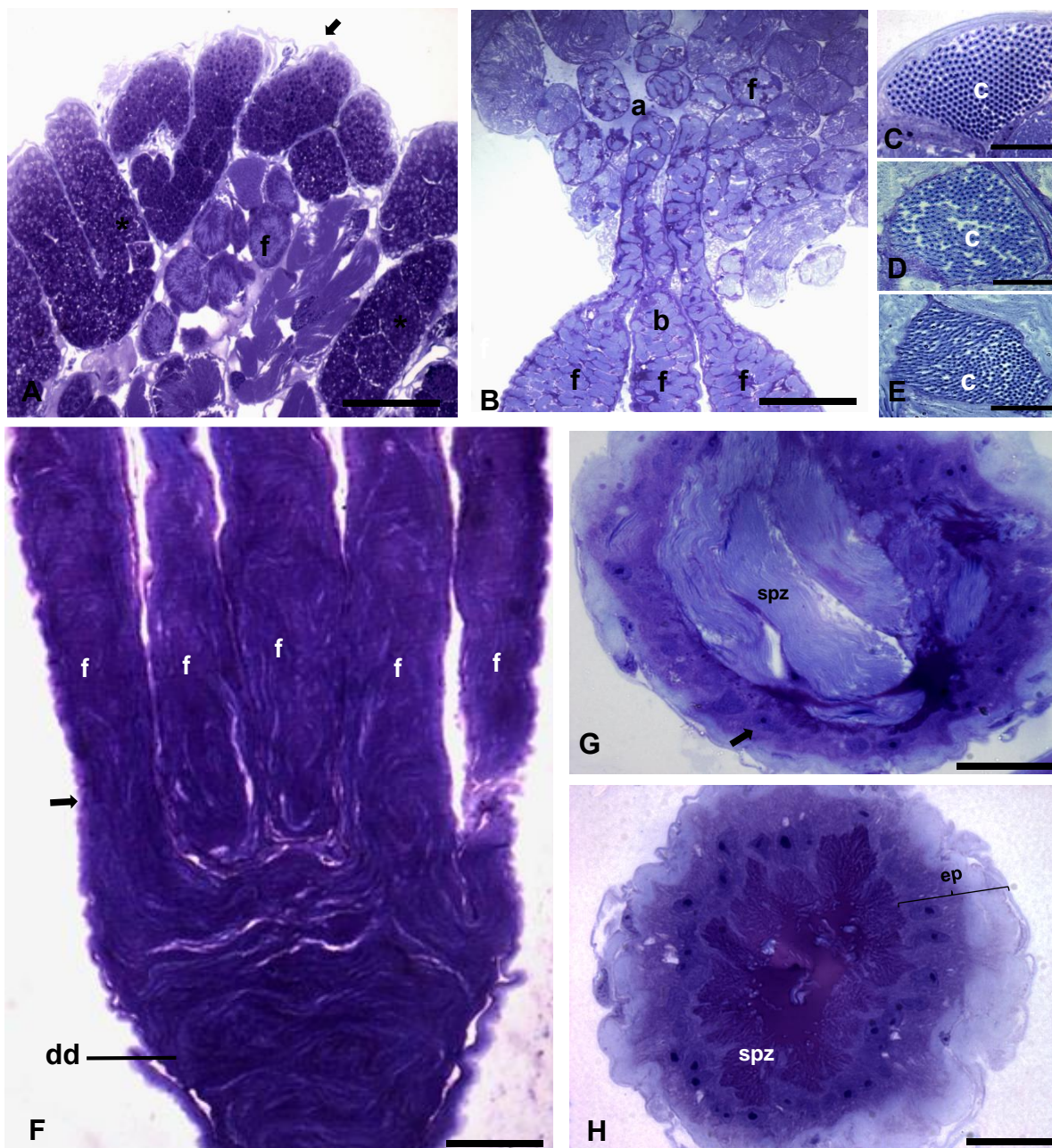


Fig 2. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*, *Belostoma stollii* e *Belostoma testaceopallidum*. **A-** Seção longitudinal do testículo de *B. plebejum* mostrando os folículos (f). Os asteriscos indicam a presença de diferentes fases da espermatogênese e a seta a cápsula conjuntiva que envolve os testículos. **B-** Seção longitudinal do testículo de *B. stollii* demonstrando as duas regiões do testículo, folículos (f) alongados (a) e folículos enovelados (b). **C-** Cisto de *B. plebejum* contendo 348 espermatozoides. **D-** Cisto de *B. stollii* contendo 359 espermatozoides. **E-** Cisto de *B. testaceopallidum* contendo aproximadamente 485 espermatozoides **F-** Seção longitudinal da região posterior dos folículos (f) e início do ducto deferente (dd). A seta indica epitélio cúbico com núcleos medianos.. **G-** Seção transversal da região anterior dos folículos demonstrando a presença dos espermatozoides em feixes (spz). A seta indica indica o epitélio cúbico com núcleos centrais. **H-** Seção transversal da região posterior de um folículo demonstrando o lúmen repleto de espermatozoides (spz) e o epitélio cúbico com núcleos centrais (ep). Barras = 200 μ m.

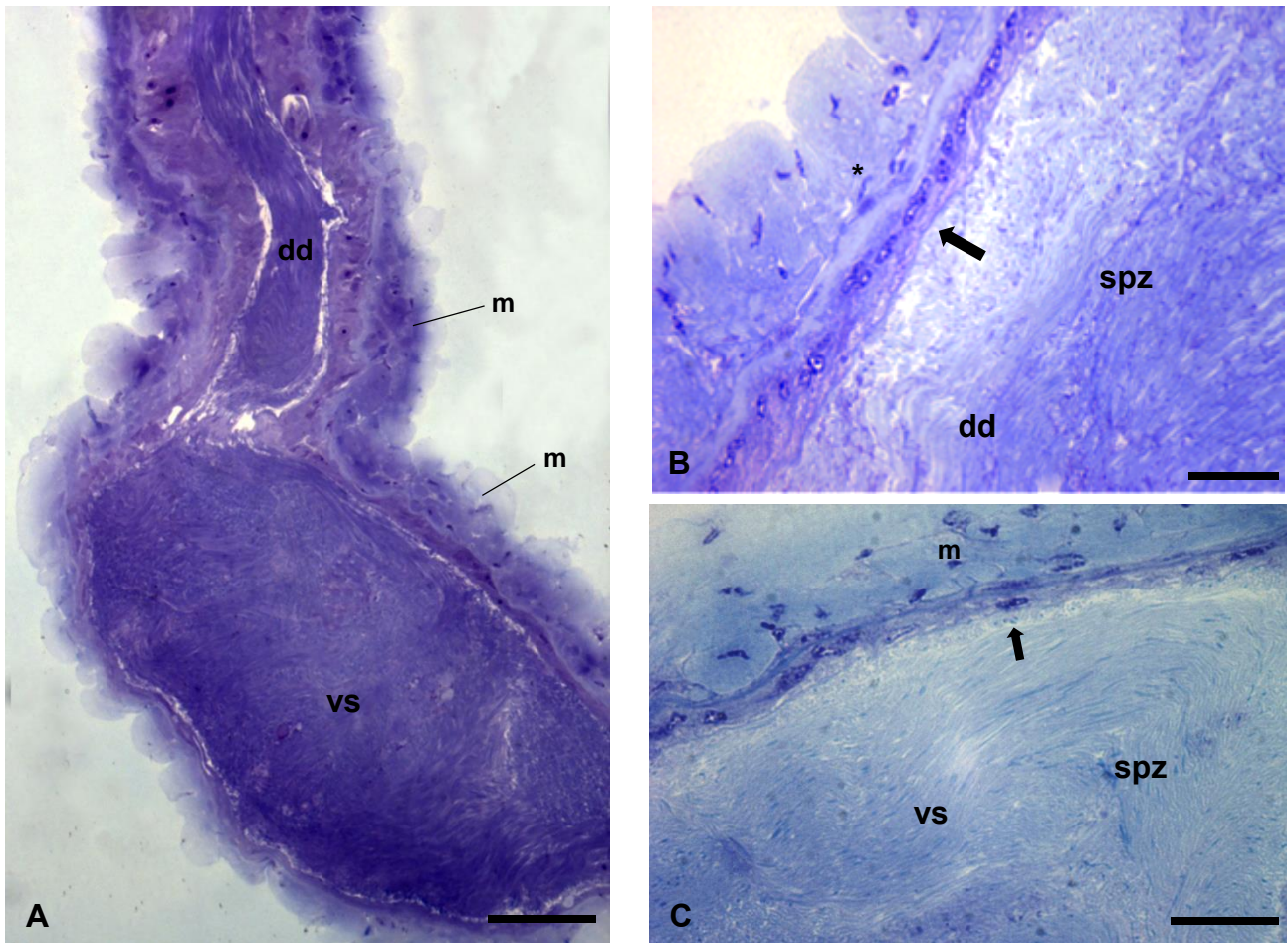


Fig 3. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*, *Belostoma stollii* e *Belostoma testaceopallidum*. **A-** Seção longitudinal da porção final do ducto deferente (dd), vesícula seminal (vs) e a camada muscular (m) de *B. plebejum*. **B-** Seção longitudinal do ducto deferente (dd) de *B. stollii* demonstrando o epitélio o epitélio simples, cúbico com núcleos centrais (seta), a grande camada muscular (asterisco) e o lúmen repleto de espermatozoides (spz). **C-** Seção transversal da vesícula seminal demonstrando o epitélio simples, pavimentoso com núcleos esféricos e basais (seta), a camada muscular (m) e os espermatozoides (spz). Barras = 150 μ m.

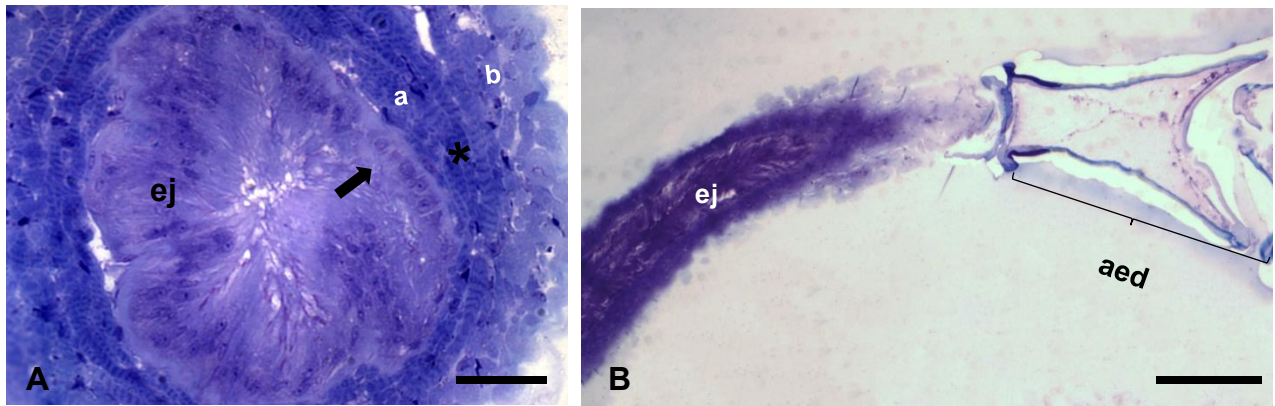


Fig 4. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Belostoma plebejum*, *Belostoma stollii* e *Belostoma testaceopallidum*. **A-** Seção transversal do ducto ejaculatório (ej) de *B. plebejum*. O asterisco indica a ampla camada muscular: a – Camada circular e b – Camada longitudinal e a seta indica o epitélio simples pseudoestratificado. **B-** Seção longitudinal do ducto ejaculatório (ej) de *B. plebejum* que termina em um edeago esclerotizado (aed). Barras = 120 μ m.

Referências bibliográficas

- ADAMS, T. S. Morphology of the internal reproductive system of the male and female two-spotted stink bug, *Perillus bioculatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) and the transfer of products during mating. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 39, p. 45-53, 2001.
- ALEVI, K. C. C.; PEREIRA, L. L. V.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; TABOGA, S. R.; ITOYAMA, M. M. Histological and ultrastructural analysis of spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, p. 1-6, 2015.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 1-10, 2010.
- ARAÚJO, V. A.; LINO-NETO, J.; RAMALHO, F. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). **Micron**, v. 42, p. 560-677, 2011.
- ARAÚJO, V. A.; SERRÃO, J. E.; MOREIRA, J.; BÃO, S. N.; LINO-NETO, J. Ultrastructure of spermatozoa in two solitary bee species with an emphasis on synapomorphic traits shared in the Family Apidae. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 74-80, 2012.
- BATTUM, K. E. H.; HEMING, B. S. Structure, function and evolutionary significance of the reproductive system in males of *Hebrus ruficeps* and *H. pusillus* (Heteroptera, Gerromorpha, Hebridae). **Journal of morphology**, v. 202, p. 281-323, 1989.
- BHARGAVA, S. Morphology, musculature and innervation of the reproductive organs of *Lethocerus Indicum* (Hemiptera: Belostomatidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 40, n. 1, p. 111-124, 1967.
- BUSCHINI, M. L. T. Life-history and sex allocation in *Trypoxylon* (syn. *Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). **Journal Zoological Systemic and Evolution Research**, v. 45, p. 206-213, 2007.
- CHAPMAN, R. F. The Insects: Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press, 770 pp, 1998.
- CHIANG, R. G.; CHIANG, J. A.; SARQUIS, O.; LIMA, M. M. Morphology of reproductive accessory glands in eight species of blood-feeding Hemiptera (Hemiptera, Reduviidae) insect vectors of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 122, n. 2, p. 196-204, 2012.
- FREITAS, S. P. C.; GONÇALVES, T. C. M.; SERRÃO, J. E.; COSTA, J.; SANTOS-MALLET, J. R. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Micron**, v. 41, n. 5, p. 518-525, 2010.
- GLOWACKA, E.; KUZNETSOVA, V. G.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. Testis follicle number in Psyllids (Psylloidea, Homoptera) as an anatomical feature in studies of systematic relations within the group. **Folia Biologica**, v. 43, p. 115-124, 1995.

- GRASSÉ, D. G. Ejaculate esterase-6 and initial sperm use by female *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 27, p. 641-650, 1982.
- GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V. G.; SIMOV, N.; LANGOUROV, M.; DALAKCHIEVA, S. Sex chromosome pre-reduction in male meiosis of *Lethocerus patruelis* (Stål, 1854) (Heteroptera, Belostomatidae) with some notes on the distribution of the species. **ZooKeys**, v. 319, p. 119–135, 2013.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 4th ed., 584 pp, 2010.
- JAWALE, S. M.; RANADE, D. R. Morphology of the ovaries of *Sphaerodema (Diplonychus) rusticum* (Heteroptera, Belostomatidae). **Journal of Morphology**, v. 205, p. 183-192, 1990.
- KARAKAYA, G.; ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Structure of the male reproductive system in *Coreus marginatus* (L.) (Hemiptera: Coreidae). **Turkish Journal of Entomology**, v. 36, n. 2, p. 193-204, 2012.
- LAUCK, D. R.; MENKE, A. S. The higher classification of the Belostomatidae (Hemiptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, p. 644–657, 1961.
- LEE, Y. H.; LEE, C. E. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. **Zoological Science**, v. 9, p. 971-981, 1992.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H.; MANCINI, K.; MERCATI, D.; DALLAI, R. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). **Tissue and Cell**, v. 40, n. 3, p. 185–193, 2008.
- MENKE, A. S. Family Belostomatidae, pp. 76-86. In: Menke A. S. The semiaquatic and aquatic Hemiptera of California. **Bulletin of the California Insect Survey**, v. 21, p. 1-166, 1979.
- MONTGOMERY, T. H. Note on the genital organs of *Zaitha*. **The American Naturalist**, v. 34, n. 398, p. 119-121, 1900.
- MOREIRA, P. A.; ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J. Morphology of male reproductive system in Three Species of *Trypoxylon (Trypargilum)* Richards (Hymenoptera : Crabronidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 429-435, 2008.
- MRÓZ, E.; WOJCIECHOWSKI, W. The systematic position of the tribe Stenodemini (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae: Mirinae) in the light of the male internal reproductive system. **Journal of Natural History**, v. 45, n. 25-26, p. 1563–1588, 2011.
- ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. AMUTKAN, D. Morphology and histology of the male reproductive system in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera : Pentatomidae) based on optical and scanning electron microscopy. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 1, n. 4, p. 40–46, 2013.

- ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. The morphology and histology of the male reproductive system in *Dolycoris baccarum* Linnaeus 1758 (Heteroptera: Pentatomidae) - Light and scanning electron microscope studies. **Micron**, v. 44, n. 1, p. 101–106, 2013.
- ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Structure of male reproductive system and spermatogenesis of *Codophia varia* (Fabricius, 1787) (Heteroptera: Pentatomidae) by light and scanning electron microscopy. **Journal of the Entomological Research Society**, v. 16, p. 101–110, 2014.
- ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Ultrastructure of male reproductive system of *Eurydema ventrale* Kolenati 1846 (Heteroptera: Pentatomidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 78, p. 643–653, 2015.
- PAPÁČEK, M.; GELBIČ, I. Development of the male internal reproductive system in the saucer bug (*Ilyocoris cimicoides* L.) (Heteroptera, Naucoridae). Pp. 125-140. In: TONNER, M.; SOLDÁN, T. & BENNETTOVÁ B. (editors): **Regulation of Insect Reproduction IV**, Academia, Praha, 539 pp, 1989.
- PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T. Development of the male internal reproductive system in *Notonecta glauca* (Heteroptera, Notonectidae). Pp. 199-211. In: BENNETTOVÁ B., GELBIČ I. & SOLDÁN T. (eds.): **Advances in Regulation of Insect Reproduction**. Institute of Entomology, Czech Academy of Science, České Budějovice, 329 pp, 1992.
- PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T. Structure and development of the reproductive system in *Aphelocheirus aestivalis* (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae). **Acta Entomologica**, v. 48, n. 2, p. 299-318, 2008.
- PENDEGRAST, J. G. Studies on the reproductive organs of the Heteroptera with a consideration of their bearing on classification. **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 109, p. 1-63, 1957.
- PEREIRA, L. L. V.; ALEVI, K. C. C.; CASTANHOLE, M. M.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetics analysis and testis morphology of aquatic species of the families Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae, and Veliidae (Heteroptera). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 21, p. 1–10, 2015.
- POLHEMUS, J.; POLHEMUS, D. A. Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 379-391, 2008.
- REYES, A.; ESTÉVEZ, A. L. Predation on *Biomphalaria* sp. (Mollusca: Planorbidae) by three species of the Genus *Belostoma* (Heteroptera: Belostomatidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1033–1035, 2006.
- RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Eds.). *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ribeirão Preto. Holos Editora. 810 pp, 2012.
- RIBEIRO, J. R. I. A review of the species of *Belostoma* Latreille, 1807 (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) from the four southeastern Brazilian states. **Zootaxa**, v. 1807, n. 1477, p. 1–70, 2007.

SMITH, R. L. Evolution of paternal care in the giant water bugs (heteroptera: belostomatidae). In: J. C. Choe and B. J. Crespi (editors), **Social Behavior in Insects and Arachnids**, Cambridge, University Press, v. 16: 149, 1997.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. O estudo dos insetos. Tradução da 7ª edição de Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects. Belmont, California, Thomson Brooks/Cole, 809 pp, 2011.

UCELI, L. F.; PIROVANI, V. D.; VICENTE, N. M. F.; PIKART, T. G.; FERREIRA, P. S. F.; SERRÃO, J. E. Morphology of the reproductive and digestive tracts of *Adparaproba gabrieli* (Heteroptera: Miridae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 31, n. 4, p. 219-224, 2011.

WIECZOREK, K. Structure of the male reproductive system of *Anoecia (Anoecia) corni* Fabricius, 1775 (Hemiptera, Aphidoidea), a representative of the family Anoeciidae. **Acta Zoologica**, v. 89, p. 163-167, 2008.

Capítulo 2

Morfologia do sistema reprodutor masculino em duas espécies da família

Naucoridae (Hemiptera: Heteroptera)

1. Introdução

A grande variedade morfológica e os diversos ambientes ocupados por insetos da ordem Hemiptera, resultaram em diferentes estratégias e adaptações para a reprodução (Gullan & Cranston, 2010). A subordem Heteroptera, é dividida em sete infraordens (Schuh, 1979), sendo que a infraordem Nepomorpha contém os percevejos verdadeiramente aquáticos, que vivem em ambientes lóticos e lênticos, compreendendo mais de 2.400 espécies com ampla distribuição, exceto na Antártida (Polhemus & Polhemus, 2008).

No geral, o sistema reprodutor masculino nos insetos é formado por um par de testículos, ductos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e ducto ejaculatório (Chapman, 1998). Alguns autores descreveram a morfologia do sistema reprodutor para espécies das famílias Reduviidae (Freitas *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2012), Coreidae (Karakaya *et al.*, 2012), Miridae (Mróz & Wojciechowski, 2011; Uceli *et al.*, 2011), Pentatomidae (Araújo *et al.*, 2011; Özyurt *et al.*, 2015), Pyrrhocoridae (Sharma & Livingstone, 1978), Thaumastocoridae (Souza *et al.*, 2014), Hebridae (Battum & Heming, 1989), Naucoridae (Pápacek & Gelbic, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008), Gelastocoridae (Alevi *et al.*, 2015), Notonectidae (Papáček & Soldán, 1992 apud Papáček & Soldán, 2008) e Belostomatidae (Bhargava, 1967; Jawale & Ranade, 1990).

As variações na morfologia do sistema reprodutor masculino, como o número de folículos por testículo, a presença ou ausência de glândulas acessórias e diferenças anatomia em geral, tem gerado caracteres para estudos filogenéticos e contribuem para aumentar o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies. (Moreira *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2010; Karakaya *et al.*, 2012).

A família Naucoridae é a segunda mais diversa de Nepomorpha em termos de gêneros Neotropicais e a primeira em número de espécies, com mais de 180 táxons válidos (Polhemus & Polhemus, 2008). Os naucorídeos são conhecidos por serem

adaptados à vida em águas correntes, mas incluem também um grande número de espécies que vivem em águas estagnadas ou com pouco fluxo (Nieser & Melo, 1997).

As características morfológicas externas entre os naucorídeos são de difícil diagnóstico taxonômico, o que tem dificultado análises filogenéticas da família. Desta forma, torna-se importante a busca por novos caracteres que possam contribuir para o entendimento das relações evolutivas entre os representantes de Naucoridae. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo, ao descrever a anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino em duas espécies de Naucoridae, com o auxílio de microscopia de luz, contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva e fornecer caracteres que possam ser utilizados na sistemática.

2. Material e Métodos

Foram utilizados dez machos adultos de *Pelocoris subflavus* Montandon, 1898 coletados em uma lagoa artificial (19°12'22.4"S 46°07'51.2"W) situada no *Campus* Rio Paranaíba, Universidade Federal de Viçosa, município de Rio Paranaíba e seis machos de *Limnocoris porphyros* Nieser & Chen, 2001 coletados em um riacho (19°12' S, 43°30' W) às margens da rodovia na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. As coletas foram realizadas com o auxílio de redes entomológicas.

Microscopia de luz: Os sistemas reprodutores de cada espécie foram fixados em solução de Zamboni (Paraformaldeído, Tampão fosfato de Sorensen e solução saturada de ácido pícrico) 2.5%, 0.1 M, pH 7 (Stefanini & Martino, 1967) por um período de 4 a 6 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série alcoólica crescente (50° GL, 70° GL, 90° GL e absoluto) e incluído em resina glicol-metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha). Cortes de 2 µm foram corados pelo azul de Toluidina 0,05%, montados em lâminas e, posteriormente fotografados em microscópio de luz (Olympus BX-60, Japão). Para análise anatômica, logo após a fixação, alguns sistemas reprodutores também

foram fotografados em microscopia de Luz (Olympus BX-60, Japão) e em seguida, foram obtidas as ilustrações esquemáticas.

3. Resultados

A anatomia do sistema reprodutor em machos sexualmente maduros das espécies *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros* compreende um par de testículos, ductos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e um ducto ejaculatório (Fig. 1 A-D). Em ambas as espécies cada testículo possui sete folículos (Fig. 2 A-B). Em *P. subflavus* os folículos apresentam células em diferentes fases da espermatogênese (Fig. 2C), ao contrário de *L. porphyros*, no qual o testículo está em processo de redução, apresentando apenas espermatozoides já diferenciados e em cistos (Fig. 2D).

Os espermatozoides em ambas as espécies saem dos testículos em feixes e alcançam os ductos deferentes, que são longos, finos e apresentam uma grande camada muscular (Fig. 2 E-F). Os espermatozoides percorrem os ductos deferentes (Fig. 2G) até alcançarem uma região mais dilatada dos ductos, as vesículas seminais (Fig. 3E, 4D).

As vesículas seminais, em *P. subflavus* são longas e enoveladas junto as glândulas acessórias (Fig. 1 A-B, 3A) e em *L. porphyros* longas e espiraladas (Fig.1 C-D e 4A). O epitélio das vesículas seminais é simples, composto por células cúbicas, núcleos achatados apicais (*P. subflavus*) e basais (*L. porphyros*) (Fig. 3E, 4D).

As duas espécies possuem dois tipos de glândulas acessórias (Fig. 3A e 4B), uma com secreção translúcida (tipo I) (Fig. 3C e 4C) e outra com secreção transparente (tipo II) (Fig. 3D e 4B). Em *P. subflavus* a glândula do tipo I apresenta duas estruturas ovaladas adjacentes compostas por diversos lóbulos onde as secreções são produzidas e despejadas em um canal coletor comum (Fig. 3B). A partir dessas duas estruturas ovaladas se projetam os ductos que se enovelam junto as glândulas do tipo II e vesículas

seminais (Fig. 3 A-B). Em *L. porphyros* as glândulas acessórias dos dois tipos são alogadas e enoveladas, adjacentes as vesículas seminais (Fig. 1 C-D)

As vesículas seminais, local de armazenamento dos espermatozoides, desembocam no ducto ejaculatório único, apresentando em ambas as espécies epitélio simples, cúbico com núcleos esféricos e medianos (Fig. 5A). O ducto ejaculatório é revestido por uma fina cutícula, apresenta muitas camadas de musculatura circular e longitudinal e encerra-se em um edeago esclerotizado (Figura 5B).

4. Discussão

A anatomia geral dos sistemas reprodutores de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros* é similar ao descrito para outros Heteroptera, apresentando dois testículos, ductos deferentes, vesícula seminal, dois pares de glândulas acessórias e um ducto ejaculatório.

O número de folículos varia amplamente entre as espécies de Heteroptera e é uma característica que pode ser usada na sistemática (Akingbohunge, 1983; Glowacka *et al.*, 1995; Freitas *et al.*, 2008). As duas espécies estudadas apresentam sete folículos, mesmo número encontrado em outras espécies pertencentes a mesma família, *Naucoris cimicoides* e *Ilyocoris cimicoides* (Rawat, 1939; Papáček & Gelbič, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008). Em muitas famílias de Heteroptera foram observados testículos consistindo de sete folículos, sendo esta uma característica considerada plesiomórfica para o grupo (Akingbohunge, 1983). No entanto, o número de folículos diverge entre as famílias de Heteroptera aquáticos e mesmo entre as espécies, sendo descrito para Belostomatidae testículos contendo cinco folículos em *Belostoma anurum* e *B. micantulum* (Pereira *et al.*, 2015) e um folículo em *Lethocerus patruelis* (Grozeva *et al.*, 2013).

Para as espécies *Belostoma plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum* (Belostomatidae) recentemente foi verificado testículos contendo cinco folículos (Dados não publicados, Capítulo 1). Já para as espécies *Montandonius angulatus* (Gelastocoridae), *Rheumatobates crassifemur* (Gerridae), *Martarega membranacea* e *M. brasiliensis* (Notonectidae) (Pereira *et al.*, 2015). Já em *Aphelocheirus aestivalis* (Aphelocheiridae) quatro folículos foram observados (Papáček & Soldán, 2008).

A produção dos espermatozoides, que ocorre nos folículos, só é observada ao longo do primeiro mês da fase adulta e a partir do segundo ao sexto mês, meses em que os machos copulam, os testículos entram em processo de redução (Papáček & Gelbič, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008). Este mesmo processo observado em *Limnocois porphyros*, foi descrito para as espécies *Naucoris cimicoides* (Rawat, 1939), *Ilyiocois cimicoides* (Naucoridae) (Papáček & Soldán, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008), *Notonecta glauca* (Notonectidae) (Papáček & Soldán, 1992 apud Papáček & Soldán, 2008), *Micronecta scholtzi*, *M. griseola* e *M. poweri* (Micronectidae) (Grozeva *et al.*, 2008), sendo esta característica considerada como apormorfia em Nepomorpha (Papáček, 1990; Grozeva *et al.*, 2008).

Em uma classificação mais aceita antigamente de Nepomorpha, a superfamília Naucoroidea consistia das famílias Naucoridae, Aphelocheiridae e Potamocoridae (Stys & Jansson, 1988). Posteriormente Mahner (1993) utilizando o método cladístico tradicional encontrou Naucoridae e Aphelocheiridae como grupos irmãos, na superfamília Naucoroidea e discute a incerta posição da família Potamocoridae. O estudo de Hebsgaard *et al.* (2004), utilizando caracteres gerados a partir de dados moleculares e morfológicos, obteve como resultado Naucoroidea como monofilética, somente com a família Naucoridae e a criação da superfamília Aphelocheiroidea que reúne agora Aphelocheiridae e Potamocoridae.

Sendo assim, ao comparar a produção contínua de espermatozoides que ocorre na família Aphelocheiridae (Papáček & Soldán, 2008), com o processo de redução dos

testículos descrito anteriormente e no presente estudo para Naucoridae, a hipótese de Hebsgaard *et al.* (2004) é sustentada, com a monofilia de Naucoridae e a formação da superfamília Aphelocheiroidae (Aphelocheiridae + Potamocoridae).

Em Belostomatidae, Gerridae, Hydrometridae, Veliidae e Mesoveliidae, as vesículas seminais não apresentam enovelamento (Pendergrast, 1957, Bhargava, 1967; Grozeva *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo verificou-se que as vesículas seminais longas e enoveladas junto a região das glândulas acessórias de *P. subflavus* e *L. porphyros* se diferenciam de outras famílias de Heteroptera aquáticos.

Os estudos sobre a estrutura das glândulas acessórias de insetos machos têm demonstrado que as glândulas variam não só em o tamanho, forma, e número entre as espécies, mas também na morfologia das células epiteliais e tipos de secreções dentro das glândulas (Kruger *et al.*, 2014).

Em *P. subflavus* e *L. porphyros* os dois pares das glândulas são bem desenvolvidos e repletos de secreção. A glândula do tipo I em *P. subflavus* é semelhante ao já descrito para as espécies *Naucoris cimicoides* e *Ilyocoris cimicoides*, com a presença de duas estruturas ovaladas que se estendem em ductos repletos de secreção. Também, as glândulas do tipo II apresentam o mesmo aspecto e tipo de secreção de *N. cimicoides* e *I. cimicoides* (Rawat, 1939; Papáček & Soldán, 1989 apud Papáček & Soldán, 2008). Estas secreções estão associadas à ativação e manutenção dos espermatozoides, e nas fêmeas a indução na ovulação, maturação dos ovos, aceleração na ovoposição e também na formação do chamado plug de cópula. Além disso, são relacionadas a mecanismos para garantir a fidelidade de cópula, com a formação de uma barreira para evitar novos acasalamentos e alteração no comportamento copulatório das fêmeas (Leopold, 1976; Gillott, 2003).

Em Nepomorpha as famílias Belostomatidae, Hebridae, Hydrometridae e Veliidae não apresentam glândulas acessórias (Pendergrast, 1957). O estudo das glândulas acessórias poderiam gerar caracteres capazes de serem aplicados em estudos

filogenéticos. De fato, caracteres gerados a partir do número de pares, origem e estrutura histológica das glândulas acessórias foram utilizados para propor uma chave com o objetivo de auxiliar nos estudos das espécies da família Bruchidae (Coleoptera) (Sigh, 1978). No entanto, para os Hemiptera em geral, não existe este tipo de informação disponível.

Sendo assim, para um melhor conhecimento da biologia reprodutiva masculina e dos possíveis caracteres que podem ser úteis para estudos futuros na sistemática de Heteroptera, estudos histológicos envolvendo novas espécies da famílias Naucoridae devem ser realizados.

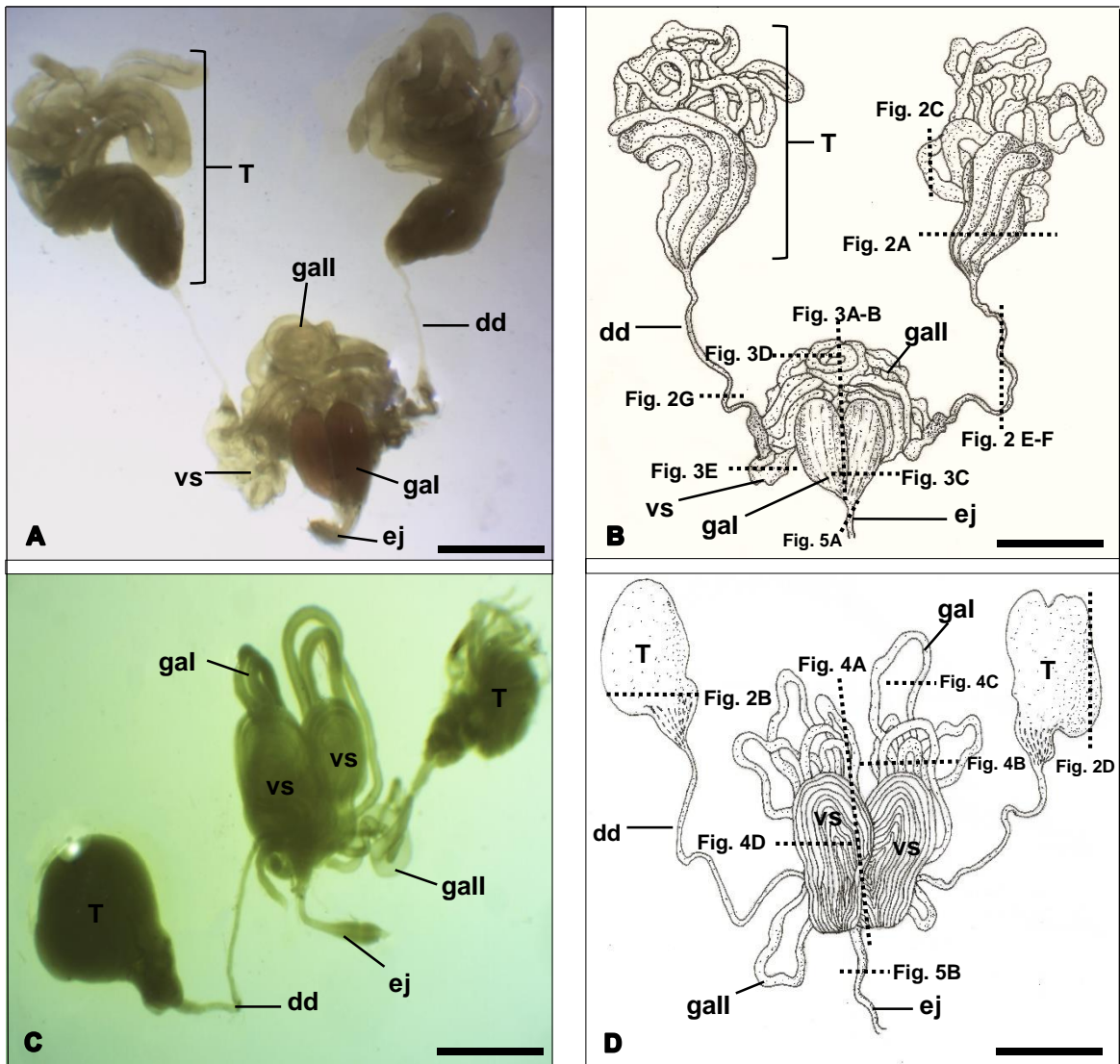


Fig 1. Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros*. **A**- Sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus*: Testículos (T), ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs), glândulas acessórias gal e gall e ducto ejaculatório (ej). **B** - Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* apontando os locais das seções relativas aos cortes histológicos das figuras 2, 3 e 5. **C** - Sistema reprodutor masculino de *Limnocoris porphyros*: Testículos (T), ductos deferentes (dd), vesículas seminais (vs), glândulas acessórias ga1 e ga2 e ducto ejaculatório (ej). **D** - Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de *Limnocoris porphyros* apontando os locais das seções relativas aos cortes histológicos das figuras 2, 4 e 5. Barra: 40 mm.

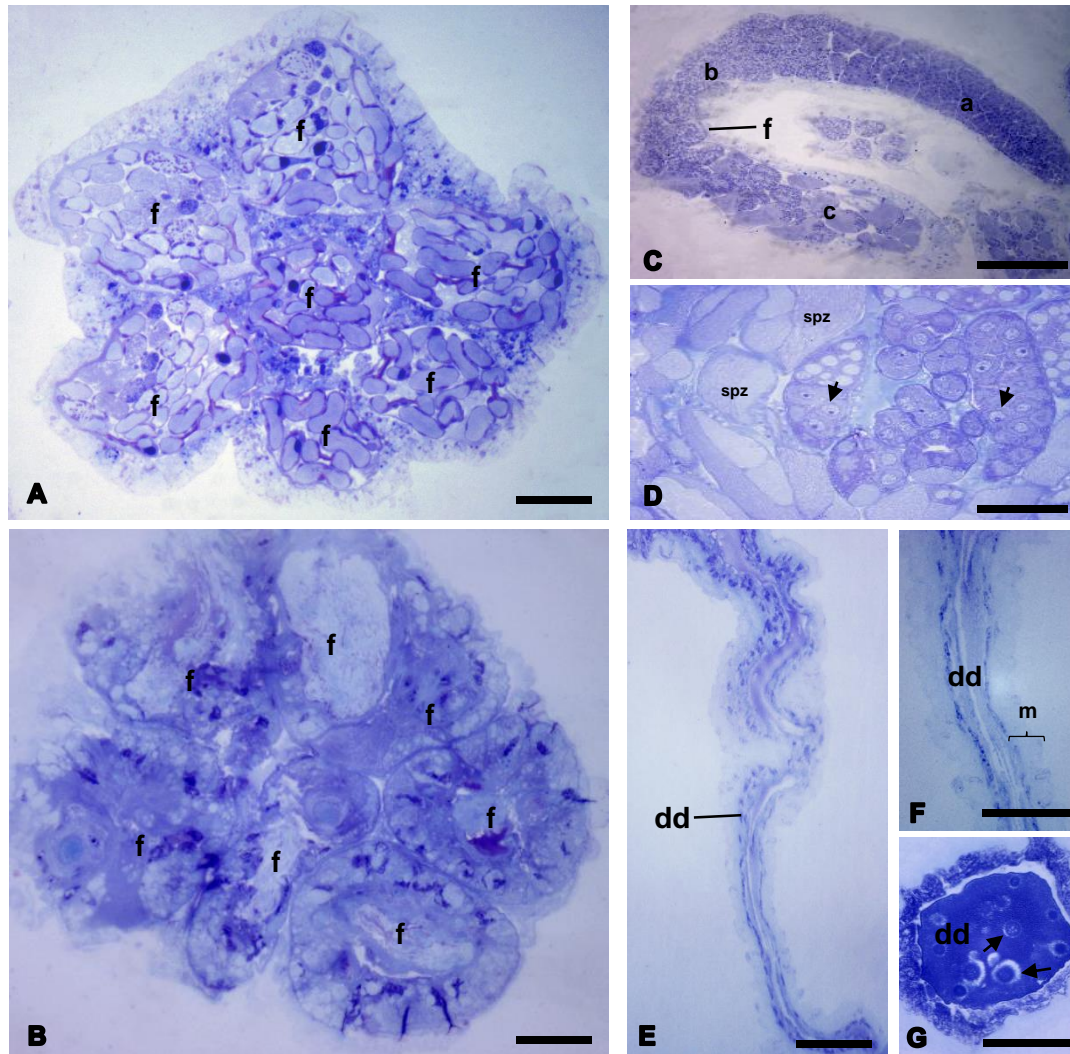


Fig 2. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros*. **A-** Seção transversal do testículo de *P. subflavus* mostrando os sete folículos (f). **B-** Seção transversal do testículo de *L. porphyros* mostrando os sete folículos (f). **C-** Folículo (f) de *P. subflavus* evidenciando as três zonas da espermatogênese: a- Zona de crescimento, b- Zona de maturação e c- Zona de diferenciação. **D-** Seção transversal do testículo de *L. porphyros* demonstrando a redução testicular e a presença de espermatozoides diferenciados (spz) e cistos (setas). **E-** Seção longitudinal do longo e fino ducto deferente (dd) de *P. subflavus*. **F-** Seção longitudinal do ducto deferente (dd) de *P. subflavus* demonstrando a ampla camada muscular (m). **G-** Seção transversal do ducto deferente (dd) de *P. subflavus* mostrando a presença de espermatozoides no lúmen (setas). Barras = 200 μ m.

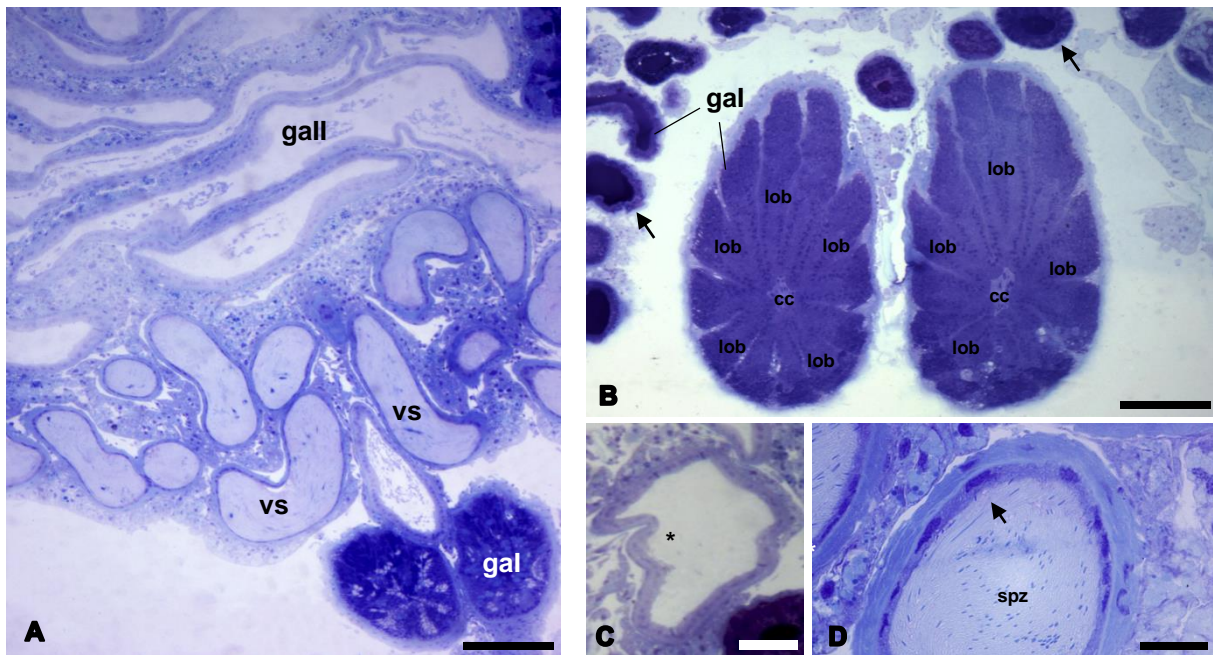


Fig 3. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus*. **A-** Seção longitudinal da região das glândulas acessórias mostrando os dois tipos: Tipo I (gal) e tipo II (gall) e as vesículas seminais (vs). **B-** Seção longitudinal das glândulas do tipo I demonstrando os multilóbulos (lob) na região ovalada, canal coletor comum (cc) e a região dos ductos (setas). **C-** Seção transversal da glândula do tipo II mostrando a secreção transparente (asterisco). **D-** Seção transversal da vesícula seminal que apresenta epitélio simples, pavimentoso com núcleos achatados e apicais (seta) e o lúmen repleto de espermatozoides (spz). Barras = 120 μ m.

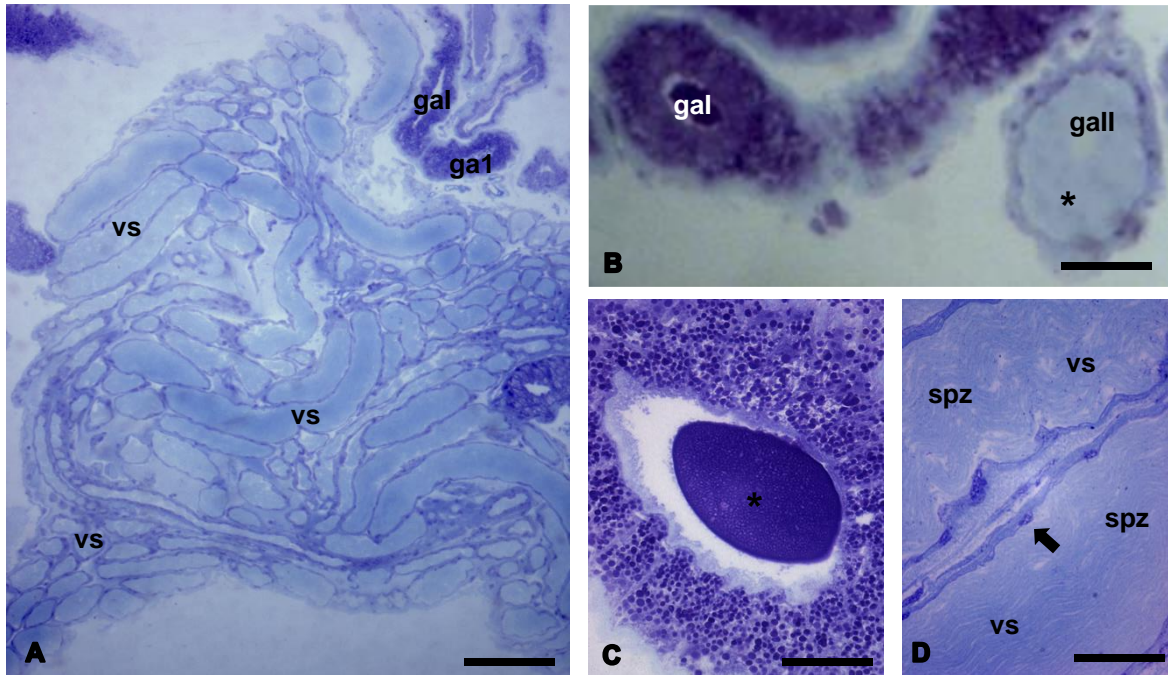


Fig 4. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Limnocoris porphyros*. **A-** Seção longitudinal da longa vesícula seminal (vs) e glândulas acessórias do tipo I (gal). **B-** Seção transversal das glândulas acessórias demonstrando os dois tipos: Tipo I (gal) e tipo II (gall). O asterisco indica a secreção transparente da glândula do tipo II. **C-** Seção transversal da glândula acessória do tipo I demonstrando a secreção translúcida (asterico). **D-** Seção transversal das vesículas seminais (vs), demonstrando o epitélio simples, pavimentoso com núcleos achatados e basais (seta) e o lúmen repleto de espermatozoides (spz). Barras = 120 μm .

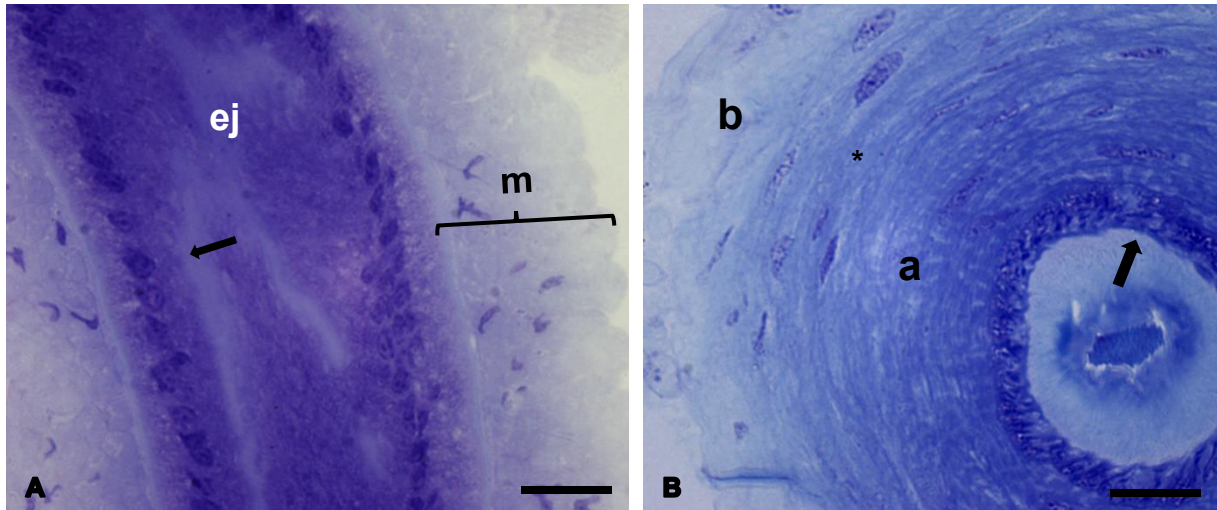


Fig 5. Histologia do sistema reprodutor masculino de *Pelocoris subflavus* e *Limnocoris porphyros*. **A-** Seção longitudinal do ducto ejaculatório (ej) de *Pelocoris subflavus* demonstrando a extensa camada muscular (m) e epitélio simples, cúbico com núcleos esféricos e medianos (seta) **B-** Seção transversal do ducto ejaculatório (ej) de *Limnocoris porphyros*. O asterisco indica a ampla camada muscular: a – Camada circular e b – Camada longitudinal e a seta indica a cutícula ectodérmica que reveste o epitélio. Barras = 100 μ m.

Referências bibliográficas

- AKINGBOHUNGBE, A. E. Variation in testis follicle number in the Miridae (Hemiptera, Heteroptera) and its relationship to the higher classification of the family. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, p. 37–43, 1983.
- ALEVI, K. C. C.; PEREIRA, L. L. V.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; TABOGA, S. R.; ITOYAMA, M. M. Histological and ultrastructural analysis of spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, p. 1-6, 2015.
- ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; NEVES, C. A. ; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, p. 129– 137, 2005.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 1-10, 2010.
- BATTUM, K. E. H.; HEMING, B. S. Structure, function and evolutionary significance of the reproductive system in males of *Hebrus ruficeps* and *H. pusillus* (Heteroptera, Gerromorpha, Hebridae). **Journal of morphology**, v. 202, p. 281-323, 1989.
- BHARGAVA, S. Morphology, musculature and innervation of the reproductive organs of *Lethocerus Indicum* (Hemiptera: Belostomatidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 40, n. 1, p. 111–124, 1967.
- CHAPMAN, R. F. The Insects: Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press, 770 pp, 1998.
- CHIANG, R. G.; CHIANG, J. A.; SARQUIS, O.; LIMA, M. M. Morphology of reproductive accessory glands in eight species of blood-feeding Hemiptera (Hemiptera, Reduviidae) insect vectors of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 122, n. 2, p. 196–204, 2012.
- DALLACQUA, R. P.; CRUZ-LAMDIM, C. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, p. 276-281, 2003.
- FREITAS, P. C.; SANTOS-MALLET, J. R.; COSTA, J.; SOUZA, A. L. B.; SERRÃO, J. E.; GONÇALVES, T. C. M. A comparative study of testis follicles in species of *Triatoma* (Hemiptera, Triatominae). **Animal Biology**, v. 58, p. 227-233, 2008.
- FREITAS, S. P. C.; GONÇALVES, T. C. M.; SERRÃO, J. E.; COSTA, J.; SANTOS-MALLET, J. R. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Micron**, v. 41, n. 5, p. 518–525, 2010.
- GILLOT, C. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 163-184, 2003.

GLOWACKA, E.; KUZNETSOVA, V. G.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. Testis follicle number in Psyllids (Psylloidea, Homoptera) as an anatomical feature in studies of systematic relations within the group. **Folia Biologica**, v. 43, p. 115-124, 1995.

GROZEVA, S.; SIMOV, N.; NOKKALA, S. Achiasmatic male meiosis in three *Micronecta* species (Heteroptera: Nepomorpha: Micronectidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2008.

GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V. G.; SIMOV, N.; LANGOUROV, M.; DALAKCHIEVA, S. Sex chromosome pre-reduction in male meiosis of *Lethocerus patruelis* (Stål, 1854) (Heteroptera, Belostomatidae) with some notes on the distribution of the species. **ZooKeys**, v. 319, p. 119–135, 2013.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 4th ed., 584 pp, 2010.

HEBSGAARD, M. B.; ANDERSEN, N. M.; DAMGAARD, J. Phylogeny of true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera-Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. **Systematic Entomology**, v. 29, p. 488-508, 2004.

HORTON, D. R.; LEWIS, T. M. Variation in male and female genitalia among ten species of North American *Anthocoris* (Hemiptera: Heteroptera: Anthocoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 6, p. 1260-1278, 2011.

JAWALE, S. M.; RANADE, D. R. Morphology of the ovaries of *Sphaerodema (Diplonychus) rusticum* (Heteroptera, Belostomatidae). **Journal of Morphology**, v. 205, p. 183-192, 1990.

KARAKAYA, G.; ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Structure of the male reproductive system in *Coreus marginatus* (L.) (Hemiptera: Coreidae). **Turkish Journal of Entomology**, v. 36, n. 2, p. 193-204, 2012.

KRÜGER, S.; FERENZ, H.; RANDALL, M.; HODGSON, A. N. Structure of male reproductive accessory glands of *Pterostichus nigrita* (Coleoptera: Carabidae), their role in spermatophore formation. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 58, n. 2, p. 75-88, 2014.

LEOPOLD, R. A. The role of male accessory glands in insect reproduction. *Annual Review of Entomology*, v. 21, p. 199–221, 1976.

MAHNER, M. *Systema cryptoceratum phylogenicum* (Insecta, Heteroptera). **Zoologica**, v. 43, 302 pp, 1993.

MOREIRA, P. A.; ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J. Morphology of male reproductive system in Three Species of *Trypoxylon (Trypargilum)* Richards (Hymenoptera : Crabronidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 429–435, 2008.

NIESER, N.; MELO, A. L. Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais. Editora UFMG, Belo Horizonte, 177 pp, 1997.

ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. The morphology and histology of the male reproductive system in *Dolycoris baccarum* Linnaeus 1758 (Heteroptera: Pentatomidae) - Light and scanning electron microscope studies. **Micron**, v. 44, n. 1, p. 101–106, 2013

PAPÁČEK, M.; GELBIČ, I. Development of the male internal reproductive system in the saucer bug (*Ilyocoris cimicoides* L.) (Heteroptera, Naucoridae). Pp. 125-140. In: TONNER, M.; SOLDÁN, T. & BENNETTOVÁ B. (editors): **Regulation of Insect Reproduction IV**, Academia, Praha, 539 pp, 1989.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T; 1992: Development of the male internal reproductive system in *Notonecta glauca* (Heteroptera, Notonectidae). Pp. 199-211. In: BENNETTOVÁ B., GELBIČ I. & SOLDÁN T. (eds.): **Advances in Regulation of Insect Reproduction**. Institute of Entomology, Czech Academy of Science, České Budějovice, 329 pp, 1992.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T. Structure and development of the reproductive system in *Aphelocheirus aestivalis* (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae). **Acta Entomologica**, v. 48, n. 2, p. 299-318, 2008.

PENDEGRAST, J. G. Studies on the reproductive organs of the Heteroptera with a consideration of their bearing on classification. **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 109, p. 1–63, 1957.

PEREIRA, L. L. V; ALEVI, K. C. C.; CASTANHOLE, M. M.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetics analysis and testis morphology of aquatic species of the families Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae, and Veliidae (Heteroptera). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 21, p. 1–10, 2015.

POLHEMUS, J.; POLHEMUS, D. A. Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 379-391, 2008.

RAWAT, B. L. On the habits, metamorphosis and reproductive organs of *Naucoris cimicoides* L. (Hemiptera-Heteroptera). **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 88, p. 119-138, 1939.

SCHUH, R. T. Review of Evolutionary trends in Heteroptera. Parte II. Mouthpart-structures and feeding strategies, by Cobben RH. **Systematic Zoology**, v. 28, p. 653-656, 1979.

SHARMA, M. C.; LIVINGSTONE, D. Studies on the functional morphology of *Odontopus nigricornis* Stål (Heteroptera: Pyrrhocoridae). **Journal of Natural History**, v. 12, p. 121-132, 1978.

SIGH, T. The male accessory glands in Bruchidae (Coleoptera) and their taxonomic significance. **Scandinavian Entomology**, v. 9, p. 198-203, 1978.

SOUZA, G. K.; PIKART, T. G.; ZANUNCIO, T. V.; WILCKEN, C. F.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Reproductive tract histology of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, n. 4, p. 853-857, 2014.

STYS, P.; JANSSON, A. Check-list of recent family-group and genus-group names of Nepomorpha (Heteroptera) of the world. **Acta Entomologica Fennica**, v. 50, p. 1–44, 1988.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A morfologia do sistema reprodutor das espécies *Belostoma plebejum*, *B. stollii* e *B. testaceopallidum* se assemelha ao de outras espécies do mesmo gênero descritas anteriormente na literatura, com os testículos constituídos de duas regiões (folículos envelados e alongados) e formados por cinco folículos;
- O número de espermatozoides por cisto descrito para as espécies de *Belostoma* e conseqüentemente o número de ciclos mitóticos é uma característica com potencial aplicação em inferências filogenéticas;
- Os testículos em Naucoridae possuem sete folículos, assim como as espécies da mesma família citadas em outros estudos. Para o gênero *Belostoma* (Belostomatidae) foram observados cinco folículos por testículo e para as famílias Notonectidae e Gelastocoridae apenas dois. Esta variação vem sendo usada em estudos filogenéticos;
- As glândulas acessórias do tipo 1 em *Limnocoris porphyros* se diferenciam das demais espécies descritas de Naucoridae pela ausência das duas estruturas ovaladas que se estendem em ductos;
- Os exemplares de *Pelocoris subflavus* não apresentam as duas estruturas ovaladas que se prolongam em ductos nas glândulas do tipo 1, diferentemente de outras espécies da família;
- O processo de redução dos testículos descrito para a espécie *Limnocoris porphyros* está de acordo com a hipótese de Hebsgaard *et al.* (2004), sobre monofiletismo da superfamília Naucoroidea e a formação da superfamília Aphelocheiroidea, com as famílias Aphelocheiridae + Potamocoridae;
- Há a necessidade da descrição da anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino em um maior número de espécies de heterópteros para possibilitar assim inferências na sistemática do grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T. S. Morphology of the internal reproductive system of the male and female two-spotted stink bug, *Perillus bioculatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) and the transfer of products during mating. **Invertebrate Reproduction & Development**, v39, p. 45-53, 2001.
- AKINGBOHUNGBE, A. E. Variation in testis follicle number in the Miridae (Hemiptera, Heteroptera) and its relationship to the higher classification of the family. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, p. 37–43, 1983.
- ALEVI, K. C. C.; PEREIRA, L. L. V.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; TABOGA, S. R.; ITOYAMA, M. M. Histological and ultrastructural analysis of spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, p. 1-6, 2015.
- ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; NEVES, C. A. ; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, p. 129– 137, 2005.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 1-10, 2010.
- ARAÚJO, V. A.; LINO-NETO, J.; RAMALHO, F. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). **Micron**, v. 42, p. 560-677, 2011.
- ARAÚJO, V. A.; SERRÃO, J. E.; MOREIRA, J.; BÃO, S. N.; LINO-NETO, J. Ultrastructure of spermatozoa in two solitary bee species with an emphasis on synapomorphic traits shared in the Family Apidae. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 74-80, 2012.
- BATTUM, K. E. H.; HEMING, B. S. Structure, function and evolutionary significance of the reproductive system in males of *Hebrus ruficeps* and *H. pusillus* (Heteroptera, Gerromorpha, Hebridae). **Journal of morphology**, v. 202, p. 281-323, 1989.
- BHARGAVA, S. Morphology, musculature and innervation of the reproductive organs of *Lethocerus indicum* (Hemiptera: Belostomatidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 40, n. 1, p. 111–124, 1967.
- BROZEK, J. Phylogenetic Signals from Nepomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) Mouthparts: Stylets bundle, sense organs, and labial segments. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-30, 2014.
- BUSCHINI, M. L. T. Life-history and sex allocation in *Trypoxylon* (syn. *Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). **Journal Zoological Systemic and Evolution Research**, v. 45, p. 206-213, 2007.

- CARVER, M.; GROSS, G. F.; WOODWARD, T. E. Hemiptera (bugs, leaf-hoppers, cicadas, aphids, scale insects, etc.). In: NAUMANN, I.D. (Ed.). **The insects of Australia**. Melbourne University Press, Melbourne, Australia, p. 429-509, 1991.
- CHAPMAN, R. F. The Insects: Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press, 770 pp, 1998.
- CHEN, P. S. The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands their secretion. **Annual Review of Entomology**, v. 29, p. 233-255, 1984.
- CHIANG, R. G.; CHIANG, J. A.; SARQUIS, O.; LIMA, M. M. Morphology of reproductive accessory glands in eight species of blood-feeding Hemiptera (Hemiptera, Reduviidae) insect vectors of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 122, n. 2, p. 196–204, 2012.
- CONSOLI, R. A. G. B.; PEREIRA, M. H.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. *Belostoma micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 577-578, 1989.
- COSTA LIMA. Insetos do Brasil. 2º tomo, Hemípteros. Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro, série didática nº3, 352 pp, 1940.
- CROWL, T. A.; ALEXANDER, J. E. JR. Parental care and foraging ability in male water bugs (*Belostoma flumineum*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 513-515, 1989.
- DALLACQUA, R. P.; CRUZ-LAMDIM, C. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, p. 276-281, 2003.
- DAMGAARD, J.; ANDERSEN, N. M.; MEIER, R. Combining molecular and morphological analyses of water strider phylogeny (Hemiptera–Heteroptera, Gerrromorpha): effects of alignment and taxon sampling. **Systematic Entomology**, v. 30, p. 289-309, 2005.
- DE CARLO, J. A. Estudio comparativo del aparato genital macho de *Belostoma* sp. y *Abedus* sp. (Hemiptera, Belostomatidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 31, p. 115–119, 1968.
- EBONG, S. M. A.; EYANGO, S.; MARION, E.; LANDIER, J.; MARSOLLIER, L.; GUÉGAN, J. F.; LEGALL, P. Survey of water bugs in Bankim, a new Buruli ulcer endemic area in Cameroon. **Journal of Tropical Medicine**, p. 1–8, 2012.
- FERREIRA, A.; ABDALLA, F. C.; KERR, W.E.; CRUZ-LANDIM, C. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 569-576, 2004.
- FREITAS, P. C.; SANTOS-MALLET, J. R.; COSTA, J.; SOUZA, A. L. B.; SERRÃO, J. E.; GONÇALVES, T. C. M. A comparative study of testis follicles in species of *Triatoma* (Hemiptera, Triatominae). **Animal Biology**, v. 58, p. 227-233, 2008.
- FREITAS, S. P. C.; GONÇALVES, T. C. M.; SERRÃO, J. E.; COSTA, J.; SANTOS-MALLET, J. R. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure

- of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Micron**, v. 41, n. 5, p. 518–525, 2010.
- GILLOT, C. Arthropoda - Insecta. Reproductive Biology of Invertebrates (Adiyodi KG, Adiyodi RG, eds). Wiley: New York, pp. 319-371, 1988.
- GILLOT, C. Entomology. Canada, Springer, 831 pp, 2005.
- GILLOT, C. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 163-184, 2003.
- GLOWACKA, E.; KUZNETSOVA, V. G.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. Testis follicle number in Psyllids (Psylloidea, Homoptera) as an anatomical feature in studies of systematic relations within the group. **Folia Biologica**, v. 43, p. 115-124, 1995.
- GRASSÉ, D. G. Ejaculate esterase-6 and initial sperm use by female *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 27, p. 641-650, 1982.
- GRAZIA, J.; CAVICHIOLI, R. R.; WOLFF, V. R. S.; FERNANDES, J. A. M.; TAKIYA, D. M. Hemiptera. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Eds.). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Ribeirão Preto: Holos, 810 pp, 2012.
- GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V. G.; SIMOV, N.; LANGOUROV, M.; DALAKCHIEVA, S. Sex chromosome pre-reduction in male meiosis of *Lethocerus patruelis* (Stål, 1854) (Heteroptera, Belostomatidae) with some notes on the distribution of the species. **ZooKeys**, v. 319, p. 119–135, 2013.
- GROZEVA, S.; SIMOV, N.; NOKKALA, S. Achiasmatic male meiosis in three *Micronecta* species (Heteroptera: Nepomophrha: Micronectidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2008.
- GUILBERT, E.; DAMGAARD, J.; D'HAESE, C. A. Phylogeny of the lacebugs (Insecta: Heteroptera: Tingidae) using morphological and molecular data. **Systematic Entomology**, v. 39, p. 431-441, 2014.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 4th ed., 584 pp, 2010.
- HEBSGAARD, M. B.; ANDERSEN, N. M.; DAMGAARD, J. Phylogeny of true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera-Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. **Systematic Entomology**, v. 29, p. 488-508, 2004.
- HENRY, T. J. Biodiversity of Heteroptera. Chapter 10. Pp. 223–263 In: Footitt, R.G.; Adler, P.H. (eds) 2009: Insect Biodiversity: Science and Society. Wiley-Backwell, Oxford, U.K, 656 pp, 2009.
- HORTON, D. R.; LEWIS, T. M. Variation in male and female genitalia among ten species of North American *Anthocoris* (Hemiptera: Heteroptera: Anthocoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 6, p. 1260-1278, 2011.

- HUA, J.; LI, M.; DONG, P.; CUI, Y.; XIE, Y.; BU, W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1-11, 2009.
- HUNGERFORD, H. B. Food of Corixids in "The Biology and ecology of aquatic and semiaquatic Hemiptera". **Science Bulletin**, v. 11, p. 234-249, 1919.
- JAWALE, S. M.; RANADE, D. R. Morphology of the ovaries of *Sphaerodema (Diplonychus) rusticum* (Heteroptera, Belostomatidae). **Journal of Morphology**, v. 205, p. 183-192, 1990.
- KARAKAYA, G.; ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Structure of the male reproductive system in *Coreus marginatus* (L.) (Hemiptera: Coreidae). **Turkish Journal of Entomology**, v. 36, n. 2, p. 193-204, 2012.
- KRÜGER, S.; FERENZ, H.; RANDALL, M.; HODGSON, A. N. Structure of male reproductive accessory glands of *Pterostichus nigrita* (Coleoptera: Carabidae), their role in spermatophore formation. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 58, n. 2, p. 75-88, 2014.
- LAUCK, D. R.; MENKE, A. S. The higher classification of the Belostomatidae (Hemiptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, p. 644–657, 1961.
- LEE, Y. H.; LEE, C. E. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. **Zoological Science**, v. 9, p. 971-981, 1992.
- LEMOES, W. P.; RIBEIRO, R. C.; RAMALHO, F.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. The Reproductive Tract of the Males of the Zoophytophagous Predator *Brontocoris tabidus* (Signoret) (Heteroptera: Pentatomidae) with Different Diets and Ages. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2011.
- LEOPOLD, R. A. The role of male accessory glands in insect reproduction. **Annual Review of Entomology**, v. 21, p. 199–221, 1976.
- LESTON, D. Testis follicle number and the higher systematics of Miridae (Hemiptera: Heteroptera). **Proc Zool Soc Lond.**, v. 137, n. 1, p. 89–106, 1961.
- LI, H.; DENG, R.; WANG, J.; CHEN, Z.; JIA, F.; WANG, X. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p. 313–326, 2005.
- LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher level phylogeny and the first divergence time estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1-18, 2012.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H.; MANCINI, K.; MERCATI, D.; DALLAI, R.. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). **Tissue and Cell**, v. 40, n. 3, p. 185–193, 2008.

- LOUIS, D.; KUMAR, R. Morphology of the alimentary and reproductive organs in Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) with comments on interrelationships within the Family. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 3, p. 633-639, 1973.
- MACÍAS-ORDOÑEZ, R. On the reproductive behavior and population ecology of *Lethocerus colossicus* Stal (Heteroptera: Belostomatidae). **Folia Entomologica Mexicana**, v. 42, p. 161-168, 2003.
- MAHNER, M. Systema cryptoceratum phylogenicum (Insecta, Heteroptera). **Zoologica**, v. 43, 302 pp, 1993.
- MARSOLLIER, L.; ROBERT, R.; AUBRY, J.; SAINT ANDRÉ, J.; KOUAKOU, H.; LEGRAS, P.; MANCEAU, A.; MAHAZA, C.; CARBONNELLE, B. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 9, p. 4623-4628, 2002.
- MELO, A. L.; Infraorder Leptopodomorpha - Shore Bugs Saldidae. In: PANIZZI, A. R.; GRAZIA, J.; (eds). True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. Dordrecht: Springer, cap. 8, p. 203-213, 2015.
- MENKE, A. S. Family Belostomatidae, pp. 76-86. In: Menke A. S. The semiaquatic and aquatic Hemiptera of California. **Bulletin of the California Insect Survey**, v. 21, p. 1-166, 1979.
- MERRITT, W., BENBOW, M. E.; SMAII, P. L. C. 2005. Unraveling an emerging disease associated with disturbed aquatic environments: The case of Buruli ulcer. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 3, p. 323–331, 2005.
- MONTGOMERY, T. H. Note on the genital organs of *Zaitha*. **The American Naturalist**, v. 34, n. 398, p. 119-121, 1900.
- MOREIRA, P. A.; ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J. Morphology of male reproductive system in Three Species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera : Crabronidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 429–435, 2008.
- MRÓZ, E. Anatomical and molecular studies of *Stenodema* Laporte genus (Heteroptera: Miridae). **Genus**, v. 14, p. 77-81, 2007.
- MRÓZ, E.; WOJCIECHOWSKI, W. The systematic position of the tribe Stenodemini (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae: Mirinae) in the light of the male internal reproductive system. **Journal of Natural History**, v. 45, n. 25-26, p. 1563–1588, 2011.
- NIESER, N. The water bugs (Heteroptera: Nepomorpha) of the Guyana Region. *Uitg. natuurw. Studkring Suriname*, v. 16, n. 81, p. 88-128, 1975.
- NIESER, N.; MELO, A. L. Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais. Editora UFMG, Belo Horizonte, 177 pp, 1997.
- NIESER, N.; CHEN, P. P. Six new species of *Neotrephes* China (Heteroptera: Helotrephidae) from Brazil, with a key to Neotropical Helotrephidae. **Lundiana**, v. 3, p. 21-40, 2002.

ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. AMUTKAN, D. Morphology and histology of the male reproductive system in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera : Pentatomidae) based on optical and scanning electron microscopy. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 1, n. 4, p. 40–46, 2013.

ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. The morphology and histology of the male reproductive system in *Dolycoris baccarum* Linnaeus 1758 (Heteroptera: Pentatomidae) - Light and scanning electron microscope studies. **Micron**, v. 44, n. 1, p. 101–106, 2013.

ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Structure of male reproductive system and spermatogenesis of *Codophia varia* (Fabricius, 1787) (Heteroptera: Pentatomidae) by light and scanning electron microscopy. **Journal of the Entomological Research Society**, v. 16, p. 101–110, 2014.

ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. Ultrastructure of male reproductive system of *Eurydema ventrale* Kolenati 1846 (Heteroptera: Pentatomidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 78, p. 643–653, 2015.

PANIZZI, A. R.; GRAZIA, J. True bugs (Heteroptera) of the Neotropics. Springer, Dordrecht, Holland, 902 pp, 2015.

PAPÁČEK; M.; SOLDÁN, T. Development of the female reproductive system of *Notonecta glauca* L. (Heteroptera, Notonectidae) and the life cycle in South Bohemia. **Acta Entomologica Bohemoslovaca**, v. 84, p. 161-180, 1987.

PAPÁČEK, M.; GELBIČ, I. Development of the male internal reproductive system in the saucer bug (*Ilyocoris cimicoides* L.) (Heteroptera, Naucoridae). Pp. 125-140. In: TONNER, M.; SOLDÁN, T. & BENNETTOVÁ B. (editors): **Regulation of Insect Reproduction IV**. Academia: Praha, 539 pp, 1989.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T.; Development of the male internal reproductive system in *Notonecta glauca* (Heteroptera, Notonectidae). Pp. 199-211. In: BENNETTOVÁ B., GELBIČ I. & SOLDÁN T. (eds.): **Advances in Regulation of Insect Reproduction**. Institute of Entomology, Czech Academy of Science, České Budějovice, 329 pp, 1992.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN; T. Structure and development of the internal reproductive system of *Aphelocheirus aestivalis* (F.) (Heteroptera: Aphelocheiridae). P. 122. In: Proceedings of the XXth International Congress of Entomology. Firenze, Italy, August 25-31, 820 pp, 1996.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T. Structure and development of the reproductive system in *Aphelocheirus aestivalis* (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae). **Acta Entomologica**, v. 48, n. 2, p. 299-318, 2008.

PENDEGRAST, J. G. Studies on the reproductive organs of the Heteroptera with a consideration of their bearing on classification. **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 109, p. 1–63, 1957.

PEREIRA, L. L. V; ALEVI, K. C. C.; CASTANHOLE, M. M.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetics analysis and testis morphology of aquatic species of the families Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae, and Veliidae (Heteroptera). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 21, p. 1–10, 2015.

- PEREIRA, M. H.; SILVA, R. E.; AZEVEDO, A. M. S.; MELO, A. L.; PEREIRA L. H. Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 5, p. 405-409, 1993.
- POLHEMUS, J.; POLHEMUS, D. A. Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 379-391, 2008.
- RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Eds.). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Ribeirão Preto. Holos Editora. 810 pp, 2012.
- RAINA, A. K.; KINGAM, T. G., GIEBOLTOWICZ, J. M. Mating-induced loss of Sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantra dispar*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 25, p. 317-327, 1994.
- RAWAT, B. L. On the habits, metamorphosis and reproductive organs of *Naucoris cimicoides* L. (Hemiptera-Heteroptera). **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 88, p. 119-138, 1939.
- REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZELL, R. F.; ANDERSEN, P. C. The biology of xylem fluid feeding insect vector of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 243-270, 2004.
- REYES, A.; ESTÉVEZ, A. L. Predation on *Biomphalaria* sp. (Mollusca: Planorbidae) by three species of the Genus *Belostoma* (Heteroptera: Belostomatidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1033–1035, 2006.
- RIBEIRO, J. R. I. A review of the species of *Belostoma* Latreille, 1807 (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) from the four southeastern Brazilian states. **Zootaxa**, v. 1807, n. 1477, p. 1–70, 2007.
- RINGENBERG, R.; LOPES, J. R. S.; BOTTON, M.; AZEVEDO-FILHO, W. S.; CAVICHIOLI, R. R. Análise Faunística de Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) na Cultura da Videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 187-193, 2010.
- RYZHKOVA, O. V. New saldoid bug of the family Archegocimicidae (Hemiptera: Heteroptera: Leptopodomorpha) from the Middle Jurassic of Eastern Siberia. **Journal of Paleontology**, v. 47, p. 180–184, 2013. (Original in Russian)
- RYZHKOVA, O. V. New Saldoid bugs of the family Enicocoridae (Hemiptera: Heteroptera: Leptopodomorpha) from the Lower Cretaceous of Mongolia. **Journal of Paleontology**, v. 46, p. 485–494, 2012. (Original in Russian)
- SANTAMARINA-MIJARES, A.; GONZÁLES-BROCHE, R. Capacidad depredadora de los hemípteros acuáticos en condiciones de laboratorio. **Revista Cubana de Medicina Tropical y Epidemiología**, v. 37, p. 203-209, 1985.

- SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R., (eds). Heteroptera of economic importance. Boca Raton: CRC, 828 pp, 2000.
- SCHNACK, J. A.; ESTÉVEZ, A. L. On the taxonomic status of *Abedus* Stål (Hemiptera, Belostomatidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 34, p. 267–269, 1990.
- SCHUH, R. T. Review of Evolutionary trends in Heteroptera. Parte II. Mouthpart-structures and feeding strategies, by Cobben RH. **Systematic Zoology**, v. 28, p. 653-656, 1979.
- SCHUH, R. T.; SLATER, J. A. The bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University Press, Ithaca, NY, 336 pp, 1995.
- SHARMA, M. C.; LIVINGSTONE, D. Studies on the functional morphology of *Odontopus nigricornis* Stål (Heteroptera: Pyrrhocoridae). **Journal of Natural History**, v. 12, p. 121-132, 1978.
- SIGH, T. The male accessory glands in Bruchidae (Coleoptera) and their taxonomic significance. **Scandinavian Entomology**, v. 9, p. 198-203, 1978.
- SILVA, M. T.; PORTAELS, F.; & PEDROSA, J. Aquatic insects and *Mycobacterium ulcerans*: An association relevant to Buruli ulcer control?. **PLOS Medicine**, v. 4, n. 2, p. 229–231, 2007.
- SMITH, R. L. Evolution of paternal care in the giant water bugs (heteroptera: belostomatidae). In: J. C. Choe and B. J. Crespi (editors), **Social Behavior in Insects and Arachnids**, Cambridge, University Press, v. 16: 149, 1997.
- SOUZA, G. K.; PIKART, T. G.; ZANUNCIO, T. V.; WILCKEN, C. F.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Reproductive tract histology of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, n. 4, p. 853-857, 2014.
- STEFANINI, M.; MARTINO, C. Zamboni Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v. 216, p. 173-174, 1967.
- STYS, P.; JANSSON, A. Check-list of recent family-group and genus-group names of Nepomorpha (Heteroptera) of the world. **Acta Entomologica Fennica**, v. 50, p. 1–44, 1988.
- TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. O estudo dos insetos. Tradução da 7ª edição de Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. Belmont, California, Thomson Brooks/Cole, 809 pp, 2011.
- UCELI, L. F.; PIROVANI, V. D.; VICENTE, N. M. F.; PIKART, T. G.; FERREIRA, P. S. F.; SERRÃO, J. E. Morphology of the reproductive and digestive tracts of *Adparaproba gabrieli* (Heteroptera: Miridae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 31, n. 4, p. 219-224, 2011.
- VIANNA, G. J. C; MELO, A. L. Distribution patterns of aquatic and semi aquatic Heteroptera in Retiro das Pedras, Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. **Lundiana**, v. 4, p. 125-128, 2003.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 487–510, 2011.

WHEELER, W. C.; SCHUH, R. T.; BANG, R. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. **Scandinavian Entomology**, v. 24, p. 121–37, 1993.

WIECZOREK, K. A revision of the genus *Atheroides* Haliday, 1839 (Hemiptera: Aphididae: Chaitopherinae). **Zoological Studies**, v. 48, n. 5, p. 693–708, 2009.

WIECZOREK, K. Structure of the male reproductive system of *Anoecia* (*Anoecia*) *corni* Fabricius, 1775 (Hemiptera, Aphidoidea), a representative of the family Anoeciidae. **Acta Zoologica**, v. 89, p. 163-167, 2008.

WOODWARD, T. E. The internal male reproductive organs in the genus *Nabis* Latr. (Nabidae: Hemiptera – Heteroptera). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 42, p. 111–118, 1949.

XIE, Q.; TIAN, Y.; ZHENG, L.; BU, W. 18S rRNA hyper-elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 463–471, 2008.

ZANUNCIO, J. C.; TAVARES, W. S.; FERNANDES, B. V.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, T. V. Production and use of Heteroptera predators for the biological control of *Eucalyptus* pests in Brazil. **Ekoloji**, v. 23, n. 91, p. 98-104, 2014.

ZAPPALÀ, L.; BIONDI, A.; ALMA, A.; AL-JBOORY, I. J.; ARNO, J.; BAYRAM, A.; DESNEUX, N. Natural enemies of the South American moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 4, p. 635–647, 2013.