



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

---

**Hederson Vinícius de Souza**

**ESPERMATOGÊNESE E COMPORTAMENTO NUCLEOLAR  
EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA PENTATOMIDAE  
(HETEROPTERA) DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**



**Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre em  
Genética**

---

**São José do Rio Preto-SP  
2009**

**Hederson Vinícius de Souza**

**ESPERMATOGÊNESE E COMPORTAMENTO NUCLEOLAR  
EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA PENTATOMIDAE  
(HETEROPTERA) DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

Dissertação apresentada para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética, área de Genética Animal e  
Evolução junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética do Instituto  
de Biociências, Letras e Ciências  
Exatas da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto-SP  
2009

Souza, Hederson Vinícius de.

Espermatogênese e comportamento nucleolar em espécies da família Pentatomidae (Heteroptera) de importância econômica / Hederson Vinícius de Souza. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

128 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mary Massumi Itoyama

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética animal. 2. Espermatogênese em animais. 3. Hemíptera. 4. Heteroptera. 5. Pentatomidae. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

HEDERSON VINÍCIUS DE SOUZA

Espermatogênese e comportamento nucleolar em espécies da família  
Pentatomidae (Heteroptera) de importância econômica

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Animal e Evolução junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Massumi Itoyama  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Doralice Maria Cella  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – Rio Claro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisabete Jorge Amaral  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 18 de fevereiro de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração de uma dissertação não depende somente do autor, mas também do meio no qual ele está inserido. É neste contexto que se evidencia as várias pessoas que colaboraram com idéias, auxílios, críticas, sugestões, entre outras inúmeras fontes inesgotáveis de conhecimento.

Desse modo, meus pais tiveram grande importância na elaboração desta dissertação, assim como minhas irmãs, pessoas que serei eternamente grato.

Aos meus amigos, e às vezes muito mais que amigos, que ajudaram a compor os passos dessa escalada rumo à inatingível perfeição.

Com relação ao conhecimento científico, minha especial dedicação a Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, minha orientadora, que desde o estágio básico me incentiva e motiva para que eu possa sempre fazer o melhor. A Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, que nos auxilia com seu magnífico saber científico. A Profa. Dra. Sônia Maria Oliani pelas oportunidades de capturar as imagens. A Profa. Dra. Eliana Morielle Versute e a Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi pelas críticas e sugestões durante a defesa da qualificação. A Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral e a Profa. Dra. Doralice Maria Cella pelas sugestões e críticas durante a defesa da presente dissertação e aos demais professores da UNESP/IBILCE que de maneira direta ou indireta, ajudaram na elaboração desta dissertação.

Aos funcionários deste Instituto, em especial, aos da seção de Pós-Graduação, cujo companheirismo, atenção e presteza são insuperáveis.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre me auxiliaram, me ensinaram e que tornaram o trabalho algo gratificante.

Aos órgãos de fomento, FAPESP, pela bolsa concedida e a FUNDUNESP pelo auxílio com as despesas do projeto.

Meus sinceros agradecimentos a todos que me auxiliaram na elaboração desta dissertação.

"Todos esses que aí estão  
Atravancando meu caminho,  
Eles passarão...  
Eu passarinho!"  
(Mário Quintana)

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>III. ARTIGOS</b> .....	<b>16</b>
1. Estudo da meiose e da espermiogênese nos lobos testiculares de <i>Antiteuchus tripterus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) .....	17
2. Padrão de coloração pelo nitrato de prata durante a meiose e espermiogênese nos lobos testiculares de <i>Antiteuchus tripterus</i> (Heteroptera: Pentatomidae) .....	29
3. Padrões morfológicos da cromatina heteropicnótica e do material nucleolar na meiose e espermiogênese de alguns Pentatomidae (Heteroptera) .....	42
4. Aspectos evolutivos da espermatogênese de <i>Euschistus heros</i> , <i>Platycarenum umbraculatus</i> e <i>Thyanta perditor</i> (Heteroptera: Pentatomidae) na formação do lobo <i>harlequin</i> .....	50
5. Avaliação da espermatogênese após o uso de Periodic Acid Schiff (PAS) em Pentatomidae (Heteroptera) .....	86
<b>IV. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>102</b>
<b>V. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>107</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>111</b>
<b>VII. ANEXOS</b> .....	<b>118</b>
1. Materiais e Métodos .....	119
2. Espécies Analisadas .....	122
<b>VIII. RESUMO</b> .....	<b>124</b>
<b>IX. ABSTRACT</b> .....	<b>125</b>

## **I. INTRODUÇÃO**



## I. INTRODUÇÃO

Os Heteroptera constituem um dos mais importantes grupos de insetos do ponto de vista econômico, pois a maioria, durante os estádios de ninfa e adulto, alimenta-se de plantações ou grãos armazenados para o consumo humano. Os Heteroptera incluem aproximadamente 37.000 espécies distribuídas em oito infraordens, cinco das quais abrigam essas espécies nocivas (REBAGLIATI et al., 2005). Entre estas se encontra a família Pentatomidae, que inclui 4112 espécies, muitas das quais são pragas de plantações (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Esses insetos são comumente denominados de maria-fedidas devido ao seu desagradável odor, produzido por meio de uma glândula que se abre na região da metapleura. Essa família é constituída de oito subfamílias (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae).

Com relação aos aspectos citogenéticos, os Heteroptera possuem cromossomos holocêntricos (sem centrômero localizado), não apresentam estrutura cinetocórica nas células meióticas (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO; RUTHMAN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996), atividade cinética é restrita aos finais dos cromossomos, ou seja, nas regiões teloméricas (cromossomos são denominados telocinéticos, GONZALEZ-GARCIA et al., 1996; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; MOTZKO; RUTHMANN, 1984; SCHRADER, 1935, 1940), terminalização dos quiasmas é presumido ocorrer (JOHN; KING, 1985), embora haja trabalhos que discutam este assunto (JONES, 1987; SOLARI; AGOPIAN, 1987) e a primeira divisão meiótica é reducional para os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais.

Com relação aos sistemas cromossômicos do sexo já foram descritos os simples (XY/XX, 74,7% das espécies e o X0/XX, 14,8%) e os múltiplos (originados por fragmentação do cromossomo X e, menos frequentemente, do cromossomo Y, Xn0/XnXn, XnY/XnXn e XYn/XX, 10,3%) (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984). Há, ainda, um sistema particular neo-XY

(0,2%) (CHICKERING; BACORN, 1933; JANDE, 1959; SCHRADER, 1940).

Relatos citogenéticos de espécies da família Pentatomidae mostram número diplóide de cromossomos, em machos, de seis a 27, sendo o mais frequente o de 14 (85%) (REBAGLIATI et al., 2005) e o sistema cromossômico do sexo XX/XY (fêmea/macho), exceto em três espécies (*Macropygium reticulare*, X1X2Y; *Rhytidolomia senilis*, neo-XY e *Thyanta calceata*, X1X2Y) e não apresentam m-cromossomos. Entretanto uma característica particular dos Pentatomidae é a presença, em algumas espécies, de uma meiose atípica em um dos lobos testiculares (lobo *harlequin*) (LANZONE et al., 2003; REBAGLIATI et al., 2001; REBAGLIATI et al. 2005).

Segundo Rebagliati et al. (2005), as características que são diferentes no lobo *harlequin*, comparado aos demais, são as associações não-específicas dos autossomos, disposição anômala dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e fusão celular, resultando como consequência a produção de espermatozóides com número cromossômico altamente variável, o qual pode afetar a fertilidade do indivíduo. Até a revisão de Rebagliati et al. (2005), 22 espécies, pertencentes a 15 gêneros e três subfamílias diferentes (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) foram relatadas possuírem este lobo.

Estes insetos apresentam outras particularidades durante a meiose. No leptóteno-zigóteno o cromossomo X é positivamente heteropicnótico e está localizado na periferia do núcleo. Após o diplóteno, as células aumentam de tamanho e o núcleo torna-se semelhante ao estado interfásico, sendo este denominado de “difuso”. No final da diacinese o cromossomo X torna-se isopicnótico. Na metáfase I o cromossomo X localiza-se no centro do anel formado pelos autossomos bivalentes. Na anáfase I os autossomos bivalentes dividem-se reducionalmente enquanto o cromossomo X divide-se equacionalmente. A segunda divisão segue-se diretamente após a telófase I, sem os estágios restantes. Na metáfase II os autossomos dispõem-se no plano equatorial formando uma configuração em anel, com o cromossomo X no centro. Após a telófase II, as células filhas formadas, terão como destino o processo de

espermição, pela diferenciação dos espermátocitos e alongação dessas células (BRESSA et al., 2002).

Uma estrutura que vem sendo bastante estudada é o nucléolo. Sabe-se que o tamanho e o número de nucléolos e dos corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e podem refletir, então, em diferenças metabólicas e funcionais (SOUZA et al., 2007a; TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Segundo Bressa et al., (2003) a persistência do nucléolo e dos corpos pré-nucleolares observados na meiose de *Dysdercus imitator* (Pyrrhocoridae, Heteroptera), pode estar relacionado com a intensa atividade sintética a fim de produzir RNA ribossômico (RNAr) requerido para a espermatogênese. Entretanto, a possibilidade de que a alta taxa de transcrição de RNAr possa estar relacionado a um outro fator desconhecido não pode ser descartada (BRESSA et al., 2003).

O número e a localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) foram determinados em poucas espécies de Heteroptera por diferentes técnicas e diferentes resultados foram relatados. Em todos eles uma única RON foi observada, mas com diferentes localizações: na posição mediana ou subterminal em diferentes pares de autossomos ou nos cromossomos sexuais (CAMACHO et al., 1985; FOSSEY; LIEBENBERG, 1995; GONZALEZ-GARCIA et al., 1996; PAPESCHI; BRESSA, 2002; PAPESCHI et al., 2003; REBAGLIATI et al., 2003).

Nos Pentatomidae uma única RON foi detectada na região telomérica de um par de autossomos em *Edessa meditabunda* (REBAGLIATI et al., 2003), na posição mediana em um par de autossomos grande em *Nezara viridula* (CAMACHO et al., 1985; PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica do cromossomo X de *Graphosoma italicum* (GONZALEZ-GARCIA et al., 1996).

O estudo dos espermatozoides, também vem sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores. O primeiro sistema para classificação dos espermatozoides, em algumas espécies de invertebrados, utilizou o complemento cromossômico para distinguir os diferentes tipos (MEVES, 1903).

Espermatozóides com complemento cromossômico haplóide foram denominados eupirenes, aqueles com os números cromossômicos superiores aos haplóides foram chamados de hiperpirenes, os com complemento inferior ao haplóide foram denominados de oligopirenes e os que não contêm cromatina de apirene. Inicialmente era aceito que muitos destes espermatozóides com morfologia alternativa, particularmente aqueles com divergência no conteúdo de cromatina, não poderiam fertilizar e, portanto, eram chamados de atípicos. Healy e Jamieson (1981), entre outros, sugeriram que os espermatozóides não fertilizantes fossem chamados de paraespermatozóides e os fertilizantes de euespermatozóides.

As possíveis funções dos espermatozóides heteromórficos, em insetos, foram primeiramente descritas por Sivinski (1980), enquanto Silberglied et al. (1984) discutiram o possível papel dos espermatozóides apirenes em algumas espécies de Lepidoptera. Swallow e Wilkinson (2002) elaboraram uma hipótese com relação às possíveis funções dos espermatozóides heteromórficos e as dividiram em quatro categorias diferentes: *non-adaptative* (não possui função), *provisioning* (inicia a capacitação dos espermatozóides e fornece nutrientes para as fêmeas, euespermatozóides e óvulo), *facilitation* (auxilia a migração dos euespermatozóides nos testículos e nas fêmeas) e *competition* (remove/tira os espermatozóides estocados e inutiliza-os).

Os testículos de todas as espécies de Pentatomidae consistem de um número de subdivisões, compartimentos ou lobos. O número mais comum de lobos é sete, embora haja variações entre as tribos e as espécies. As características dos espermatozóides (tamanho e/ou ploidia) diferem entre os lobos (SWALLOW; WILKINSON, 2002). Montgomery (1898 apud SCHRADER, 1960a) classificou pela primeira vez os espermatozóides de Pentatomidae em três classes: grande, médio e pequeno. Por exemplo, em *Arvelius albopunctatus*, o volume dos espermatozóides da classe grande é aproximadamente oito vezes maior do que o do pequeno (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1950, 1951). Em todos os casos descritos a produção de espermatozóides de tamanhos diferentes está associada com um lobo particular do testículo. Dois lobos produzem o espermatozóide com tamanho maior e estes lobos flanqueiam um lobo que produz

espermatozóides de tamanho menor. Os lobos remanescentes produzem os gametas de tamanho médio. É importante ressaltar que estes espermatozóides de classes diferentes resultam de meiose normal. Assim, o conteúdo de proteína e RNA das diferentes classes de espermatozóides está positivamente relacionado ao tamanho, enquanto o número cromossômico haplóide permanece constante. Tamanho dos espermatócitos não está correlacionado com o tamanho do lobo. De fato o lobo que produz o espermatozóide de tamanho menor é frequentemente o maior e o lobo que produz o espermatozóide maior é o menor (SCHRADER, 1960a, b; SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1950, 1951; SOUZA et. al., 2007b).

A polimegalia, descrita anteriormente, difere completamente de um outro processo visto em um pequeno subgrupo de espécies da subfamília Pentatominae, o qual resulta não somente em espermatozóides de diferentes tamanhos, mas também de ploidias diferentes (BOWEN, 1922; SCHRADER, 1960a, b). Heteroploidia não é restrita para grupos monofiléticos, mas estão sendo relatadas nas tribos Pentatomini, Halyini e Discocephalini. Resulta de um processo irregular de meiose, em um dos lobos testiculares, originando espermátides com um, o qual sempre é o cromossomo sexual, até 100 cromossomos, mais do que 10 vezes o número haplóide esperado, por exemplo, para o gênero *Loxa* (BOWEN, 1922; SCHRADER, 1945a, b). Este lobo foi denominado de *harlequin* e, geralmente, corresponde ao maior lobo, que em alguns casos, levam a formação de testículos torcidos ou enrolados e produz o espermatozóide de morfologia menor na maioria das espécies na subfamília. Schrader (1960b) observou que as condições fisiológicas e químicas dos *harlequins* diferem dos demais lobos.

Com relação a esta variação extraordinária no número cromossômico, há sugestões que isto deva estar relacionado com a formação de espermatozóides de diferentes tamanhos dependendo do conteúdo de cromossomos. O tamanho dos espermatozóides é proporcionalmente relacionado à quantidade de cromossomos. Mesmo que o desenvolvimento dos espermatozóides prossiga independentemente do número de cromossomos,

evidências indicam que somente estes espermatozóides contendo pelo menos um complemento completo de cromossomos sempre alcancem o ducto ejaculatório (SCHRADER, 1960a, b). Assim, o espermatozóide menor, com quantidade de cromossomos inferior ao número haplóide nunca deixa o aparelho reprodutor do macho.

Schrader (1945a; 1960a, b) surpreendeu-se ao verificar que as forças da evolução persistiram com os lobos *harlequins*, uma estrutura que produz espermatozóides heteropoliplóides não usados na fertilização. Ele sugeriu que os espermatozóides devam fornecer nutrientes adicionais, especialmente nucleoproteínas para o desenvolvimento dos ovos. Como os espermatozóides *harlequins* são provavelmente não férteis, o argumento de ocorrência de poliespermia é duvidoso. Nem a ocorrência regular de poliespermia, em geral, nem a entrada de espermatozóides *harlequins* nos ovos, em particular, foram investigados em Pentatominae (SWALLOW; WILKINSON, 2002). Embora não observados por Schrader, espermatozóides heteropoliplóides poderiam também ter outros papéis nutritivos, isto é, para as fêmeas ou para os espermatozóides fertilizantes (SWALLOW; WILKINSON, 2002).

Na revisão de Schrader (1960b) sobre a ocorrência de heteroploidia em Pentatomidae foi relatada uma aparente associação com habitats tropicais e subtropicais para mais de 20 espécies que tinha a característica. Nenhuma associação entre o lobo *harlequin* e a condição ecológica foi descrita.

Pesquisas com *Nezara viridula* provém alguns suportes para o papel nutritivo dos espermatozóides *harlequin* de tamanhos maiores. McLain (1998) observou que os machos que não copulavam tinham os lobos *harlequins* menores do que os que copulavam. O porquê das fêmeas sempre escolherem os machos com melhores sucessos reprodutivos, foi medido pelo número de ovos fertilizados durante a vida das fêmeas. McLain (1990, 1998) inferiu que fêmeas receberam benefícios não-genéticos de preferência masculina. McLain (1998) sugeriu que os benefícios não-genéticos poderiam resultar de espermatozóides gigantes e multinucleados, se espermatozóides não fertilizantes fornecer nutrientes para os ovos ou fêmeas. Para este argumento ser sustentado, a largura dos lobos

*harlequin* deveria ser correlacionada com o tamanho ou número de espermatozoides produzidos e no caso de benefícios nutricionais diretos para o ovo, poliespermia deveria ocorrer com alguma frequência.

Souza et al. (2007b) analisaram citogeneticamente testículos de machos adultos de *Antiteuchus tripterus* e observaram divisões meióticas atípicas no lobo 5 (*harlequin*). Outra característica observada foi a presença de um lobo interno ao lobo *harlequin*. Souza et al. (2007b) sugere que pressões evolutivas podem estar atuando para a manutenção desses lobos com espermatozoides especializados.

Outra estrutura que vem sendo bastante estudada é o acrossomo. Ele pode ter um importante papel durante o processo de fertilização, talvez agindo como um ativador ou contendo enzimas que proporcionará o primeiro passo para o início desenvolvimento do ovo (BOWEN, 1924). Os acrossomos de muitas espécies animais foram analisados, verificando-se a variação na sua forma e posição (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1951).

Schrader e Leuchtenberger (1951) verificaram que a síntese de material do acrossomo ocorre independentemente da síntese de outras estruturas celulares. As alterações fisiológicas no terceiro e quinto lobos testiculares de *Arvelius albopunctatus* provocaram um grande aumento do nucleoplasma, do citoplasma e do nucléolo, induzindo, até mesmo, um crescimento do acrossomo. O resultado foi um acrossomo enorme que possivelmente afeta a eficiência do espermatozoide na sua fertilização. Assim, os pesquisadores sugeriram que alterações muito leves no ambiente fisiológico podem afetar a formação do acrossomo e conseqüentemente pode provocar algum grau de esterilidade.

Estes estudos mostram também, que essas espécies que possuem os diferentes tipos de espermatozoides nos diferentes lobos, ou seja, indivíduos com esterilidade localizada parece não apresentar grande influência na vida desses machos. Eles são tão vigorosos e ativos quanto os machos de outras espécies com formação de um único tipo de espermatozoide e o fato de muitas espécies terem sobrevivido indica que uma adaptação para esta peculiar característica reprodutiva foi atingida (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1951).

## **II. OBJETIVOS**

---



## II. OBJETIVOS

Dada a importância citogenética e econômica (pragas de grãos) dos Heteroptera da família Pentatomidae, o nosso objetivo foi o de:

- a) Analisar detalhadamente o comportamento meiótico, das seguintes espécies de Pentatomidae: *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus poecilus*, *Oebalus ypsilongriseus*, *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor*, em cada um dos lobos testiculares separadamente;
- b) Analisar o comportamento nucleolar, nos diferentes lobos, durante a espermatogênese;
- c) Analisar a morfologia do acrossomo em cada lobo separadamente.





**Estudo da meiose e da espermiogênese nos lobos testiculares de *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae)**

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 104, p. 353-362, 2007.

**Resumo:** As análises permitiram concluir que *A. tripterus* (Pentatomidae) possui testículo formado de seis lobos, incluindo um lobo composto, isto é, um lobo contendo outro em seu interior. O estudo da meiose e da estrutura dos espermatozóides nos diferentes lobos revelou uma meiose convencional nos lobos um a três. No lobo quatro, contudo, os espermatócitos na prófase I exibem morfologia característica ao chamado estágio difuso e são maiores que aqueles encontrados nos lobos 1-3 e também para as outras fases da meiose. Isso resulta em espermátides não somente grandes, mas com suas cabeças morfologicamente diferentes. Lobo 5 apresentou características conhecidas de outras espécies de Heteroptera, como distribuição anormal de cromatina para as células filhas, da qual origina células de diferentes tamanhos. Este lobo forma espermatozóides de diferentes tamanhos. Lobo 6, contido dentro do lobo 5, difere deste por apresentar células grandes semelhantes as do estágio difuso e com espermátides de cauda com divisões transversais, a qual não foi encontrada nos outros lobos e ainda não reportada na literatura.

## A study of meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae)

HERDERSON VINICIUS DE SOUZA<sup>1</sup>, HERMIONE ELLY MELARA DE CAMPOS BICUDO<sup>1</sup>, LUIZ ANTÔNIO ALVES COSTA<sup>2</sup>  
and MARY MASSUMI ITOYAMA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/IBILCE, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>2</sup>Museu Nacional, Departamento de Entomologia, Rio de Janeiro, Brasil

**Key words.** Heteroptera, Pentatomidae, meiosis, spermatozoa, testicular lobes, harlequin lobe

**Abstract.** An analysis of testicular morphology and spermatogenesis in the Heteroptera species *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae) revealed that these traits differ from that recorded for other species of the same family. The testes of *A. tripterus* have only six lobes, while other species of the same family typically have seven lobes, including a compound lobe, i.e., a lobe containing another in its lumen. A study of meiosis and sperm structure in the different lobes of *A. tripterus* revealed a conventional meiosis in the lobes numbered one to three. In lobe four, however, prophase I spermatocytes exhibit the morphological characteristics of the so called “diffuse” stage and are larger than those in lobes 1–3 in this and the remaining phases of meiosis. Thus, the resulting spermatids are not only larger but also their head is morphologically different. Lobe 5 exhibits characteristics known from other Pentatomidae species such as an uneven distribution of chromatin to the daughter cells, which give rise to cells of different sizes. This lobe forms spermatozoa of different sizes. Lobe 6, contained within lobe 5, differs from it by having larger cells at a stage similar to the so called “diffuse” and spermatid tails with cross divisions, which are not found in other lobes and unreported in the literature.

### INTRODUCTION

Several organisms produce different kinds of spermatozoa. The differences include cytogenetic and/or morphological variations. The regular production of cytogenetically differentiated spermatozoa was first described in gastropods in 1836 (Seibold, 1836, cited in Hodgson, 1977), and is now known to occur in several invertebrates, such as spiders (Rosati et al., 1970), centipedes (Jamieson, 1986) and many insects (Sivinski, 1980). Moths and butterflies, for example, produce both nucleate and anucleate spermatozoa; and some bedbugs and beetles produce spermatozoa with a very variable number of chromosomes (Swallow & Wilkinson, 2002; Friedländer et al., 2005). Morphological variations may also affect spermatozoal size, as observed in some bedbugs and beetles, length, as in some flies and shape, as in some wasps (Swallow & Wilkinson, 2002).

Heteroptera of the family Pentatomidae, the object of this study, are also an example of organisms with variable spermatozoa. In all the previously studied species of this family, testes consist of a number of compartments referred to as “lobes”. Most frequently there are seven lobes, but some variation occurs among tribes and species. In the Pentatomidae, spermatozoa of different size, ploidy, or both, are produced by different lobes, but studies on spermatogenesis development in each testicle lobe of a Pentatomidae are scarce (Swallow & Wilkinson, 2002).

In the Pentatomidae, chromosomal characteristics are basically the same as in other Heteroptera: they are holokinetic, i.e., they have no localized centromere, which causes microtubules to bind to the entire chromosomal surface during mitosis and the sister-chromatids migrate in parallel to the cell pole at anaphase (Buck, 1968; Comings & Okada, 1972). At meiosis, however, the kinetic activity is restricted to telomeric regions, and chromosomes are, therefore, denominated telokinetic (Motzko & Ruthmann, 1984). Meiotic behavior is slightly different among bivalent autosomes, sex chromosomes and micro-chromosomes (Ueshima, 1979; Manna, 1984; Papeschi & Mola, 1990; González-García et al., 1996; Suja et al., 2000). Except in a few species, bivalent autosomes are chiasmatic while stick-shaped bivalents are axially oriented and segregate pre-reductionally (Nokkala & Grozeva, 2000). On the other hand, sex chromosomes are achiasmatic and behave as univalents at male meiosis, equationally divide at anaphase I and associate to form a pseudo-bivalent at meiosis II. Nonetheless, the pre-reduction of sex chromosomes is also reported in some species (Ueshima, 1979; Grozeva & Nokkala, 2001). The pair of micro-chromosomes is also achiasmatic, but its components associate at first division and segregate pre-reductionally.

The purpose of this work was to analyze the morphology of testes in the pentatomid *Antiteuchus tripterus*, as well as the process of meiosis and spermiogenesis

\* Corresponding author; e-mail: mary@ibilce.unesp.br

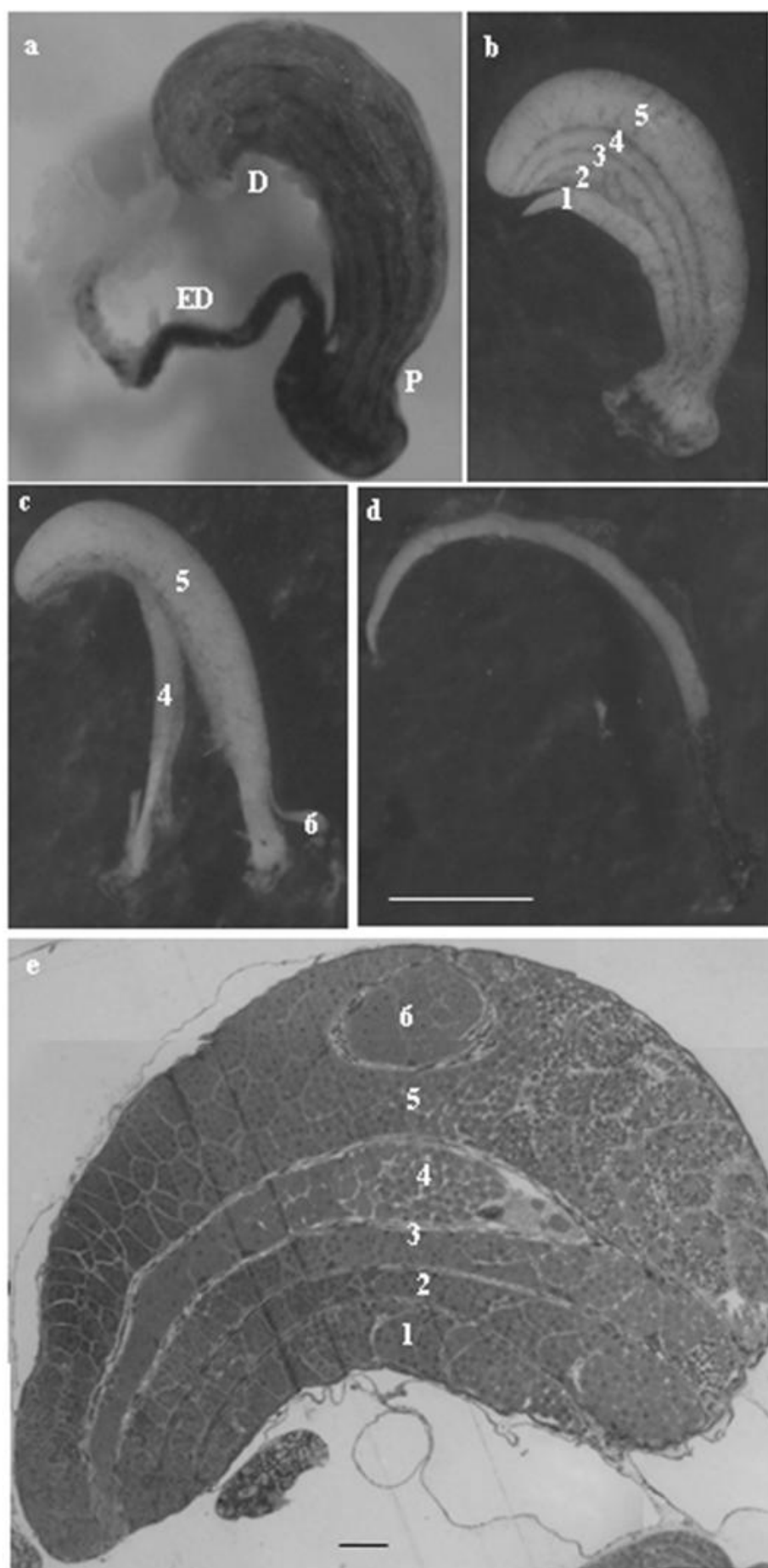


Fig. 1. Testis of an adult male *Antiteuchus tripterus* after treatment with trypsin. a – distal region (D), proximal region (P) and ejaculatory duct (ED); b – testicular lobes 1–5; c – testicular lobes 5 and 6 (inside 5); d – testicular lobe 6; e – histological longitudinal section of the testicular lobes. Bar = 10  $\mu$ m (a–d), 30  $\mu$ m (e).

separately in each testicular lobe. As far as we are aware, this is the first attempt at this kind of a separate analysis.

## MATERIAL AND METHODS

Adult males of *Antiteuchus tripterus* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) were collected from the plant *Bauhinia punctata* Bolle (Fabaceae), in São José do Rio Preto, SP, Brazil. For the analysis of testicular morphology as well as aspects of meiosis and spermatozoal production, testes were removed and placed in Demerec solution on a slide (Demerec & Kaufmann, 1945) and then incubated for 20 min after adding a drop of trypsin and EDTA solution (0.005 g of trypsin and 0.002 g of EDTA diluted in 10 mL of Hank's solution: 1.4 mM NaCl, 70 mM KCl, 4.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM glucose, 0.045 mM phenol red). The lobes were separated, transferred to slides and fixed in methanol : acetic acid (3 : 1) for 15 min and subsequently methanol : acetic acid (1 : 1) for 10 min.

For the analysis of meiosis and spermatozoal production, each lobe was placed separately on a slide, stained with lactic acetic orcein and squashed. Images were obtained using a Zeiss microscope and AXIO VISION software for image analysis. Measurements were taken with Micromesure version 3.3 (Reeves & Tear, 2000).

Forty individuals were used for gonad and lobe separation and ten slides were analyzed per lobe for recording cell characteristics. For histological analysis, testes were fixed with Karnovsky solution and embedded in Araldite (Glauert, 1975). Sections were stained with haematoxylin-eosin and toluidine blue for general morphology.

## RESULTS

*Antiteuchus tripterus* testes are covered by a reddish membrane and are curved with the distal region larger than the proximal region, where the ejaculatory duct is located (Fig. 1a). After treating the testis with trypsin, a total of five individual lobes per testis can be identified (Fig. 1b). Three of the lobes are of the same size (lobes 1, 2, and 3), one is thinner (lobe 4) and the other longer (lobe 5). Lobe 5 contains within it another tubule, which is lobe 6 (Fig. 1c). The use of 45% acetic acid causes lobe 5 to dissociate, which makes it possible to isolate lobe 6. A drop of methanol:acetic acid (3 : 1), which makes the inner lobe more evident and rigid, facilitates its separation (Fig. 1d). Histological sections confirmed the arrangement of the lobes in the testes (Fig. 1e). Meiotic behaviour and the types of spermatozoa produced in each lobe were studied separately.

### Testicular lobes 1 to 3

Lobes 1–3, after lactic acetic orcein staining and squashing, show nutritive cells with large polyploid nuclei, which carry several heteropycnotic bodies (Fig. 2a). In these lobes, spermatogenesis is cystic, usually consisting of eight spermatogonia per cyst. Each spermatogonium displays one or more heteropycnotic bodies (Fig. 2b).

Cytogenetic analysis revealed that the chromosomal complement is  $2n = 14$  (12A + XY) in *A. tripterus* males (Fig. 2f). The cells at meiotic prophase I exhibit one or two heteropycnotic bodies of different size that are likely to correspond to the sex chromosomes X and Y, which are seen together or apart, and, most frequently, are found

at the periphery of the nucleus (Fig. 2c, d). Diplotene, autosome bivalents show terminal or interstitial chiasmata, and very often exhibit complex telomeric associations (Fig. 2e). The sex chromosomes do not form chiasmata, but are frequently close to each other. At metaphase I, autosomes may appear arranged in a circle with the sex chromosomes inside (polar view) (Fig. 2f). One of the six autosome pairs is noticeably larger than the others.

The first autosome division is reductional, i.e., the homologous chromosomes are separated (Fig. 2g). The equational division of autosomes occurs at anaphase II (Fig. 2h). In contrast, the sex chromosomes usually show equational separation of sister-chromatids at anaphase I, and reductional at anaphase II. The late migration of the sex chromosomes, as well as the heteropycnotic body can be seen at telophase (Fig. 2i). In the spermatids, which are still round, the heteropycnotic chromatin can also be observed near the periphery of the nuclear envelope; this chromatin remains in the same position when the spermatid elongates to form the head and tail of the spermatozoon (Fig. 2j, k). Initially, the spermatozoa have a long and thin head (Fig. 2l), but later develop a small head and a very long tail (Fig. 2m).

### Testicular lobe 4

In lobe 4, the morphology of the cells at prophase I is similar to that of the so called "diffuse" stage cells (Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999). They exhibit a large amount of cytoplasm, decondensed chromatin and heteropycnotic granules of different sizes (Fig. 3a). Because nuclei are round, their diameter was used to compare prophase I cells from different lobes. Mean values of spermocyte nuclei based on 10 measurements in each lobe were, for lobe 1–3 and 5:  $29 \pm 2 \mu\text{m}$ ; for lobe 4:  $64 \pm 3 \mu\text{m}$ ; for lobe 6:  $47 \pm 1 \mu\text{m}$ . In lobe 4, nuclei are 2.2 times larger than in lobes 1–3 and 5 and 1.36 times larger than in lobe 6. The cells at metaphase II show telomeric associations of sister chromatids (Fig. 3b). The size of the cells at anaphase II and telophase II is similar to that of the cells at "diffuse" stage (Fig. 3c, d). In the spermatids, the heteropycnotic material is at the periphery of the nucleus and is almost totally occupied by a large vesicle (Fig. 3e). As spermiogenesis advances, the heteropycnotic material becomes less evident and is located in the anterior part of the head of the forming spermatozoon (Fig. 3f). The posterior part of the head has a region of increased diameter, where the external membrane appears to be "pleated", but, at the end of the process, these spermatids also become longer and thinner (Fig. 3g). No polyploid cells were observed in this lobe.

### Testicular lobe 5

In lobe 5, the cells at early meiotic prophase I are similar to those in lobes 1–3, i.e., the nucleus has one or two heteropycnotic bodies at the periphery or associated with chromosomes (Fig. 4a). The cells found in this lobe display variable associations between chromosomes as they condense (Fig. 4b, c). At metaphase I, some chromosomes, probably the sex chromosomes, do not show the

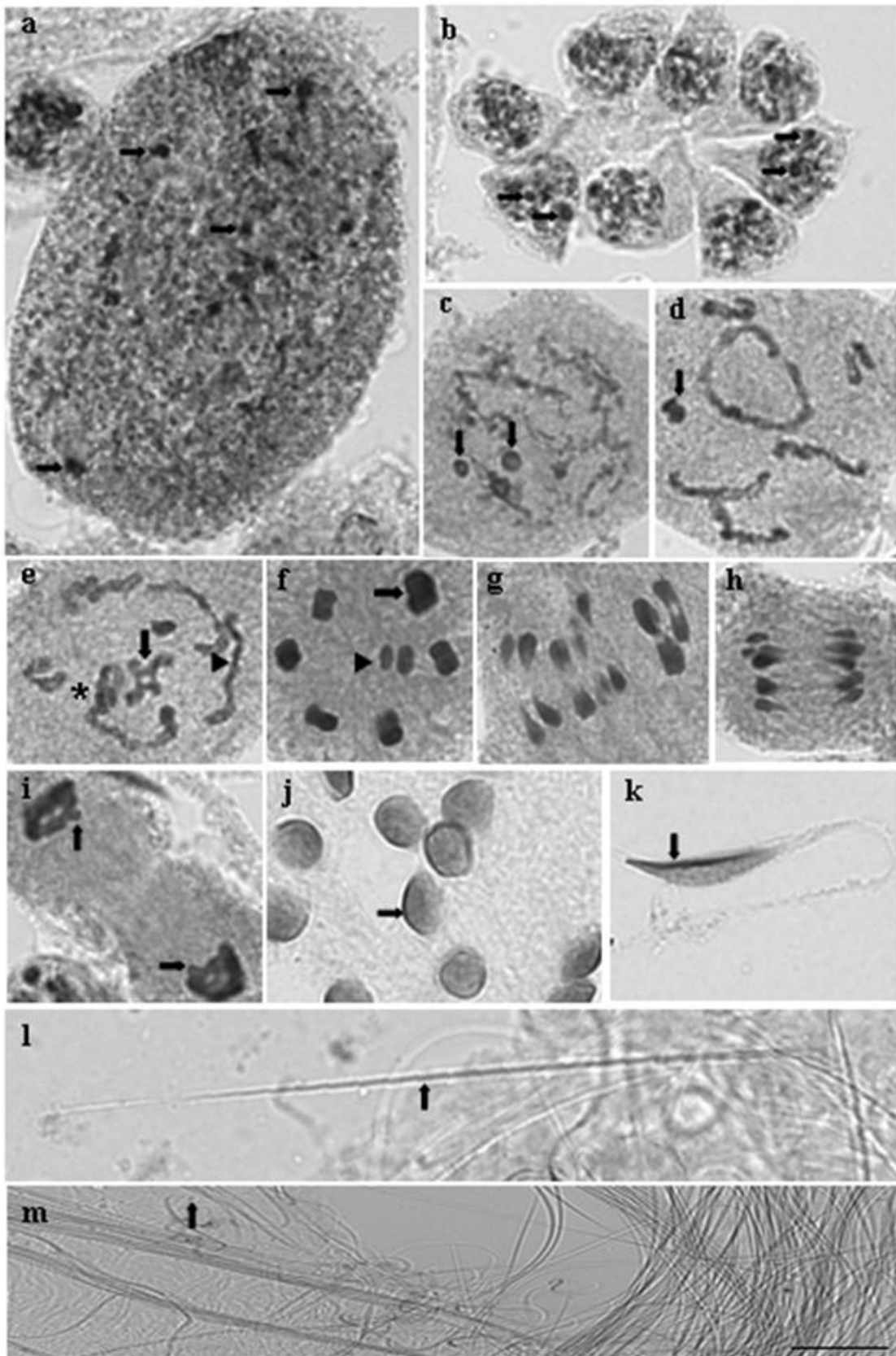


Fig. 2. Germ cells from testicular lobes 1–3 of *Antiteuchus tripterus* stained with lactic acetic orcein. a – several heteropycnotic regions (arrows) in the polyploid nucleus of a nutritive cell from the tubule wall; b – cyst containing 8 spermatogonia; arrows indicate heteropycnotic regions; c – spermatocyte at prophase I (zygotene) with 2 separate heteropycnotic bodies (arrows); d – diplotene spermatocyte showing two associated heteropycnotic bodies (arrow); e – diplotene spermatocyte showing terminal (arrow-head) or interstitial (arrow) chiasmata and complex telomeric associations (arrow-head); f – metaphase I showing 6 autosome bivalents arranged in a circle; the arrow indicates the largest autosome bivalent, the arrow-head indicates the X and Y sex chromosomes situated inside the circle; g – anaphase I spermatocyte; h – anaphase II spermatocyte; i – telophase with late migration of the sex chromosomes (arrows); j – round spermatids with heteropycnotic chromatin (arrow) located at the periphery of the nucleus; k – elongated spermatid with heteropycnotic chromatin located at the periphery of the head (arrow); l – spermatid with a long and thin head (arrow); m – spermatozoon with a small head (arrow) and long tail. Bar = 10  $\mu$ m.



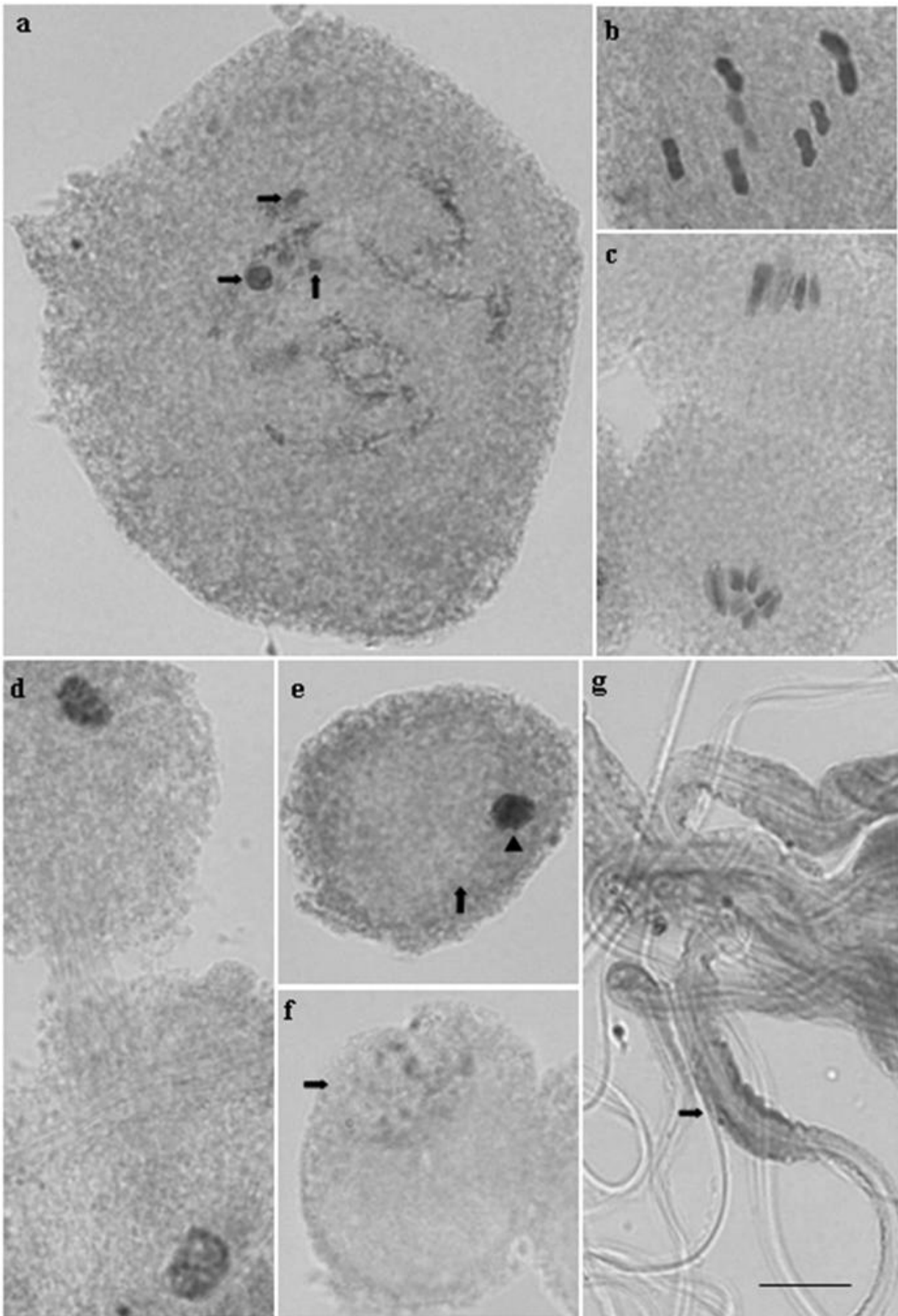


Fig. 3. Germ cells from testicular lobe 4 of *Antiteuchus tripterus* stained with lactic acetic orcein. a – cell at prophase I (“diffuse” stage) with decondensed chromatin and heteropycnotic granules of different sizes (arrows); b – at metaphase II with telomeric association of sister chromatids; c – at anaphase II; d – at telophase; notice that these cells are larger than those in lobes 1–3 (cf. Fig. 2i); e – spermatid with heteropycnotic material (arrow-head) and a large vesicle (arrow); f – decondensed chromatin in the spermatid nucleus (arrow); g – the posterior region of the head of elongated spermatids is broad and has a pleated membrane (arrow). Bar = 10  $\mu$ m.

TABLE 1. Summary of the main cytogenetic and morphological characteristics of the lobes of testes in *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae).

Lobes	Meiosis	Spermiogenesis
1 to 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polyploid cells with several heteropycnotic bodies of different sizes</li> <li>• Prophase I cells exhibit one or two heteropycnotic bodies of different size</li> <li>• Autosomes show terminal or interstitial chiasmata</li> <li>• Sex chromosomes do not form chiasmata</li> <li>• At metaphase I autosomes are often arranged in a circle with the sex chromosomes inside</li> </ul>	Spermatids <ul style="list-style-type: none"> <li>• Heteropycnotic material located at the periphery of the nucleus</li> </ul> Spermatozoon <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apparently normal</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lack polyploid cells</li> <li>• Prophase I cells have "diffuse" stage, heteropycnotic granules of different sizes and large amount of cytoplasm</li> </ul>	Spermatids <ul style="list-style-type: none"> <li>• Heteropycnotic material located at the periphery of the nucleus</li> <li>• Nucleus almost entirely occupied by a large vesicle</li> <li>• Membrane at the posterior end of the head "pleated"</li> </ul> Spermatozoon <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apparently normal</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lack polyploid cells</li> <li>• Prophase I cells have one or two heteropycnotic bodies of different size</li> <li>• Chromosomes not individually apparent at any phase during meiosis</li> <li>• Uneven and variable chromatin distribution at anaphase</li> </ul>	Spermatids <ul style="list-style-type: none"> <li>• Three different sizes (small, medium and large)</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large polyploid nuclei with a large number of heteropycnotic bodies of different sizes</li> <li>• Prophase I cells show "diffuse" stage with one or two heteropycnotic bodies of different size</li> <li>• Cells at metaphase or anaphase not observed</li> <li>• Many telophase cells</li> </ul>	Spermatids <ul style="list-style-type: none"> <li>• A large vesicle inside the nucleus that is smaller than in lobe 4</li> <li>• Membrane at the posterior end of the head "pleated"</li> <li>• Transverse partitions at variable intervals in the "pleated" region of the head</li> </ul> Spermatozoon <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apparently normal</li> </ul>

same degree of staining as the other chromosomes as in lobe 1 to 5. Moreover, in lobe 5, autosomes agglomerate and the sex chromosomes usually remain apart (Fig. 4d, e). At anaphase I, there is an uneven and variable chromatin distribution. As a result, some cells contain larger amounts of chromatin than others (Fig. 4f–h). At the end of the meiotic process, the spermatids contain different quantities of chromatin (Fig. 4i–k), which is mainly around the nuclear envelope (Fig. 4j, k). As spermiogenesis progresses, chromatin distribution is restricted to the region of the nuclear envelope, where it remains when the spermatids elongate (Fig. 4j–l).

Regarding size, at least three types of spermatids are observed: small, medium and large (Fig. 4k, l). As the process continues, the head becomes thinner, but the three different sizes are still detectable (Fig. 4m–o). The head of a spermatozoon is long and thin with chromatin located in the posterior region (Fig. 4o). In this lobe, no polyploid cells were observed.

#### Testicular lobe 6

Lobe 6, located in lobe 5, has large polyploid nuclei and a significantly larger number of heteropycnotic bodies than lobes 1–3 (Fig. 5a). In meiotic prophase I spermatocytes, the mean size of the nucleus is 1.36 times smaller than in lobe 4 and 1.6 times larger than in lobes 1–3 and 5. Each nucleus shows a large heteropycnotic body located at the periphery and a "diffuse" stage aspect

(Fig. 5b). In this lobe, many cells were observed at telophase (Fig. 5c), but none at metaphase or anaphase. At early spermiogenesis, the nucleus is large with the heteropycnotic chromatin located at the periphery of the nuclear envelope, and is inside a vesicular formation. When spermatids start to form a tail, chromatin remains located at the periphery of the nucleus and the vesicle moves to the head region close to the tail (Fig. 5d). The membrane that covers the posterior region of the head is "pleated" and this disappears as spermatids elongate (Fig. 5e). Then, transverse partitions are formed at irregular intervals in this region, which divide it into subregions of different lengths (Fig. 5f). Later, the spermatozoa are similar to those in other lobes, with a small head and long tail. A summary of the morphological and cytogenetics characteristics found at meiosis and spermatogenesis in the lobes is shown in Table 1.

#### DISCUSSION

Montgomery (1898 apud Schrader, 1960b) first established three classes of spermatozoa in the Pentatomidae: large, medium, and small. In the pentatomid *Arvelius albopunctatus* (De Geer), large spermatozoa are approximately 8 times bigger than those in the small category (Schrader & Leuchtenberger, 1950, 1951). In all cases, the production of spermatozoa of different sizes is associated with the presence of multiple testicular lobes. It is noteworthy that, according to these authors, spermatozoa

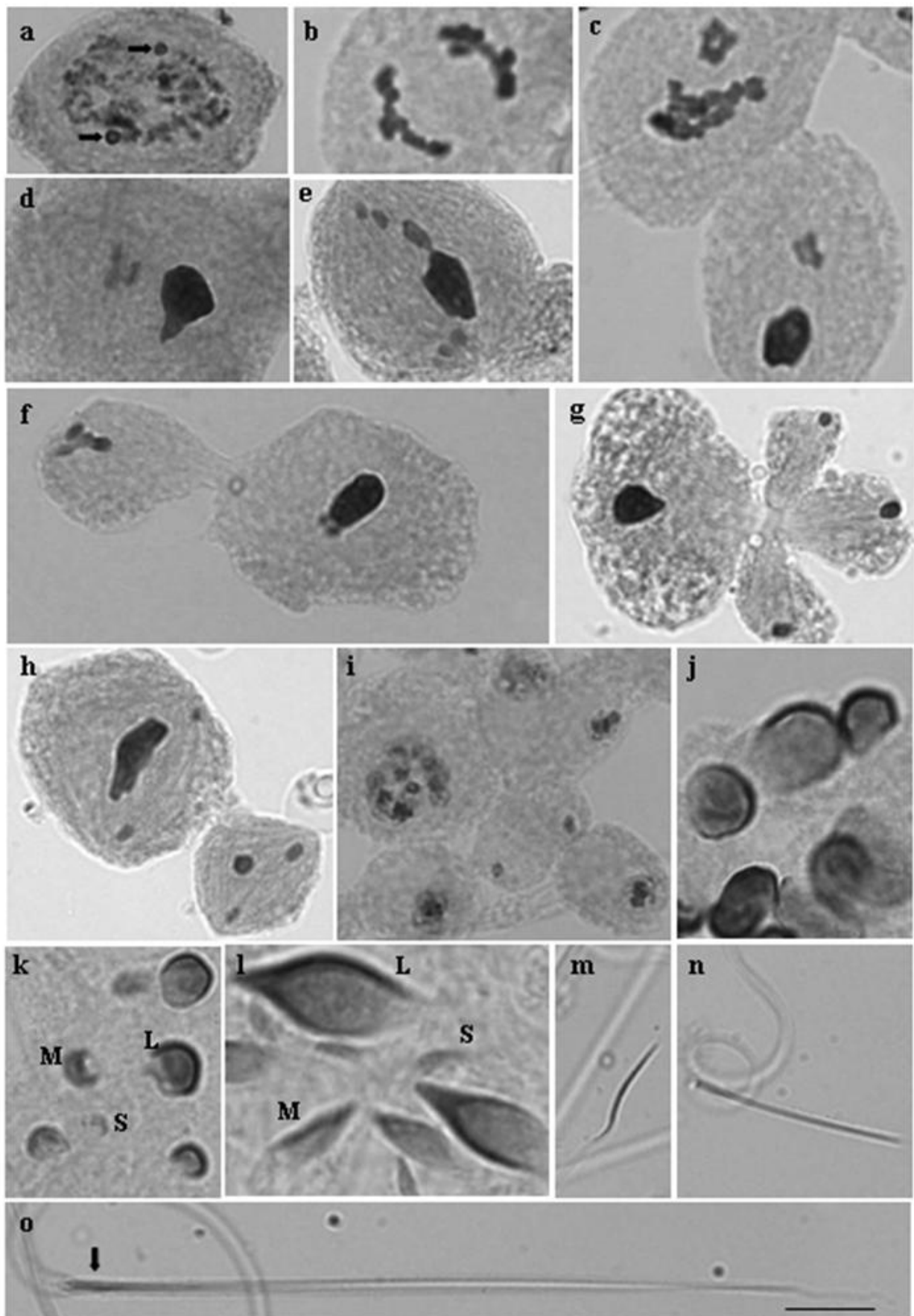


Fig. 4. Germ cells from testicular lobe 5 of *Antiteuchus tripterus* stained with lactic acetic orcein. a – at early meiotic prophase I with two heteropycnotic regions, associated or not with chromosomes (arrows); b, c – at meiotic prophase I; notice the different kinds of chromosomal association; d, e – at metaphase I with autosomes forming a large agglomerate separate from the sex chromosomes; f–h – at anaphase with uneven chromatin distribution among different cells; i – spermatids with different chromatin amounts; j – spermatids with heteropycnotic chromatin in only one region of the nuclear envelope; k – spermatids of different sizes: small (S), medium (M) and large (L); l–o – spermatids of three sizes at different phases of elongation; notice the presence of heterochromatin in the posterior region of the head (o, arrow). Bar = 10  $\mu$ m.

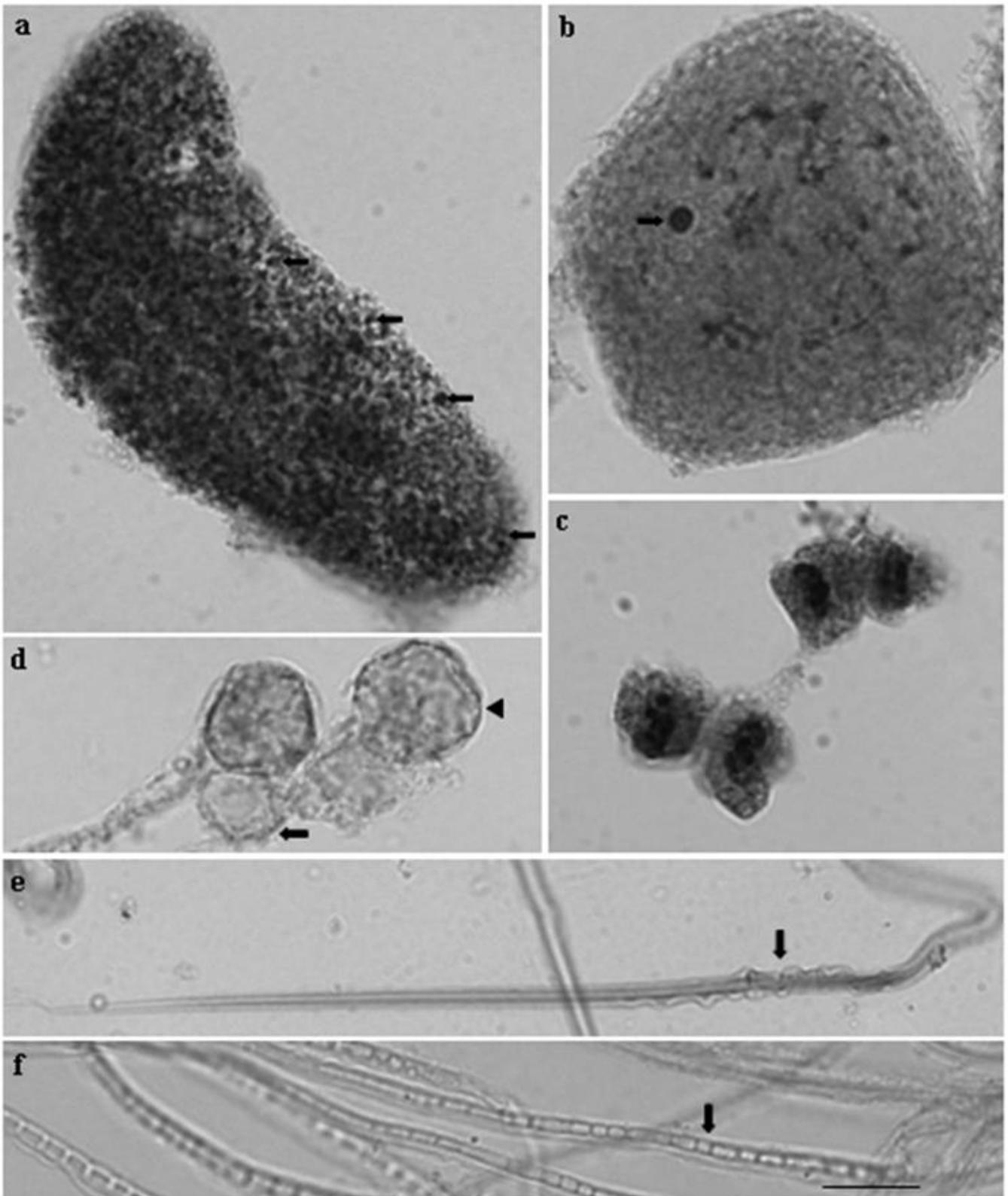


Fig. 5. Germ cells from testicular lobe 6 of *Antiteuchus tripterus* stained with lactic acetic orcein. a – several heteropycnotic bodies (arrows) in a polyploid nucleus of a nutritive cell from the tubule wall; b – at prophase I with a heteropycnotic body (arrow); c – four telophase cells; d – spermatids with heteropycnotic chromatin located at the periphery of the nuclear envelope (arrow-head) and large vesicle (arrow); e–f – elongating spermatid with a pleated membrane (arrow) in the posterior region of the head (e); as elongation progresses partitions develop at irregular intervals (f, arrow). Bar = 10  $\mu$ m.

of different sizes result from normal meiosis. Thus, spermatozoal size would positively correlate with the content of protein and RNA found in the different spermatozoal classes, while the haploid number of chromosomes

remains constant. The size of spermatocytes does not correlate with lobe size, as the lobe that produces the smallest spermatozoa in these organisms is frequently the largest and that which produces the largest spermatozoa

the smallest lobe (Schrader & Leuchtenberger, 1950; 1951; Schrader, 1960a, b).

Another process, polymegaly, observed in a few species belonging to the subfamily Pentatomidae, results in spermatozoa of not only different sizes but also different ploidies (Bowen, 1922a, b; Schrader, 1960a, b). In a review, Rebagliatti et al. (2005) mention the presence of *harlequin* lobes and abnormal meiosis occurring in 22 species of 15 genera of Pentatomidae. In the genus *Loxa*, the number of chromosomes seen in the developing spermatids derived from this lobe varies from 1 (always the sex chromosome) to 100, which is 10 times the haploid number of chromosomes found in this genus (Bowen, 1922a, b; Schrader, 1945a, b; Lanzone & Souza, 2006).

Spermatozoa size is proportional to chromosome number. Even if spermatozoal development is not affected by chromosome number, current evidence indicates that only those with at least one complete chromosome complement reach the ejaculatory duct (Schrader, 1960a). Thus, smaller spermatozoa, with chromosome numbers less than the haploid number, never leave the male reproductive system.

Schrader (1945a, 1960a, b) was surprised to verify that *harlequin* lobes persist throughout the evolutionary process although they are structures that produce heteropolyploid spermatozoa not used in fertilization. This author suggests that heteropolyploid spermatozoa supply nutrients, especially nucleoproteins, for the development of the eggs. The *harlequin* spermatozoa are likely to be infertile. However, neither the regular occurrence of polyspermia, in general, nor the entrance of *harlequin* spermatozoa into eggs, in particular, has been investigated in Pentatomidae (Swallow & Wilkinson, 2002). Heteropolyploid spermatozoa, though not observed by Schrader, could also have nutritive roles (i.e., for females or for fertilizing spermatozoa) (Swallow & Wilkinson, 2002).

Even though previous studies report the production of different types of spermatozoa by different lobes, they do not identify which lobe forms which type of spermatozoa. This is reported in the present study, which demonstrated that *A. tripterus* testis consist of 6 lobes, classified as 1 to 6, each with its own morphological characteristics.

Four of the lobes are small and simple and the largest, which contains another lobe, is designated a compound lobe. This compound lobe has not been previously described in any organism. Also characteristic of *A. tripterus* is the number of lobes (6), while the other species have seven.

*A. tripterus* lobes are longitudinally paired. In three of them (1–3), all phases of normal meiosis were observed, indicating similarity with meiosis in other Heteroptera. In particular we observed the presence of polyploid nuclei to assist nutrition, cystic meiosis, heteropycnotic sex chromosomes at prophase, formation of terminal or interstitial chiasmata, equational first autosomal division and reductional second autosomal division.

In the testicular lobe 4 of *A. tripterus*, however, no cells with the morphology characteristic of the different phases of meiosis were observed. In this lobe, meiotic prophase I

cells are very large and their chromatin is descondensed as in “diffuse” stage. Metaphase, anaphase and telophase spermatocytes are found, with the same size as those in prophase I cells. However, the spermatids are larger than those in other lobes. A special characteristic of the spermatids in this lobe is the presence of a “pleated” membrane in the posterior part of the head.

The testicular lobe 5 of *A. tripterus* does not show prophase I spermatocytes in “diffuse” stage. They are similar to those found in lobes 1–3. Chromosomes associate differently at metaphase I forming agglomerates, in which sex chromosomes do not take part. Chromatin distribution among daughter cells is not equal, and the sizes of these cells also differ. The spermatids found in this lobe are the largest formed by *A. tripterus* and their heads are very big. Furthermore, this lobe forms spermatozoa of three different sizes. The characteristics observed in this lobe correspond to those of the *harlequin* lobe reported in the literature. According to Rebagliatti et al. (2005), a total of 22 species belonging to 15 different Pentatomidae genera have *harlequin* lobes with abnormal meiosis.

The testicular lobe 6 of *A. tripterus*, located inside lobe 5, also has prophase I spermatocytes, similar to those at the diffuse stage, but larger than those in lobe 5. This cell type and telophase cells were the only ones seen in the present analysis. In this lobe, as in lobe 4 a “pleated” membrane also occurs in the posterior region of the spermatid head, which disappears later. Peculiar to this lobe is the presence of transverse partitions in the same region, which distinguish them from the spermatids in other lobes.

Taken together, the observations in the present study show that the meiotic process in *A. tripterus* testes is similar in lobes 1, 2 and 3, which in turn differs from that in the other lobes. In lobes 1–3, cells characteristic of the different meiotic phases are observed, whereas in each one of the other lobes a specific meiotic process takes place. In lobes 4 and 6, there is a great increase in cell size, and a large vesicle is always seen inside the nucleus. Lobe 5, has a different meiotic pattern, which is responsible for the formation of spermatozoa of different sizes. The size of the spermatozoon in the other lobes is normal.

Taking into consideration that in Pentatomidae usually have seven lobes, *A. tripterus* appears to show an intermediate stage in the process of increase or reduction in lobe number. Reduction seems to be the more plausible because lobes 4 and 6 show a meiotic process very different from the conventional and may not form functional spermatozoa. It is also possible to suggest that the presence of the internal lobe facilitates the nutrition of the spermatozoa produced by the *harlequin* lobe, which would give it an important role and justify its retention in the evolutionary process. This hypothesis is corroborated by the presence of polyploid cells in lobe 6 and absence in lobe 5.

In *A. tripterus*, the chromosome number is  $2n = 14$  (12A + XY), as recorded by Schrader (1946, 1960) and the pattern previously described for most Pentatomidae species (Rebagliatti et al., 2005). The observations

described here show that the production of spermatozoa in *A. tripterus* is unusual. Further studies are necessary for a better understanding of this process and its function.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** The authors thank S.M. Oliani and R.S. de Souza for help with the histological preparations – Department of Biology and D.C.R. Feres – Department of Zoology and Botanic, IBILCE/UNESP for using the image capturer; as well as to FUNDUNESP and CNPq for their financial support.

## REFERENCES

- BOWEN R.H. 1922a: Notes on the occurrence of abnormal mitosis in spermatogenesis. *Biol. Bull.* **43**: 184–203.
- BOWEN R.H. 1922b: Studies on insect spermatogenesis. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **57**: 391–423.
- BUCK R.C. 1968: Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. *J. Ultrastruct. Res.* **18**: 489–501.
- COMINGS D.E. & OKADA T.A. 1972: Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* **37**: 177–192.
- DEMEREK M. & KAUFMANN B.P. 1945: *Drosophila Guide*. Baltimore Press, Baltimore, MA.
- FRIEDLÄNDER M., SETH R.K. & REYNOLDS S.E. 2005: Eupyrene and apyrene sperm: Dichotomous spermatogenesis in Lepidoptera. *Adv. Insect Physiol.* **32**: 207–307
- GLAUERT A.M. 1975: Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In Glauert A.M. (ed.): *Practical Methods Electron Microscopy*. Vol. 3. North Holland Publishing, New York, pp. 1–207.
- GONZÁLEZ-GARCÍA J.M., ANTONIO C., SUJA J.A. & RUFAS J.S. 1996: Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Res.* **4**: 124–132.
- GROZEVA S. & NOKKALA S. 2001: Chromosome numbers, sex determining systems, and patterns of the C-heterochromatin distribution in 13 species de Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). *Folia Biol. (Kraków)* **49**: 29–41.
- HODGSON A.N. 1977: Paraspermatogenesis in gastropod mollusks. *Invert. Reprod. Dev.* **31**: 31–38.
- JAMIESON B.G.M. 1986: The spermatozoa of Chilopoda (Uniramia): an ultrastructural review with data on dimorphism in *Ethmostigmus rubripes* and phylogenetic discussion. *J. Submicrosc. Cytol.* **18**: 543–558.
- LANZONE C. & SOUZA M.J. 2006: Chromosome complement and meiosis in three species of the Neotropical bug genus *Antiteuchus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). *Genet. Mol. Biol.* **29**: 49–55.
- MANNA G.K. 1984: Chromosomes in evolution in Heteroptera. In Sharma A.K. (ed.) *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189–225.
- MOTZKO D. & RUTHMANN A. 1984: Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **33**: 205–216.
- NOKKALA S. & GROZEVA S. 2000: Aquiasmatic male meioses in *Myrmedobia coleoptrata* (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae). *Caryologia* **53**: 5–8.
- PAPESCHI A.G. & MOLA L.M. 1990: Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Coreidae, Heteroptera). I. Behavior of univalents in desynaptic individuals. *Genetica* **80**: 31–38.
- REBAGLIATI P.J., MOLA L.M., PAPESCHI A.G. & GRAZIA J. 2005: Cytogenetics studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **43**: 199–213.
- REEVES A. & TEAR J. 2000: MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.
- ROSATI F., BAGGETTI B. & DALLAI R. 1970: The spermatozoon of Arthropoda. X. Araneid and the lower myriapods. In Baccetti B. (ed.): *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, pp. 247–254.
- SCHRADER F. 1945a: Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). *Biol. Bull.* **88**: 63–70.
- SCHRADER F. 1945b: The cytology of regular heteroploidy in the genus *Loxa* (Pentatomidae – Hemiptera). *J. Morphol.* **76**: 157–177.
- SCHRADER F. 1946: Autosomal elimination and preferential segregation in the harlequin lobe of certain Discocephalini (Hemiptera). *Biol. Bull.* **90**: 264–290.
- SCHRADER F. 1960a: Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). *Chromosoma* **11**: 103–128.
- SCHRADER F. 1960b: Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatomidae (Heteroptera). *Evolution* **14**: 498–508.
- SCHRADER F. & LEUCHTENBERGER C. 1950: A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Exp. Cell Res.* **1**: 421–452.
- SCHRADER F. & LEUCHTENBERGER C. 1951: The cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. *Chromosoma* **4**: 404–428.
- SIVINSKI J. 1980: Sexual selection and insect sperm. *Fla Entomol.* **63**: 99–111.
- SUJA J.A., DEL CERRO A.L., PAGE J., RUFAS J.S. & SANTOS J.L. 2000: Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma* **109**: 35–43.
- SWALLOW J.G. & WILKINSON G.S. 2002: The long and short sperm polymorphism in insects. *Biol. Res.* **77**: 153–182.
- TARTAROTTI E. & AZEREDO-OLIVEIRA M.T.V. 1999: Meiosis patterns of holocentric chromosomes in Triatomines Genus *Panstrongylus*. *Cytologia* **64**: 235–240.
- UESHIMA N. 1979: Hemiptera II: Heteroptera. In: John B. (ed.) *Animal Cytogenetics*. Vol. 3, *Insecta 6*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 117 pp.

Received October 6, 2006; revised and accepted January 19, 2007



**Padrão de coloração pelo nitrato de prata durante a meiose e espermiogênese nos lobos testiculares de *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae)**

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Pattern of silver nitrate-staining during meiosis in testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 196-206, 2008.

**Resumo:** As análises permitiram verificar que os lobos testiculares de *A. tripterus* diferiram quanto à atividade nucleolar. De modo geral, essas diferenças, detectadas pelo uso da técnica de impregnação pelos íons prata, relacionaram-se ao número, tamanho, intensidade de coloração e posição dos corpúsculos ou material nucleolar, bem como as suas alterações no decorrer da espermatogênese. Os lobos 1 a 3 caracterizaram-se por apresentar resultados semelhantes quanto a esses aspectos. Os lobos 4 a 6, porém, diferiram entre si e em relação aos lobos 1 a 3. Os lobos 1 a 3, cuja meiose, previamente descrita, segue os padrões considerados normais, sugeriram que essa espécie apresenta um par de cromossomos portador da região organizadora nucleolar, como já havia sido observado para outras espécies de Pentatomidae. Em geral, a quantidade de material nucleolar observado nas células dos lobos 1 a 3 é menor do que nos demais lobos. As diferenças entre os lobos ocorrem ao longo de todo o processo de espermatogênese, sendo observadas, inclusive, na morfologia do material impregnado pela prata presente na cabeça das espermátides. Dado que a função fundamental do nucléolo é seu envolvimento na síntese protéica, as variações interlobulares devem estar relacionadas às funções atribuídas aos diferentes lobos: reprodução normal para os lobos 1 a 3 e função basicamente nutricional para os lobos 4 a 6. Tanto quanto saibamos, este é o primeiro estudo da atividade nucleolar ao longo da espermatogênese e individualmente para cada lobo testicular.



## Pattern of silver nitrate-staining during meiosis and spermiogenesis in testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae)

H.V. Souza, M.M.U. Castanhole, H.E.M.C. Bicudo and M.M. Itoyama

Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia,  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,  
Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Corresponding author: M.M. Itoyama  
E-mail: mary@ibilce.unesp.br

Genet. Mol. Res. 7 (1): 196-206 (2008)  
Received November 10, 2007  
Accepted December 11, 2007  
Published January 26, 2008

**ABSTRACT.** The pattern of silver nitrate (Ag)-staining differed among testicular lobes of *Antiteuchus tripterus*. In general, these differences are in regard to the number, size, shape, coloring intensity, and location of the stained bodies or masses, observed during meiosis and spermiogenesis. These characteristics were similar in lobes 1-3. Lobes 4-6, however, differed from each other and from lobes 1-3 as well. Because the Ag-staining method is specific for nucleolar organizing regions and nucleolar material, the observations in meiosis of lobes 1-3 suggested the presence of a single pair of nucleolar organizing region-bearing chromosomes in *A. tripterus*, as previously found in other Pentatomidae species. In general, the amount of Ag-stained material seen in meiosis of the testicular lobes 1-3 of *A. tripterus* is smaller than in the other lobes. The differences among

lobes observed during spermiogenesis included a striking variation in morphology of the Ag-stained material found in the head and tail of the spermatids. Given that the key role of the nucleolar material is to participate in protein synthesis, interlobular variations seem to be related to the different functions attributed to each lobe (reproduction to lobes 1-3 and basically nutrition to lobes 4-6). To our knowledge, this is the first time that the nucleolar material was studied in each testicular lobe during spermatogenesis. The present observations encourage further studies since, in addition to being of basic biological interest, several Pentatomidae species are agricultural pests and added knowledge of their biology, mainly in reproduction, may be important for the development of control strategies.

**Key words:** Heteroptera; Pentatomidae; *Antiteuchus*; Nucleolus; Testicular lobe differentiation

## INTRODUCTION

In most arthropod species, nucleoli dissociate at either diplotene or diakinesis. Therefore, small bodies impregnated by the silver nitrate (Ag) technique, which is specifically used to stain proteins that bind to ribosomal RNA (rRNA), cannot be seen from metaphase to telophase I. As spermatids begin to form, nucleolar bodies reappear, indicating resumption of rRNA transcription, and finally disappear at the end of spermatid development (Bressa et al., 2003). However, some exceptions have been reported. In *Asellus aquaticus* (Isopoda), Ag-nucleolar organizing region (NOR) bodies have been visualized throughout spermatogenesis (Di Castro et al., 1983). In *Callicrania seanei* (Orthoptera), not only NORs have been observed during both divisions, but also nucleolar bodies scattered among chromosomes during interkinesis and even pro-metaphase II (Santos et al., 1987). In *Triatoma infestans* and *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), Ag-NOR-stained masses have been observed up to metaphase I (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997). In *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae), nucleolar semi-persistence (presence of nucleolar bodies in metaphases) has been reported up to metaphase II (Fossey and Liebenberg, 1995), while in *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) and *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae), nucleoli have been detected in metaphase plates of both primary and secondary spermatocytes (Yoshida, 1947; Bressa et al., 2003).

In the present study, nucleolar activity was assessed in the testes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). As described by Souza et al. (2007) this species has six testicular lobes (numbered 1 through 6). Lobe 5 contains lobe 6 in its interior and is, therefore, a compound lobe. Using the stain lacto-acetic orcein, the same authors observed that in lobes 1 through 3, meiosis is the same as in other Heteroptera species previously described. In lobe 4, however, the morphology of meiotic prophase cells is characteristic of the so-called "diffuse" stage. In this lobe, meiotic cells are always larger than those in lobes 1-3 displaying a region of peculiar "pleated" appearance in the posterior region of the spermatid head. Lobe 5 is called "harlequin" because it forms spermatozoa of different sizes. Lobe 6, contained by lobe 5, shows prophase cells, also at a "diffuse"-like stage,

larger than in lobe 5; in lobe 6 there are cross-partitions in the posterior region of the head and anterior region of the tail, which are not found in any of the other lobes (Souza et al., 2007).

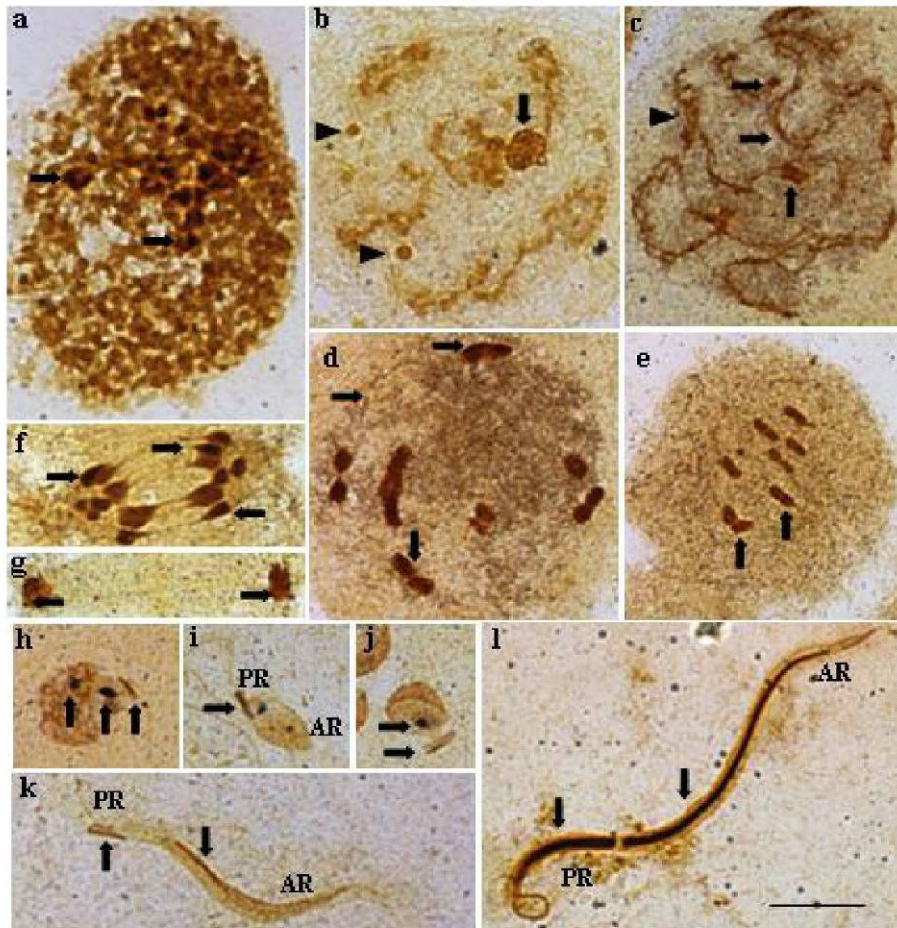
In the present study, using silver nitrate technique, variations in the morphology and positioning of the nucleolar material were analyzed in the six testicular lobes of *A. tripterus* during meiosis and spermiogenesis. The aim was to provide further information on cytogenetic differentiation of these testicular structures in meiosis and spermiogenesis of Heteroptera species.

## MATERIAL AND METHODS

Insects were collected in São José do Rio Preto, SP, Brazil, and dissected in Demerec physiological solution (Demerec and Kaufmann, 1945). The lobes of the seminiferous tubules were isolated according to the technique described by Souza et al. (2007). Testes were incubated for 20 min after adding a drop of trypsin and EDTA solution (0.005 g trypsin and 0.002 g EDTA diluted in 10 mL Hank's solution (1.4 mM NaCl, 70 mM KCl, 4.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM glucose, 0.045 mM phenol red), and the lobes were then separated, placed on different slides, fixed and stained with silver nitrate according to Howell and Black (1980). This technique specifically stains proteins that associate with rRNA following transcription (Howell et al., 1975; Goodpasture and Bloom, 1975; Miller et al., 1977). The images that illustrate this study were obtained under an AXIOSKOP 2 ZEISS light microscope (AXIO VISION software) in the Morphology Laboratory of the Department of Biology, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

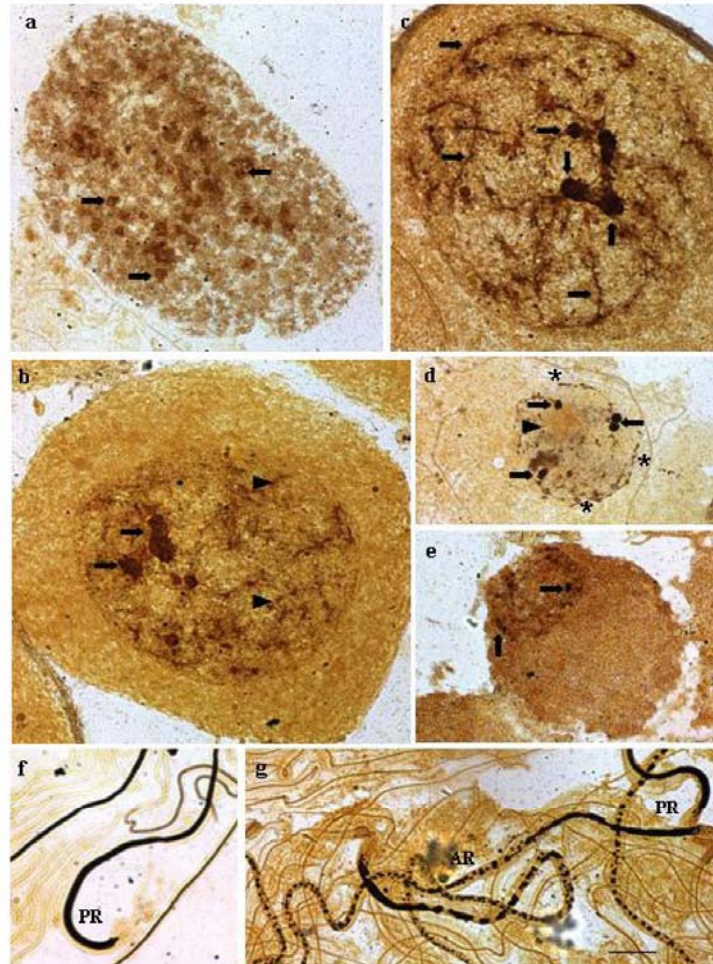
## RESULTS

The assessment of the characteristics of silver-impregnated nucleolar material, in each of the six testicular lobes of adult *Antiteuchus tripterus* specimens, showed that in lobes 1-3 polyploid nuclei of the nutritive cells exhibit numerous silver-impregnated nucleolar granules, some of them fused together (Figure 1a), while spermatogonial cells at early prophase I (zygotene) display a strongly stained, large nucleolus and two more weakly stained, smaller bodies (Figure 1b). As division advances, all three nucleoli undergo size reduction and structural disorganization and part of the nucleolar components associates with chromosomal regions or lies along the length of the chromosomes (Figure 1c). During diplotene/diakinesis and metaphase I, and also at metaphase II, the nucleolar components are apparently distributed at the periphery in almost all chromosomes (Figure 1d,e) (the chromosomal complement of this species is  $2n = 12A + XY$ ). At anaphase I and II and telophase, the nucleolar components are associated with two chromosome pairs (Figure 1f,g). In the round spermatid, there are two spherical Ag-stained bodies and another that is either elongate or rod-shaped (Figure 1h). During the formation of the spermatozoal tail, one of the round bodies is located at the anterior region of the head while the other and the rod-shaped body migrate together to the beginning of the posterior region (Figure 1i,j). The spermatids at a more advanced developmental stage, which already show a very elongate head, display two very evident, large, Ag-stained regions, occupying almost the entire head, separated from each other by a transverse band (Figure 1k,l).



**Figure 1.** Silver nitrate-stained cells of *Antiteuchus tripterus* testicular lobes 1-3. (a) Polyloid nucleus with several silver-stained regions (arrows); (b) prophase I, zygotene - a larger, more evident nucleolus (arrow) and two smaller and not so evident nucleolar bodies (arrowheads); (c) leptotene - larger number of stainings at specific chromosomal regions (arrows) or smaller number binding along chromosomes (arrowhead); (d) diakinesis with silver staining at the periphery in the chromosome (arrows); (e) metaphases II - chromosomes showing silver staining (arrows); (f) anaphase I - chromosomes with silver staining at the periphery in the chromosome (arrows); (g) telophase - beginning of nucleolar reorganization (arrows); (h) spermatid with two round and one rod-shaped nucleolar silver staining (arrows); (i-k) as the spermatid elongates, one round body localizes in the anterior region and the other round plus the rod-shaped bodies migrate to the posterior region of the spermatid head (arrows); (l) spermatids at a more advanced developmental stage display two regions separated from each other by a transverse band (arrows). AR = anterior region; PR = posterior region of the spermatid head. Bar = 10  $\mu$ m.

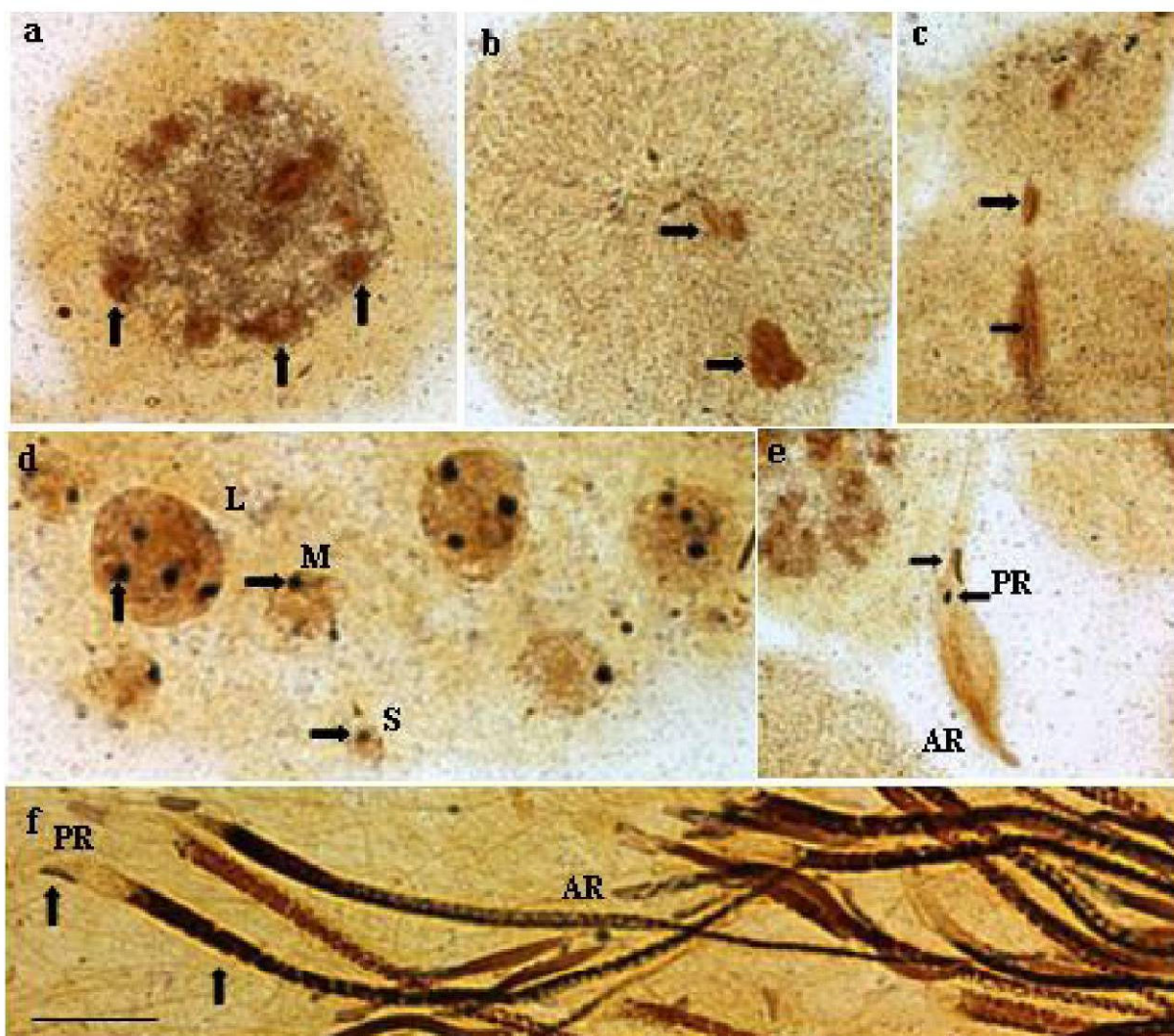
In lobe 4, the polyloid nuclei show a large number of silver-impregnated bodies, more numerous and greater than in lobes 1-3 (Figure 2a). At the “diffuse” stage, which characterizes the prophase in spermatogonial cells in this lobe, large and strongly stained nucleolar masses are observed. As cell division advances, smaller Ag-stained regions are also seen in the chromosomes (Figure 2b,c). The round spermatids exhibit 4 strongly stained bodies and one larger region more weakly stained (Figure 2d,e). In the elongate spermatids, the head is strongly and almost completely impregnated with silver. Later, the stained region subdivides into fragments of diverse sizes and spacing (Figure 2f,g).



**Figure 2.** Silver nitrate-stained cells of *Antiteuchus tripterus* testicular lobe 4. (a) Polyploid nucleus with several silver-stained regions (arrows); (b, c) cells at “diffuse” stage evidencing strongly silver-stained regions (arrows) and silver staining along the chromosomes (arrowheads); (d, e) round-shaped spermatids showing strongly stained bodies (arrows) and one larger, weakly stained region (arrowhead), as well as small deposits along the chromosomes (asterisks); (f) anterior and posterior regions of the spermatid head are strongly stained; as development advances the stained anterior region subdivides, and that in the posterior region remains homogeneous (g). AR, PR = anterior and posterior regions of the spermatid head, respectively. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

In lobe 5, the spermatogonial cells at prophase have large silver-stained masses present amid the decondensed chromosomes (Figure 3a). At metaphase I and anaphase I, filaments connecting stained chromatin masses can be observed (Figure 3b,c). The round spermatids formed in this lobe are of three different sizes (small, medium and large) as described by Souza et al. (2007). The number of nucleolar bodies varies based on spermatid size: smaller spermatids usually display one nucleolar body, while larger ones have four (Figure 3d). When the spermatid nucleus starts to elongate, two silver-stained bodies, one round and the other rod-shaped, are observed in the posterior region of the developing head (Figure 3e). Later, the three types of elongate spermatids exhibit a large-stained area in the anterior region of the head, separated from a smaller stained region located in the

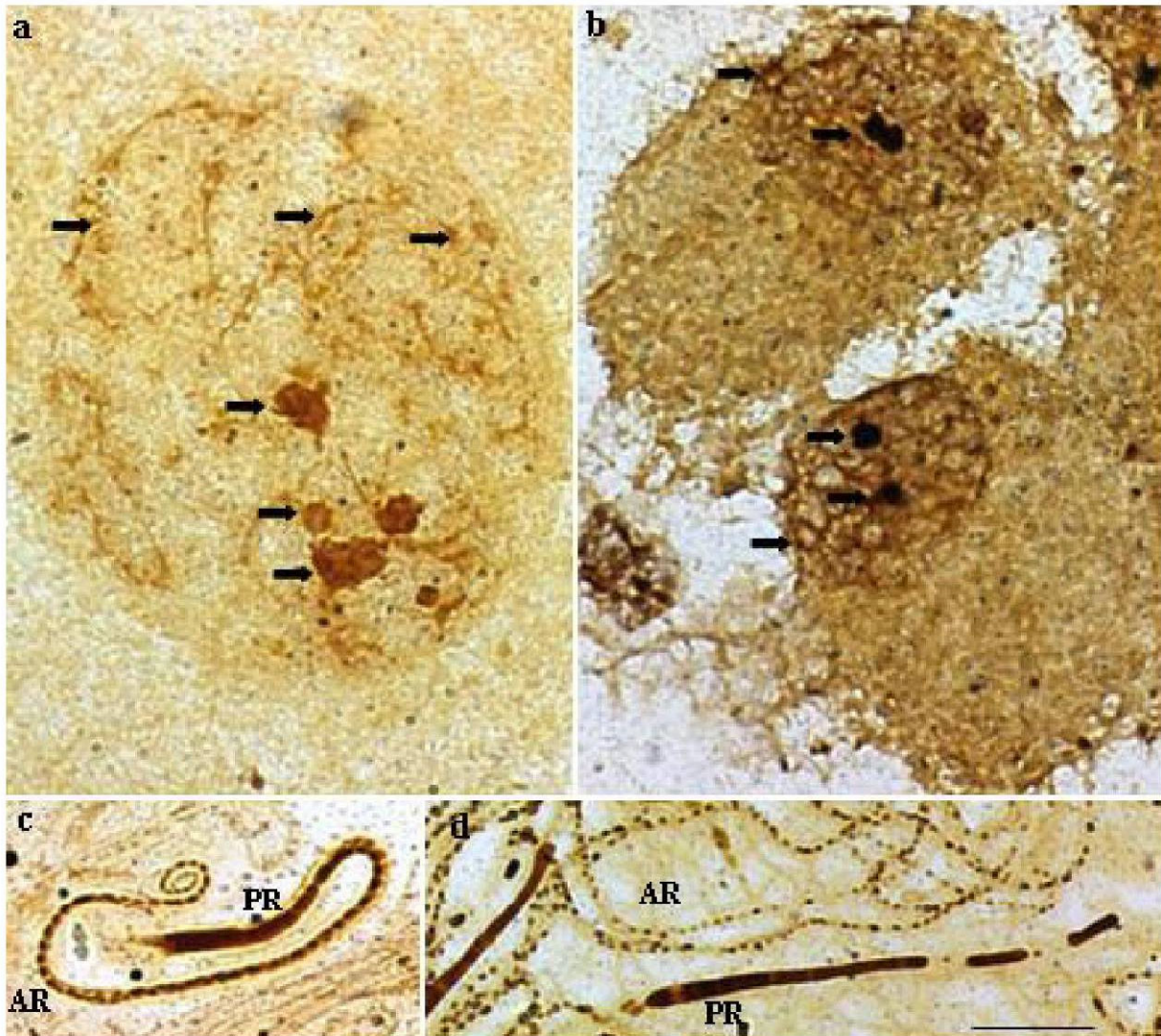
posterior region (Figure 3f). As development proceeds, this material is distributed in the anterior region of the spermatid showing an apparently coiled organization.



**Figure 3.** Silver nitrate-stained cells of *Antiteuchus tripterus* testicular lobe 5. (a) Cell at meiotic prophase I with silver-stained regions (arrows); (b) metaphase I with stained filaments in the chromatin mass (arrows); (c) anaphase I with silver-stained filaments joining chromatin masses (arrows); (d) small (S), medium (M) and large (L) round-shaped spermatids with a variable number of nucleoli (arrows); (e) one silver-stained round and one rod-shaped nucleolar body in the posterior region of the elongating spermatid head (arrows); (f) a heterogeneous-, large-stained area in the anterior region separated from a small-stained region located in the posterior region of the head (arrows). AR = anterior region; PR = posterior region of the spermatid head. Bar = 10  $\mu$ m.

In lobe 6, which also shows spermatogonial cells at the “diffuse” stage, nucleolar bodies have different sizes and are apparently associated with the dispersed chromatin (Figure 4a). The round spermatids are large and show two large, strongly stained nucleoli (Figure 4b).

The elongate spermatids exhibit a large deposit of nucleolar material, which occupies all the interior of the head being discontinuous in its anterior region and continuous in the posterior region (Figure 4c,d).



**Figure 4.** Silver nitrate-stained cells of *Antiteuchus tripterus* testicular lobe 6. (a) Cells at “diffuse” stage show 3 larger and 2 smaller nucleoli and silver impregnation along chromatin threads (arrows); (b) spermatids with 2 nucleoli and silver impregnation along the chromosomes (arrows); (c, d) elongate spermatids showing the posterior region with a homogeneous deposit of nucleolar proteins while a heterogeneous deposit is seen in the anterior region. AR = anterior region; PR = posterior region of the spermatid head. Bar = 10  $\mu$ m.

A summary of the variations in morphology and location of the stained nucleolar bodies among the testicular lobes are shown in Table 1.

**Table 1.** Comparison of the observations on the morphology (number, size, shape, and coloring intensity) and location of the nucleolar material in the different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus*, during meiosis and spermiogenesis.

Phase	Testicular lobes			
	Lobes 1-3	Lobe 4	Lobe 5	Lobe 6
Polyploid nucleus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Many nucleolar body grains, some of them fused to each other;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Many nucleolar bodies of different sizes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack polyploid cells;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack polyploid cells;</li> </ul>
Prophase I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Three nucleolar bodies, one greater and more strongly stained than the others;</li> <li>- Later the nucleolar bodies decrease in size and dissociate;</li> <li>- At the end of prophase I the nucleolar material appears distributed along the chromosomes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presence of "diffuse" stage showing, large and strongly stained nucleolar masses and minor bodies. At the final of prophase there are only little bodies present along chromosomes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In the initial prophase, several great nucleolar bodies are present with the decondensed chromosomes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presence of "diffuse" stage, with several nucleolar bodies of different sizes apparently associated with the dispersed chromatin;</li> </ul>
Metaphases I and II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleolar material is at the periphery in the chromosomes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack cells in this stage;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stained threads inside chromatin masses;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack cells in this stage;</li> </ul>
Anaphase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleolar material is associated with two chromosome pairs;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack cells in this stage;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stained threads inside chromatin masses;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack cells in this stage;</li> </ul>
Round spermatid	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Two round and 1 rod-shaped nucleolar bodies;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Four strongly stained nucleolar bodies and another greater but slightly stained one;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Number of nucleolar bodies vary from one (in small spermatids) to 4 (in greatest spermatids);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Two great nucleolar bodies are observed in this phase;</li> </ul>
Elongated spermatid	<ul style="list-style-type: none"> <li>- One round nucleolar body located at the anterior region of the spermatid head while the other round plus the rod-shaped bodies migrate to the posterior region of the head;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleolar material homogeneously present in the entire head;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Two nucleolar bodies being one round and one rod-shaped are at the posterior region of the spermatid head;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleolar material fulfill the spermatid head at the end of developmental stage but in the anterior region it appears separated in many parts.</li> </ul>
Spermatids at the final developmental stage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleolar material is fulfilling the entire head, and appears divided in two regions by an unstained region.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleolar material in the anterior region divided into parts of different sizes and differently spaced from each other.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- At the final stage of development Ag-impregnated material fulfill the entire head of the spermatid but that material shows an apparently coiled organization.</li> </ul>	



## DISCUSSION

NORs are the chromosomal regions that associate with nucleoli and are responsible for their production. Ribosomal DNA that encodes rRNA is located in NORs (McClintock, 1934; Brown and Gurdon, 1964; Perry, 1965).

The Ag technique is normally used to stain NORs and nucleoli. However, sometimes NORs fail to stain. This was the case in the present study: silver-staining technique did not impregnate NORs. Thus, the number and chromosomal location of NORs could not be determined with certainty in *A. tripterus*. The number of nucleolar bodies is not a reliable indicator for this purpose, because the number of these bodies present in a cell may not correspond to the number of NORs, as two or more of these structures may associate to form a single nucleolar body (Ferguson-Smith and Handmarker, 1961). However, an indication was provided by the spermatogonial cells at early prophase I, in lobes 1-3 (the lobes which show the standard meiosis). In these lobes, a characteristic pattern of a large, well-defined nucleolus and two smaller nucleolar bodies is observed. As described in other insects, such as *Drosophila*, the large body could be the main nucleolus and the two smaller ones could be additional nucleoli produced by secondary NORs (Bicudo, 1982). Thus, it is possible that in *A. tripterus*, there is indeed a single NOR. This is also suggested by the stained region seen in two chromosomes at anaphase I, indicating that this single NOR is located in one autosomal pair, as has been previously reported in other Pentatomidae species.

The number and localization of NORs are known in only a few Heteropteran species and have been determined by different cytogenetic techniques. All the species described to date show only one NOR at the middle or subterminal portion of an autosome or sex chromosome (Camacho et al., 1985; Fossey and Liebenberg, 1995; González-García et al., 1996; Papeschi and Bressa, 2002; Papeschi et al., 2003; Cattani et al., 2004). In Pentatomidae, a single NOR was detected at an autosomal telomeric region in *Edessa meditabunda* (Rebagliati et al., 2003), at the median portion of an autosome in *Nezara viridula* (Camacho et al., 1985; Papeschi et al., 2003), and at the telomeric region of the X chromosome in *Graphosoma italicum* (González-García et al., 1996).

Additionally, in the present study, the changes of Ag-stained material that took place during meiosis and spermiogenesis in the six testicular lobes could be observed. Variations include the number, size, shape, and distribution of nucleolar bodies. These features were similar in lobes 1-3. The remaining lobes, however, differed from each other and from lobes 1-3 as well. One of the differences is that in prophase cells the number and size of nucleolar bodies were greater in lobes 4 and 6 than in lobes 1-3. Due to the role played by the nucleolus in protein synthesis, this difference could be related to the function attributed to each lobe. While lobes 1-3 seem to be responsible for the production of spermatozoa involved in reproduction (Sivinski, 1980; Silberglied et al., 1984; Swallow and Wilkinson, 2002), lobes 4-6 seem to be involved in nutrition (Souza et al., 2007).

Another observation was that, in metaphase cells, nucleolar bodies are no longer visible but remain associated with the chromosomes at metaphases and anaphases in lobes 1-3 and 5 (in the remaining lobes, no cells were detected at these phases of the cell cycle). These observations indicate the persistence of partially organized nucleolar material during the entire meiosis in *A. tripterus*, a pattern that, to our knowledge, has not been described in meiotic chromosomes.

The differences among the testicular lobes as to the organization of the Ag-stained material in the elongate spermatids were striking, varying from an almost completely ho-

mogeneous distribution, as observed in lobes 1-3, to a division in parts of different size and spacing, observed in lobes 4 and 6, or even displaying an apparently coiled organization, as in lobe 5. For now, we cannot explain the role of these variations. However, they and several of the other features described here encourage further investigations in the testicular lobes of *A. tripterus* in order to assess their functional meaning. In addition to the biological interest, the Pentatomidae include important agricultural pests for which an added knowledge of their biology may be helpful in the development of control methods.

## ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks go to Prof. Dr. Sonia Maria Oliani of the Department of Biology, IBILCE/UNESP for the opportunity to capture cell images, and to FAPESP, FUNDUNESP and CNPq for their financial support.

## REFERENCES

- Bicudo HEMC (1982). Silver staining and the nucleolar organizing activity in *Drosophila* species of the mulleri complex and their hybrids. *Rev. Bras. Genet.* 5: 31-50.
- Bressa MJ, Papeschi AG, Fumagalli E, van Doesburg PH, et al. (2003). Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blute, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. *Folia Biol.* 51: 135-141.
- Brown DD and Gurdon JB (1964). Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 139-146.
- Camacho JPM, Belda J and Cabrero J (1985). Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed C-banding and silver impregnation. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 490-497.
- Cattani MV, Greizerstein EJ and Papeschi AG (2004). Male meiotic behavior and nucleolus organizer regions in *Camptischium clavipes* (Fabr.) (Coreidae, Heteroptera) analyzed by fluorescent banding and *in situ* hybridization. *Caryologia* 57: 267-273.
- Demerec M and Kaufmann BP (1945). *Drosophila* Guide. The Lord Baltimore Press, Baltimore.
- Di Castro M, Prantero G, Cipriani A and Rocchi A (1983). Silver staining analysis of nucleolar-organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). *Genetica* 60: 163-166.
- Ferguson-Smith MA and Handmaker SD (1961). Observations on the satellited human chromosomes. *Lancet* 1: 638-640.
- Fossey A and Liebenberg H (1995). Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carlisis wahlbergi* Stal (Coreidae: Heteroptera). *Cytobios* 81: 7-15.
- González-García JM, Antonio C, Suja JA and Rufas JS (1996). Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 4: 124-132.
- Goodpasture C and Bloom SE (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Howell WM, Denton TE and Diamond JR (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31: 260-262.
- McClintock B (1934). The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch.* 21: 294-328.
- Miller DA, Tantravahi R, Dev VG and Miller OJ (1977). Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *Am. J. Hum. Genet.* 29: 490-502.
- Papeschi AG and Bressa MJ (2002). Cytogenetic studies in Belostomatidae from Argentina. In: Abstracts of the Second Quadrennial Meeting of the International Heteropterists Society, St. Petersburg, 46.
- Papeschi AG, Mola LM, Bressa MJ, Greizerstein EJ, et al. (2003). Behaviour of ring bivalents in holokinetic systems: alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 11: 725-733.

- Perry RP (1965). The nucleolus and the synthesis of ribosomes. *Natl. Cancer Inst. Monogr* 18: 325-340.
- Rebagliati P, Papeschi AG and Mola LM (2003). Meiosis and fluorescent banding in *Edessa meditabunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). *Eur. J. Entomol.* 100: 11-18.
- Santos J, Sentis C and Fernandez-Piqueras J (1987). Pattern of nucleolar organizer region activity during male meiosis in *Callicrania seoanei* (Orthoptera) as analyzed by silver staining: evidences for a possible reactivation in the period between the two meiotic divisions. *Genome* 29: 516-518.
- Silberglied RE, Shepherd JG and Dickinson JL (1984). Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am. Nat.* 123: 255-265.
- Sivinski J (1980). Sexual selection and insect sperm. *Fla. Entomol.* 63: 99-111.
- Souza HV, Bicudo HEMC, Costa LAA and Itoyama MM (2007). A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). *Eur. J. Entomol.* 104: 353-362.
- Swallow JG and Wilkinson GS (2002). The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 77: 153-182.
- Tavares MG and Azeredo-Oliveira MTV (1997). Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analyzed by silver staining. *Cytobios* 89: 93-103.
- Yoshida T (1947). Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. (Zool.)* 9: 243-249.



**Padrões morfológicos da cromatina heteropicnótica e do material nucleolar na meiose e espermiogênese de alguns Pentatomidae (Heteroptera)**

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. C.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Morphological patterns of the heteropycnotic and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus* e *Oebalus ypsilon-griseus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p.686-691, 2008.

**Resumo:** Os insetos da família Pentatomidae, que incluem várias pragas da agricultura, vêm sendo analisados quanto a diferentes aspectos da meiose e espermiogênese. No presente estudo, o enfoque foi dirigido para os padrões morfológicos da cromatina heteropicnótica e do material nucleolar de espécies de dois gêneros. Os resultados mostraram que os testículos das três espécies analisadas é multilobado, sendo constituído por três em *Mormidea v-luteum* e quatro nas duas espécies do gênero *Oebalus*. A análise citogenética realizada nesses lobos permitiu caracterizar o cariótipo de todas como constituído por  $2n=14$  cromossomos (12A + XY). Outras características como ausência de lobo testicular *harlequin*, meiose quiasmática, migração tardia dos cromossomos sexuais e semi-persistência nucleolar foram comuns às três espécies. Elas também compartilharam várias das observações quanto aos padrões da cromatina heteropicnótica e do material nucleolar, mas se diferenciaram por outras, entre as quais destacamos a distribuição do material heteropicnótico nas espermátides e a morfologia e distribuição do material nucleolar, no zigóteno. As diferenças ocorreram sempre entre as espécies do gênero *Oebalus* de um lado e a espécie *Mormidea v-luteum* do outro, sugerindo tratar-se de diferenças selecionadas no processo evolutivo que originou os dois gêneros.



## Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera)

Hederson Vinicius de Souza<sup>1</sup>, Márcia Maria Urbanin Castanhole<sup>1</sup>,  
Hermione Elly Melara de Campos Bicudo<sup>1</sup>, Luiz Antônio Alves Costa<sup>2</sup> and Mary Massumi Itoyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Entomologia, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

### Abstract

Pentatomidae is a family of Heteroptera which includes several agriculture pests that have had different aspects of their meiosis and spermiogenesis analyzed. In the present study we analyzed the morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and the nucleolar material of *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus* and *Oebalus ypsilone*. The three species presented multilobate testes, with three lobes in *M. v-luteum* and four in the *Oebalus* species. A karyotype with  $2n = 14$  chromosomes ( $12A + XY$ ) was observed in the three species. Several characteristics were common to the three species, such as the absence of a testicular *harlequin* lobe (a lobe which produces different types of spermatozoa, previously considered a general characteristic of this family), late migration of the sex chromosomes and semi-persistence of the nucleolus. The three species also shared some characteristics regarding the patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material, but differed in others mainly related to the location of the heteropycnotic chromatin in the spermatids and the morphology and distribution of the nucleolar material at zygotene. The differences were always between species from different genera, suggesting a relationship with their genetic divergence.

**Key words:** nucleolus semi-persistence, late chromosome migration, multilobed testes.

Received: November 23, 2007; Accepted: March 13, 2008.

### Introduction

Most Heteroptera feed on plantations or grains stored for human consumption during their nymph and adult stages, causing great economical losses. Heteroptera includes approximately 37,000 species distributed in eight infraorders, five of which contain noxious species (Rebagliati *et al.*, 2005). The family Pentatomidae (infraorder Pentatomorpha), with eight subfamilies (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae and Serbaninae) and 4,112 species is among them (Schaefer and Panizzi, 2000). They include the “stink bugs” thus called due to their unpleasant smell produced by a gland that opens up in the metapleural region.

The presence of testes formed by a number of compartments referred to as “lobes” is a characteristic of the

Pentatomidae. In some species, one of these lobes is of the *harlequin* type, which is differentiated from the other lobes by presenting spermatogonial cells with meiotic pairing, non-specific association of the autosomal bivalents, anomalous arrangement of the chromosomes in the metaphase plate, anomalous chromosome segregation and cell fusion, resulting in the production of spermatozoa with highly variable chromosome number (Rebagliati *et al.*, 2005). There are reports of this type of lobe in 15 genera from three Pentatomidae subfamilies (Discocephalinae, Edessinae and Pentatominae) (Rebagliati *et al.*, 2005).

In males of Pentatomidae the chromosome number varies from six to 27, with 14 as the most frequent number (85%). The sex chromosome system is XX/XY, except in three species: *Macropygium reticulare* ( $X_1X_2Y$ ); *Rhytidolomia senilis* (Neo-XY) and *Thyanta calceata* ( $X_1X_2Y$ ) (Rebagliati *et al.*, 2005). Pentatomidae karyotypes typically lack microchromosomes (Rebagliati *et al.*, 2005; Lanzone and Souza, 2006; Souza *et al.*, 2007a).

Pentatomidae basically share the chromosomal features present in other Heteroptera. These include holo-

Send correspondence to MM Itoyama. Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: mary@ibilce.unesp.br.

kinetic chromosomes, *i.e.*, without a localized centromere, which causes microtubules to bind to the entire chromosome during mitosis leading to a parallel migration of the sister-chromatids to the cell poles at anaphase (Buck, 1968; Comings and Okada, 1972). At meiosis, however, the kinetic activity is restricted to the telomere regions and chromosomes are therefore called telokinetic (Motzko and Ruthmann, 1984). Meiotic behavior is different among autosomal bivalents and sex chromosomes (Ueshima, 1979; Manna, 1984; Papeschi and Mola, 1990; González-García *et al.*, 1996; Suja *et al.*, 2000). Except for a few species, autosomal bivalents are chiasmatic and segregate pre-reductionally (Nokkala and Grozeva, 2000). On the other hand, the sex chromosomes are achiasmatic and behave as univalents at male meiosis, equationally dividing at anaphase I and associating to form a pseudobivalent at meiosis II (nevertheless, the pre-reduction of sex chromosomes is also reported in some Pentatomidae species) (Ueshima, 1979; Grozeva and Nokkala, 2001).

More detailed cytogenetic aspects of Pentatomidae, such as morphological variations of the condensed chromatin and nucleolar material during cell division, have received little attention. Aiming at contributing to the cytogenetic characterization of Pentatomidae of economic interest, we analyzed some aspects of meiosis and spermiogenesis of *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus* and *O. ypsilongriseus*.

## Material and Methods

Fifteen adult males of each of the species *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus* and *Oebalus ypsilongriseus* (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatominae, Pentatomini) were collected from okra trees in São José do Rio Preto (20°47'32" S, 49°21'37" W), São Paulo State, Brazil. The specimens were fixed in methanol:acetic acid (3:1), their testicular lobes were isolated and squashed before staining with lacto-acetic orcein. The pattern of the heteropycnotic chromatin in testicular cells was then analyzed. The nucleolar morphology was analyzed after impregnation with silver nitrate (Howell and Black, 1980). Both kinds of analyses were performed during meiosis and spermiogenesis. Images were obtained under a Zeiss microscope with the AXIO VISION software.

## Results

The three species presented multilobed testes covered by a reddish membrane. While three lobes were present in *Mormidea v-luteum*, four lobes were observed in the two *Oebalus* species. None of these species showed lobes with morphological characteristics of the *harlequin* type. In all of them, the mechanism of sex determination in males was XY and the karyotype was  $2n = 14 (12A + XY)$ .

## Morphological variation of the heteropycnotic chromatin

The term heterochromatin includes some characteristics which were not analyzed in this study and we thus use 'heteropycnotic' or 'condensed chromatin' to refer to the regions that are more intensely stained by lacto-acetic orcein.

In the three analyzed species, the polyploid nuclei of the nutritive cells were large, with a larger heteropycnotic region and several much smaller ones (Figure 1A). The whole process of spermatogenesis occurred in the spermatogonial cysts constituted by nine spermatocytes, each with several heteropycnotic regions (Figure 1B). In the three species, the cells at the initial prophase I (leptotene, zygotene and pachytene) exhibited a strongly stained heteropycnotic region, which was closer to the nucleus periphery and possibly composed of the X and Y chromosomes (Figure 1C-E). During diplotene and diakinesis, chiasmata were observed in the autosomal bivalents, but not in the sex chromosomes (Figure 1F-G). The X chromosome was larger than the Y (Figure 1H) and the sex chromosomes were seen together or separated at metaphase I (Figure 1H,I). In a polar view during metaphase I and II, the autosomes were arranged in a ring surrounding the sex chromosomes (Figure 1I). Late migration of the chromosomes was observed at anaphase and telophase I and II (Figure 1J-L).

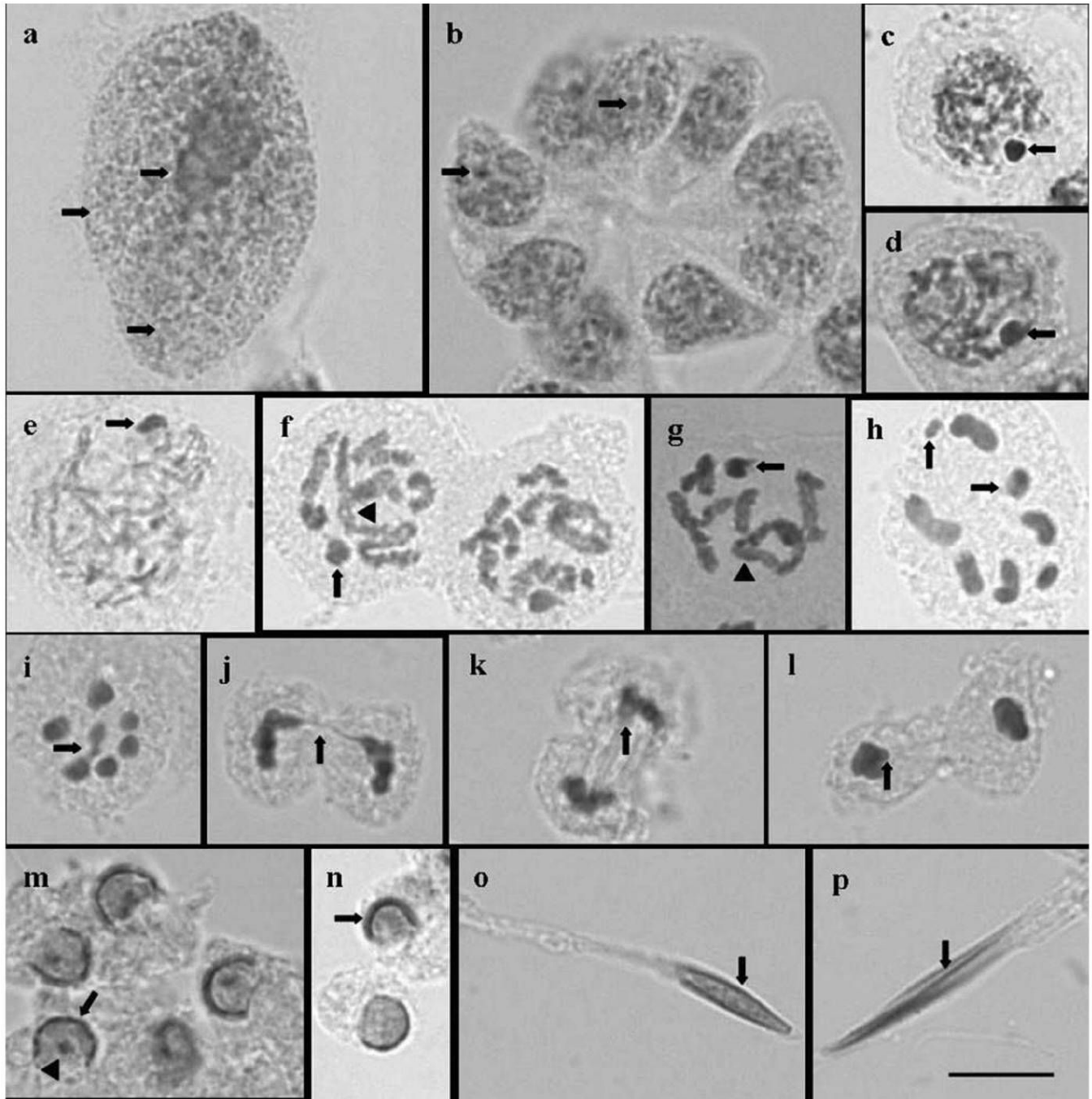
Observations on the spermiogenesis of the three species showed that, in the initial round-shaped spermatids, the heteropycnotic chromatin is C-shaped and located in the internal part of the nuclear envelope, covering over half of it. A heteropycnotic corpuscle was also observed inside the spermatid nucleus of *M. v-luteum*, but not in the *Oebalus* species (Figure 1M, N). During spermatid elongation, the condensed chromatin remained close to the nuclear envelope in *M. v-luteum* (Figure 1O), while it became more central in *O. poecilus* and *O. ypsilongriseus*, resembling a longitudinal line (Figure 1P).

## Morphological variation of the nucleolar material

A large irregular nucleolar mass, apparently formed by the association of smaller bodies, and some smaller corpuscles, were present in the polyploid nuclei of the nutritive cells of the three species (Figure 2A). A single nucleolar corpuscle was observed at the nucleus periphery of spermatocytes at initial prophase I (leptotene) in the three species (Figure 2B). The nucleolar corpuscle at zygotene in *Oebalus* increased in size and acquired an unusual mushroom-like form, with a larger, intensely stained part (the "hat") and a smaller fainter portion (the "stem") (Figure 2C). This morphological type of nucleolar material persisted during pachytene, when another round, smaller and intensely stained nucleolar body also appeared (Figure 2D). An apparent disintegration of the nucleolar material started between pachytene and diplotene, when round corpuscles

of different sizes were seen (Figure 2E). *Mormidea v-luteum* differed from the other two species by the absence of this mushroom-like nucleolar structure. Instead, we only

observed a nucleolar corpuscle and fibrillar structures associated with the chromosomes that later became dispersed in a granular form in this species (Figure 2F, G). In the three

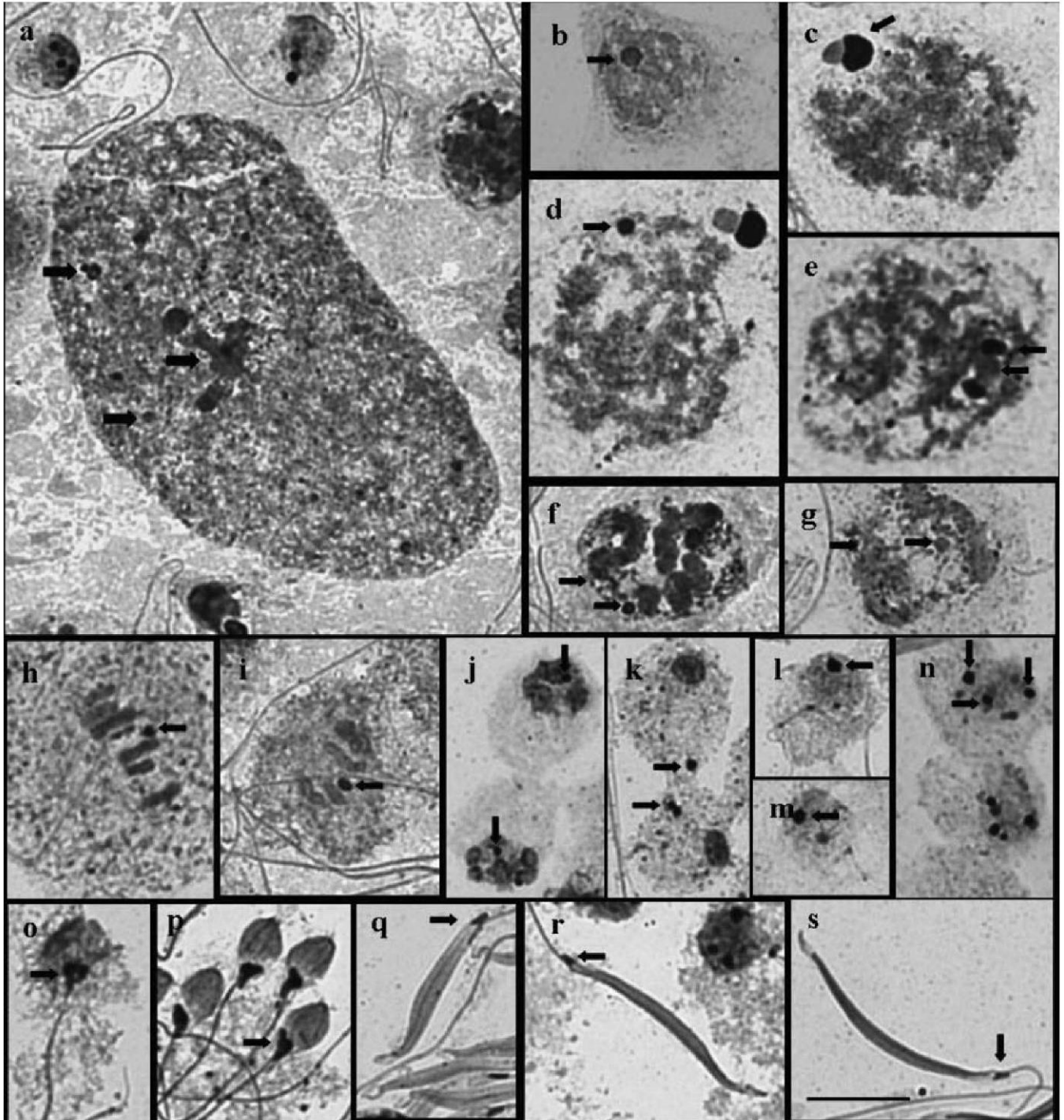


**Figure 1** - Seminiferous tubule cells of *Mormidea v-luteum* (D, K, M and O), *Oebalus poecilus* (A, F, G, H, I, J, L, N and P) and *Oebalus ypsilon-griseus* (B, C and E) adult males stained with lacto-acetic orcein. **A**) Polyploid nuclei of nutritive cells containing one large and many small heteropycnotic corpuscles (arrows); **B**) Spermatogonial cyst constituted by nine spermatocytes, each one containing a heteropycnotic body (arrows); **C-G**) The single heteropycnotic corpuscle (arrow) persists during the entire prophase I (in the sequence: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene and diakinesis); note the presence of chiasmata in F and G (arrowheads); **H**) Metaphase I showing  $2n = 12A + XY$ , the X (large) and Y (small) chromosomes are indicated by arrows; **I**) Polar view of metaphase I, the autosomal bivalents forming a ring around the sex chromosomes (arrow); **J-L**) Anaphases and telophase I; note the late migration of the chromosomes (arrows); **M**) In round spermatids of *Mormidea v-luteum*, the heteropycnotic chromatin is present in the center of the nucleus forming a single corpuscle (arrowhead) and around the interior of the nucleus envelope arranged in a C-shaped structure (arrow); **N**) In the round spermatid of *Oebalus* species the heteropycnotic chromatin is exclusively present in the interior of the nucleus (arrow); **O**) Elongated spermatid of *Mormidea* showing the heteropycnotic chromatin maintained at the nucleus periphery (arrow); **P**) Elongated spermatid of *Oebalus* showing the heteropycnotic chromatin as a longitudinal line in the interior of the head (arrow). Bar = 10  $\mu$ m.



species, the nucleolar material could be observed as a round corpuscle until the end of telophase I (Figure 2H-K) and the still round spermatids exhibited a variable number of small nucleoli, some of which were more intensely stained (Fig-

ure 2L-N). When the spermatids started to elongate, the silver nitrate-stained material concentrated at the posterior region of the head, where it was seen until the formation of the spermatozoa (Figure 2O-S).



**Figure 2** - Seminiferous tubule cells of *Mormidea v-luteum* (A, B, F, G, I and N), *Oeбалus poecilus* (L, M, P and R) and *Oeбалus ypsilon-griseus* (C, D, E, H, J, K, O, Q and S) adult males, impregnated by silver nitrate. **A)** Polyploid nuclei of nutritive cells containing a large mass of nucleolar material and several small corpuscles (arrows); **B)** One large nucleolar corpuscle is present in the cell nuclei at leptotene (arrow); **C, D)** In both *Oeбалus* species two associated nucleolar bodies are present at zygotene, one more impregnated than the other and showing a mushroom-like shape (C, arrow); note a small additional corpuscle in D (arrow); **E-G)** Beginning of the disorganization process of the nucleolar material at pachytene/diplotene (arrows); **H, I)** metaphases I in lateral view with the nucleolar material still present (arrows); **J, K)** nucleolar material also present at telophase (arrows); **L-N)** Round spermatids with a variable number of nucleolar bodies (arrows); **O-S)** Spermatids with different degrees of elongation; the nucleolar material is located in the posterior region of the head (arrows). Bar = 10  $\mu$ m.

## Discussion

We studied the morphological changes of the heteropycnotic chromatin and of the nucleolar material during meiosis and spermiogenesis of *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus* and *O. ypsilon-griseus*. Changes in the amount and distribution of decondensed and condensed chromatin may reflect genetically active and inactive chromosome regions, respectively, while morphological alterations of the nucleolus (including number and structure) reflect the pattern of ribosome production, a central process in the protein synthesis.

We observed similarities and differences among the species studied. The three species had multilobed testes with three lobes in *M. v-luteum* and four in *O. poecilus* and *O. ypsilon-griseus*. Multilobed testes are a characteristic of the Pentatomidae, but the number of lobes observed in the species analyzed herein was smaller than that typically found in the family, which is seven. In addition, the three species differed from the other 27 species of the same family and subfamily (Pentatominae) already studied by the absence of a *harlequin* lobe (Rebagliati *et al.*, 2005; Lanzone and Souza, 2006; Souza *et al.*, 2007a). The Pentatomidae *Antiteuchus tripterus* also showed less lobes (six) than the typical seven, but one of them was *harlequin* (Souza *et al.*, 2007a).

Rebagliati *et al.* (2005) considered the development of *harlequin* lobes as dependent on the environment in which the insects live. However, the *harlequin* lobe was observed in samples of *Antiteuchus tripterus* collected in apparently different environments in several states in Brazil (São Paulo, Souza *et al.*, 2007a; Pernambuco, Alagoas and Bahia, Lanzone and Souza, 2006). These observations suggest that the presence of that lobe is a genetic characteristic of the species rather than an environmental effect.

Another feature shared by the three species was the  $2n = 14$  karyotype, with XY males, suggesting a XX/XY sex chromosome system, found in most previously analyzed Pentatomidae.

The distribution of the heteropycnotic chromatin during meiosis and spermiogenesis was common to the three species, except in the round spermatids, in which *M. v-luteum* exhibited an additional corpuscle inside the head, not observed in the other species. The distribution of the heteropycnotic chromatin in elongated spermatids in *M. v-luteum* also differed from that of the other species, being close to the membrane in the interior of the head, while it formed a filament in the central region in *Oebalus*.

As to the nucleolar activity, in some insects (including some Heteroptera) the silver nitrate specifically stains the previously active nucleolar organizing regions (NORs), which are chromosome sites of rDNA. In some Heteroptera, a single NOR was observed, which could be interstitial or terminal and located at autosomes or sex chromosomes (Camacho *et al.*, 1985; Fossey and Liebenberg, 1995; Gon-

zález-García *et al.*, 1996; Papeschi *et al.*, 2003; Rebagliati *et al.*, 2003).

In the three Pentatomidae species studied herein no NORs could be evidenced, even after some technical variations were tried. Nevertheless, after silver staining, the morphological changes of the nucleolar material could be analyzed. The three species apparently did not differ as to the pattern observed in the nutritive cells. The nucleolar material remained visible in the three species during the entire meiosis and spermiogenesis, a phenomenon called nucleolar semi-persistence (Pickett-Heaps, 1970).

Nucleolar semi-persistence differs from the more general process in which the disorganization of the nucleolus occurs during prophase, so that from diakinesis until the end of the meiotic division, this organoid is not visible, suggesting that, at that time, it is already completely disorganized (Risueño and Medina, 1976). Among Heteroptera, exceptions to this general behavior were described for other species, such as *Nysius californicus* (Lygaeidae, Souza *et al.*, 2007b) and *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae, Souza *et al.*, 2007a). In both cases, silver-stained material was observed around the chromosomes until the meiotic metaphase I.

Differences in the nucleolar material among the three species were detected at zygotene and pachytene, with the *Oebalus* species showing a "mushroom-like" structure. In the same meiotic stages, *M. v-luteum* presented a single nucleolar corpuscle with size and staining similar to the fainter part of the "mushroom-like" structure of *Oebalus*.

The nucleolar semi-persistence is another structural characteristic of the meiosis which, similarly to the presence of the *harlequin* lobe, has been attributed to environmental effects. According to Cattani and Papeschi (2004), the nucleolar semi-persistence was detected in individuals of the Heteroptera *Spartocera fusca* that spent more time in the field, being thus longer exposed to environmental factors such as fluctuations of temperature, humidity and precipitation. We do not have such information on the species that we studied, but they were collected in the same place at the same time.

In the present study, the differences observed were between species belonging to different genera. They may thus be part of the genetic features that evolved during the divergence of the two genera, reflecting physiological differences that remain to be understood.

## Acknowledgments

Thanks are due to Dr. Sonia Maria Oliani (Department of Biology - IBILCE/UNESP) for the opportunity of capturing cell images and to FAPESP, FUNDUNESP and CNPq for financial support.

## References

- Buck RC (1968) Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: The fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. *J Ultrastruct Res* 18:489-501.
- Camacho JPM, Belda J and Cabrero J (1985) Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed C-banding and silver impregnation. *Can J Genet Cytol* 27:491-497.
- Cattani MV and Papeschi AG (2004) Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera). *Hereditas* 140:105-111.
- Comings DE and Okada TA (1972) Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* 37:177-192.
- Fossey A and Liebenberg H (1995) Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carlisia wahlbergi* Stal (Coreidae, Heteroptera). *Cytobios* 81:7-15.
- González-García JM, Antonio C, Suja JA and Rufas JS (1996) Meiosis in holocentric chromosomes: Kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Res* 4:124-132.
- Grozeva S and Nokkala S (2001) Chromosome numbers, sex determining systems, and patterns of the C-heterochromatin distribution in 13 species of Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). *Folia Biol* 49:29-41.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Lanzone C and Souza MJ (2006) Chromosome complement and meiosis in the three species of the Neotropical bug genus *Antiteuchus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). *Genet Mol Biol* 29:49-55.
- Manna GK (1984) Chromosomes in evolution in Heteroptera. In: Sharma AK (ed) *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. CRC Press, Boca Raton, pp 189-225.
- Motzko D and Ruthmann A (1984) Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. *Eur J Cell Biol* 33:205-216.
- Nokkala S and Grozeva S (2000) Achiasmatic male meiosis in *Myrmedobia coleoptratal* (Fn.) (Heteroptera, Microphyllidae). *Caryologia* 53:5-8.
- Papeschi AG and Mola LM (1990) Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Coreidae, Heteroptera). I. Behavior of univalents in desynaptic individuals. *Genetica* 80:31-38.
- Papeschi AG, Mola LM, Bressa MJ, Greizerstein EJ, Lía V and Poggio L (2003) Behaviour of ring bivalents in holocentric systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). *Chromosome Res* 11:725-733.
- Pickett-Heaps JD (1970) The behavior of the nucleolus during mitosis in plants. *Cytobios* 6:69-78.
- Rebagliati P, Papeschi AG and Mola LM (2003) Meiosis and fluorescent banding in *Edessa mediatubunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). *Eur J Entomol* 100:11-18.
- Rebagliati PJ, Mola LM, Papeschi AG and Grazia J (2005) Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. *J Zool Syst Evol Res* 43:199-213.
- Risueño MC and Medina FJ (1976) The nucleolar structure in plant cells. *Rev Biol Cel* 7:1-162.
- Schaefer WC and Panizzi AR (2000) *Heteroptera of economic importance*. Boca Raton, CRC Press, 824 pp.
- Souza HV, Bicudo HEMC and Itoyama MM (2007b) Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera, Lygaeidae). *Genet Mol Res* 6:33-40.
- Souza HV, Bicudo HEMC, Costa LAA and Itoyama MM (2007a) A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). *Eur J Entomol* 104:353-362.
- Suja JA, Del Cerro AL, Page J, Rufas JS and Santos JL (2000) Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma* 109:35-43.
- Ueshima N (1979) *Animal Cytogenetics*. v. 3. Insecta 6. Hemiptera, Heteroptera. Gebr. Borntraeger, Berlin, 119 pp.

Associate Editor: Yatiyo Yonenaga-Yassuda

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Aspectos evolutivos da espermatogênese de *Euschistus heros*, *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* (Heteroptera: Pentatomidae) na formação do lobo *harlequin***

Hederson Vinicius de Souza, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Luiz Antônio Alves Costa\*, Mary Massumi Itoyama.

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, \*Museu Nacional, Departamento de Entomologia, Rio de Janeiro, Brasil.

**Resumo:** A presença de testículos formados por compartimentos denominados de lobos é uma característica da família Pentatomidae. Em algumas espécies um dos lobos é o *harlequin*, o qual se diferencia dos demais por ser maior e por apresentar células espermatogoniais com diferenças na divisão celular, resultando na produção de espermatozóides com função não fecundante. Com objetivo de avaliar a presença do lobo *harlequin* nas espécies *Euschistus heros*, *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* os lobos testiculares foram analisados individualmente. *Euschistus heros* apresentou testículos envoltos por membrana avermelhada constituído por 6 lobos testiculares sendo o 5 mais delgado. Os lobos 4 e 6 apresentaram células de tamanho aumentado e com mais regiões impregnadas pelos íons prata, padrão semelhante aos encontrados em Pentatomidae com lobo *harlequin*. *Platycarenum umbractulatus*, exibiu 7 lobos testiculares e apesar de não apresentar lobo *harlequin*, mostrou características diferenciadas nas espermátides do lobo 5, sugerindo pré-adaptação para formação de espermatozóides diferenciados neste lobo. Também foi observada associação do nucléolo com os cromossomos sexuais. *Thyanta perditor* apresentou 3 lobos testiculares e não apresentou diferenças entre os lobos. Desse modo, a análise, dessas espécies, forneceu dados importantes para auxiliar na elucidação do cenário evolutivo concernente a formação do lobo *harlequin*.

## INTRODUÇÃO

Os testículos dos Heteroptera são divididos, por um tecido conectivo, em algumas subunidades denominadas de “lobos”. O número mais comum de lobos é sete, embora haja variações entre tribos e espécies. A meiose, na maioria dos Heteroptera, segue o mesmo padrão em todos os lobos, contudo meiose atípica pode ocorrer em algumas espécies da família Pentatomidae em um dos lobos testiculares, denominado de lobo *harlequin* (NICKLAS, 1961; REBAGLIATI et al., 2005).

Segundo Rebagliati et al. (2005), as características que são alteradas no lobo *harlequin* é a associação não-específica dos autossomos, disposição anômala dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e fissão celular, trazendo como consequência a produção de espermatozóides com um número cromossômico altamente variável, o qual pode afetar a fertilidade do indivíduo. Este lobo, geralmente, corresponde ao maior de todos e como consequência, às vezes, produzem testículos torcidos ou enrolados (NICKLAS, 1961; REBAGLIATI et al., 2005).

Até o momento um total de 23 espécies pertencentes a 15 gêneros da família Pentatomidae foi relatado possuir o lobo *harlequin* (REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2007). Souza et al. (2007) observaram em *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae) a presença de 6 lobos testiculares, sendo o sexto interno ao quinto (*harlequin*), o qual possui células e espermatozóides diferenciados e com possível função de nutrição dos espermatozóides do lobo *harlequin*.

Os Heteroptera, além de possuírem algumas espécies contendo o lobo *harlequin*, possuem cromossomos holocêntricos (sem centrômero localizado), não possuem estrutura cinetocórica (BUCK, 1967; COMINGS, OKADA, 1972; MOTZKO, RUTHMAN, 1984; RUFAS, GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996), atividade cinética é restrita aos finais dos cromossomos, ou seja, nas regiões teloméricas (cromossomos são denominados telocinéticos, GONZALEZ-GARCIA et al., 1996; HUGHES-SCHRADER, SCHRADER, 1961;

MOTZKO, RUTHMANN, 1984; SCHRADER, 1935, 1940), terminalização dos quiasmas é presumido ocorrer (JOHN; KING, 1985), embora haja trabalhos que discutam este assunto (JONES, 1987; SOLARI; AGOPIAN, 1987) e a primeira divisão meiótica é reducional para os autossomos e equacional para os sexuais.

Relatos citogenéticos de espécies da família Pentatomidae mostraram que o número diplóide de cromossomos, em machos, varia de 6 a 27, sendo o mais frequente o de 14 (85%) (REBAGLIATI et al., 2005) e sistema cromossômico do sexo XX/XY (fêmea/macho), exceto em 3 espécies (*Macropygium reticulare*, X1X2Y; *Rhytidolomia senilis*, neo-XY; *Thyanta calceata*, X1X2Y) e não apresentam m-cromossomos (REBAGLIATI et al., 2001, 2005).

Uma estrutura que vem sendo bastante estudada nas espécies de Pentatomidae é o nucléolo. O tamanho dessa estrutura está relacionado com a atividade biosintética da célula; portanto, o tamanho e o número de nucléolos e corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e podem refletir, então, em diferenças metabólicas e funcionais (SOUZA et al., 2008a; TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997).

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar em *Euschistus heros*, *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* a espermatogênese e o comportamento das células testiculares após a impregnação por íons prata, em cada lobo separadamente e comparar os dados obtidos com aqueles de espécies relacionadas já descritas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Quinze machos adultos de *E. heros* (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatominae, Carpocorini), *P. umbractulatus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae, Discocephalini) e *T. perditor* (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatominae, Pentatomini) foram coletados, respectivamente, em pés de pata-de-vaca (*Bauhinia punctata*), plantas de soja (*Glycine max*) e em pés de quiabo (*Hibiscus esculentus*), na cidade de São José do Rio Preto (20°47'32" S,

49°21'37" W), SP, Brasil. Os insetos fixados em metanol:ácido acético (3:1), tiveram os seus lobos testiculares separados e submetidos à técnica de esmagamento (coloração com orceína lacto-acética). Para estudo do comportamento nucleolar durante a espermatogênese, as lâminas foram submetidas à técnica de impregnação pelos íons prata. Para a espécie *E. heros* foram realizadas medidas do diâmetro em 100 células no estágio difuso e em 100 espermátides, de cada lobo, utilizando o programa UTHSCSA Image Tool v.3.00 e o programa Minitab versão 15.1 para o teste estatístico ANOVA (Tukey's comparison com 95% de intervalo de confiança) para comparar as medidas das células entre os lobos testiculares. As melhores células foram capturadas no microscópio Zeiss, utilizando o programa de análise de imagens AXIO VISION.

## RESULTADOS

Os testículos de *E. heros* são formados de 6 lobos alongados e envoltos por membrana, sendo o quinto mais delgado. Essa membrana na região proximal do ducto ejaculatório é avermelhada e na distal é transparente (Figura 1a,b). *Platycareus umbractulatus* apresenta testículos envoltos por membrana avermelhada e formados por sete lobos testiculares alongados, todos apresentando tamanhos semelhantes entre si (Figura 1c,d). *Thyanta perditor* possui testículos envoltos por membrana amarelada na região próxima ao ducto ejaculatório (região proximal) e transparente na região distal, sendo constituídos por 3 lobos testiculares alongados, sendo o lobo 2 mais espesso (Figura 2).

### Análise da espermatogênese

#### *Euschistus heros*

Durante a espermatogênese, o comportamento das células de *E. heros*, foi semelhante nos lobos 1, 2, 3 e 5 e entre o 4 e 6. Observou-se que nos lobos 1, 2, 3 e 5 as células em prófase I apresentam um corpúsculo heteropicnótico arredondado e bem definido localizado na periferia do núcleo



(Figura 3a-c) que provavelmente são os cromossomos sexuais, XY, sendo o maior o X. Visualiza-se, ainda, a presença de quiasmas nos autossomos (Figura 3c). Na metáfase I os cromossomos podem ser visualizados na forma radial (visão polar) ou linear (visão lateral), sendo constituídos de  $2n=14$  ( $12A + XY$ ) cromossomos (Figura 3d,e). Durante a anáfase e telófase observa-se comportamento regular de segregação dos cromossomos (Figura 3f,g). No início da espermiogênese, as espermátides são arredondadas e possuem material heteropicnótico, também, arredondados no centro e, em forma de meia lua, próximo ao envoltório nuclear (Figura 3h). Durante o alongamento observa-se somente a região heteropicnótica próxima ao envoltório (Figura 3i,j). No final do processo a cromatina distribui-se uniformemente na região anterior da cabeça, visualizando-se no final da região posterior, uma pequena quantidade de material heteropicnótico (Figura 3k).

O comportamento meiótico das células durante a espermatogênese dos lobos 4 e 6 foi semelhante, portanto, estão sendo apresentados em conjunto. As prófases I (Figura 4a,b) apresentam um único corpúsculo heteropicnótico, semelhante à dos lobos 1, 2, 3 e 5, mas as células são maiores do que as mencionadas anteriormente. Todas as demais fases da meiose apresentam o mesmo comportamento dos outros lobos, com a única diferença de que são maiores (Figura 4c,d). Durante a espermiogênese a única diferença observada, em relação aos demais lobos, é o tamanho aumentado das espermátides na fase final do processo (Figura 4e-i).

Com relação ao tamanho das células, o teste ANOVA, evidenciou que as células no estágio de prófase dos lobos 1, 2 e 3 são iguais ( $p<0,0001$ ), mas um pouco menores que as do lobo 5. As células dos lobos 4 e 6 são iguais ( $p<0,0001$ ), entretanto são duas vezes maiores que as dos lobos 1, 2, 3 e 5. As medidas das espermátides arredondadas demonstraram que elas seguem o mesmo padrão das células em prófase, mas não havendo diferenças entre os lobos 1, 2, 3, e 5 ( $p<0,0001$ ) (Tabela 1).

*Platycarenum umbractulatus*

A análise da espermatogênese foi realizada individualmente nos sete lobos. Pelo fato deles apresentarem características semelhantes, os dados foram agrupados. A prófase I apresentou um corpúsculo heteropicnótico evidente e arredondado localizado na periferia do núcleo (Figura 5a). Na metáfase I, visão polar, os cromossomos sexuais ficam no centro do anel formado pelos autossomos e verifica-se a presença de 14 cromossomos ( $2n= 12A + XY$ ) (Figura 5b). A anáfase e a telófase são regulares, isto é, sem migração tardia de cromossomos (Figura 5c-e). No início do processo de espermiogênese os espermatócitos apresentam uma vesícula grande ao lado do núcleo (Figura 5f) e são constituídos de várias regiões heteropicnóticas e que, posteriormente, adquire a forma de C (Figura 5g,h). Durante o alongamento esse material heteropicnótico é encontrado somente em um dos lados do núcleo (Figura 5i-l).

Apesar do processo de espermatogênese ter sido semelhante entre os sete lobos, algumas diferenças foram observadas. Nos lobos 4 e 6 os cromossomos foram encontrados agrupados 2 a 2 em algumas células da metáfase I (Figura 6a,b). No lobo 5 as espermátides arredondadas e em início de alongamento apresentaram diferentes padrões de concentração de material heteropicnótico (Figura 6c-h), no lobo 6 o material heteropicnótico foi encontrado no centro da espermátide (Figura 6i) e no lobo 4 e 6 observou-se a presença de vesículas nas espermátides em alongamento (Figura 6j,k).

*Thyanta perditor*

O comportamento das células durante toda a espermatogênese de *Thyanta perditor* foi semelhante entre os três lobos testiculares. Entre as células testiculares após coloração com orceína lacto-acética, existem células com dos núcleos poliplóides que apresentam uma massa heteropicnótica arredondada e evidente deslocada para a periferia do núcleo (Figura 7a,b). As células em prófase I apresentam uma ou duas regiões heteropicnóticas bastante evidentes, que persistem até o final desta fase (Figura 7c-h). No diplóteno observa-se a

associação cromatínica entre os cromossomos homólogos através da região telomérica. Durante a metáfase I verifica-se que o complemento cromossômico é de  $2n=14$  cromossomos (12A + XY), na qual os cromossomos sexuais situam-se ao centro de um anel formado pelos autossomos (7j – visão polar). Na Figura 7i observa-se uma metáfase I em visão lateral. Na Figura 7k-n observa-se anáfases com migração tardia de um dos cromossomos, provavelmente o cromossomo X (Figura 7n). Durante a espermiogênese, os espermatócitos apresentam vários corpúsculos heteropicnóticos (Figura 7o), os quais se juntam para, nas espermatídes arredondadas, formar um corpúsculo heteropicnótico no centro (Figura 7p). No início do alongamento das espermatídes, o material heteropicnótico está na periferia do núcleo em forma de C e no centro (Figura 7q,r), sendo arredondado e, posteriormente, torna-se alongado permanecendo apenas na periferia do núcleo (Figura 7s-x).

### **Impregnação pelos íons prata durante a espermatogênese**

#### *Euschistus heros*

O comportamento celular após impregnação por íons prata durante a espermatogênese foi semelhante entre os lobos testiculares 1, 2, 3 e 5 e entre os 4 e 6, semelhantemente aos resultados encontrados com relação ao comportamento das células coradas com orceína lacto-acética durante a espermatogênese.

O comportamento após a impregnação durante a espermatogênese dos lobos 1 a 3 e 5 evidenciou a presença de dois corpúsculos impregnados pelos íons prata de tamanhos diferentes no início da prófase I (Figura 8a), que se desorganiza (Figura 8b,c), ficando o material dispersos ao longo dos cromossomos (Figura 8d) e no interior das células até o final da telófase nos lobos 1 a 3 (Figura 8j). No lobo 5 o material desorganiza-se por completo não sendo mais observado no final da prófase I e metáfase I (Figura 8e-i). As espermatídes apresentam em torno de 4 corpúsculos impregnados de morfologia variável (Figura 8k-m). Durante o processo de alongamento as espermatídes dos

lobos 1 a 3 apresentam três marcações, uma na região mediana da cabeça e as outras duas na região posterior próxima ao início da cauda (Figura 8n-p). As espermátides médias do lobo 5 apresentam duas marcações, uma na região mediana da cabeça e a outra na região posterior (Figura 8q). Em um estágio mais avançado observa-se marcação apenas na região posterior da cabeça (Figura 8r,s). Pode-se observar espermátides alongadas com forte impregnação ao longo de seu comprimento nos lobos 1 a 3 (Figura 8t) e no lobo 5, também, com forte marcação, mas com vários grânulos ao longo do comprimento (Figura 8u).

Os lobos 4 e 6 apresentaram dois corpúsculos impregnados pelos íons prata de tamanhos diferentes e vários menores no início da prófase I (Figura 9a), que se desorganizam (Figura 9b) e são observados distribuídos por todo citoplasma até o final da telófase (Figura 9c-e). As espermátides arredondadas apresentaram em torno de seis corpúsculos de morfologia variável (Figura 9f,g). Foram visualizados espermátides com várias marcações pequenas e um filamento ao longo de toda a cabeça e uma marcação pequena e alongada na região posterior da cabeça (Figura 9h). Foram observadas, ainda, espermátides com um filamento bastante impregnado atravessando toda a cabeça (Figura 9i) ou material impregnado por quase toda a cabeça (Figura 9j) ou em torno de 50% ao longo da cabeça (Figura 9k) ou apresentando um filamento e vários corpúsculos arredondados ao longo da cabeça (Figura 9l).

#### *Platycarenum umbractulatus*

Pelo fato do comportamento após impregnação pelos íons prata, durante a espermatogênese, ter sido semelhante nos sete lobos, os dados, também foram agrupados. Durante a prófase I observou-se de dois a quatro corpúsculos impregnados pelos íons prata sendo sempre um mais impregnado (Figura 10a-c). Esses corpúsculos desorganizam-se durante o diplóteno/diacinese (Figura 10d), observando resíduo de material impregnado nos cromossomos e no citoplasma. Na metáfase I há regiões cromossômicas marcadas, corpúsculos menores e material impregnado no citoplasma (Figura 10e). Na anáfase há marcações nos dois grupos de cromossomos (Figura 10f). Na telófase observa-se reorganização

do material impregnado pelos íons prata nas duas células em formação ou em uma única (Figura 10g,h). As espermátides arredondadas apresentam de uma a várias marcações (Figura 10i-k) e que durante o alongamento é encontrada na região posterior da cabeça (Figura 10l-o).

Apesar de quase todas as fases da espermatogênese terem sido semelhantes nos diferentes lobos após impregnação pela prata, algumas diferenças foram encontradas nos lobos 4, 5 e 6 durante a espermiogênese. As espermátides arredondadas do lobo 5 apresentam uma única marcação arredondada em uma das extremidades da cabeça, ou em torno de cinco marcações distribuídas pela espermátide ou localizadas em uma única região (Figura 11a-c). Outras espermátides em início de alongamento não apresentaram marcações (Figura 11d), ou apresentaram várias marcações de diferentes tamanhos distribuídas ao longo da cabeça (Figura 11e-g), ou uma única marcação em apenas um lado da cabeça, ou nos dois lados da cabeça ou distribuída por toda extensão da cabeça (Figura 11h-k).

As espermátides em início de alongamento do lobo 6 apresentaram um filamento impregnado ao longo da extensão da cabeça e várias impregnações distribuídas uniformemente ao longo da cabeça (Figura 11l). As espermátides alongadas dos lobos 4 e 6 apresentaram as cabeças com impregnação uniforme ou várias impregnações de tamanho pequeno ou grande (Figura 11m-o).

### *Thyanta perditor*

O comportamento da impregnação pelos íons prata em *Thyanta perditor* foi semelhante entre os três lobos testiculares. Os núcleos das células poliplóides apresentam uma ou duas massas amórficas impregnadas pelos íons prata e outras bem menores (Figura 12a,b). Nas células em prófase I visualiza-se um ou dois corpúsculos (Figura 12c-g), os quais se desorganizam completamente até o final da prófase I, na qual se verifica uma marcação telomérica em um dos autossomos (Figura 12g). Na metáfase I os cromossomos apresentam intensidade de marcações diferentes (Figura 12h,i). Essas marcações nos cromossomos são

observadas da anáfase até a telófase (Figura 13j-m). Os espermatócitos apresentam uma ou duas marcações (Figura 12n) que se fragmentam. As espermátides arredondadas apresentam várias marcações (Figura 12o,p), as quais migram para região anterior e posterior da espermátide durante o alongamento (Figura 12q-t). Em uma fase mais adiantada de alongamento (Figura 13u) a espermátide fica marcada continuamente.

## DISCUSSÃO

Os testículos dos Heteroptera são formados por números variáveis de lobos e recobertos por membrana de diferentes colorações. *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae, Discocephalinae, Discocephalini) possui testículo recoberto por membrana avermelhada e constituído de seis lobos testiculares alongados, sendo o sexto interno ao quinto (SOUZA et al., 2007). *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus* (Pentatomidae, Pentatominae, Carpocorini), analisados por Souza et al. (2008b) possuem, também, membrana avermelhada recobrindo o testículo, mas o número de lobos encontrado foi de três, quatro e quatro respectivamente. As espécies analisadas no presente trabalho apresentaram três, seis e sete lobos alongados, respectivamente para *Thyanta perditor* (Pentatomidae, Pentatominae, Pentatomini), *Euschistus heros* (Pentatomidae, Pentatominae, Carpocorini) e *Platycarenum umbractulatus* (Pentatomidae, Discocephalinae, Discocephalini) e os testículos são recobertos por membrana amarelada ou avermelhada. Portanto, a partir dos resultados descritos na literatura não há condição de se chegar à conclusão se há relação entre o número de lobos e, por exemplo, a tribo a qual elas pertencem, assim como, com relação a cor da membrana que envolve os testículos.

Na tabela 2 está contido o levantamento bibliográfico referente as espécies cujos autores forneceram as seguintes informações: número de lobos, meiose atípica e polimegalia. Foram descritas 51 espécies pertencentes as subfamílias Asopinae, Acanthosomatinae, Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae com essas informações. As espécies das subfamílias Asopinae e

Acanthosomatinae apresentaram seis ou sete lobos e meiose normal, as espécies das demais subfamílias apresentaram de três a oito lobos testiculares e algumas espécies com meiose atípica. Verifica-se, portanto, através dessa tabela, uma distribuição homogênea dos números dos lobos testiculares entre as espécies de uma mesma subfamília e aparentemente não há correlação entre o número de lobos com as subfamílias, necessitando, portanto de uma análise mais detalhada com relação a este aspecto.

Algumas espécies da família Pentatomidae além de apresentarem números variáveis de lobos testiculares podem ou não apresentar um lobo diferenciado denominado de lobo *harlequin*. Dos quinze gêneros estudados com a presença do lobo *harlequin* em Pentatomidae, 11 pertencem a subfamília Discocephalinae, somente *Platycaremus notulatus* (Pentatomidae, Discocephalinae, Discocephalini) não o possui. Por outro lado, somente três espécies do gênero *Loxa* (Amyot e Serville, 1843), uma do gênero *Mayrinia* (Horvath, 1925) e uma do gênero *Adevoplitus* (Grazia e Becker, 1997) (*Pseudevoplitus* Ruckes, 1958) dentro de Pentatomini, uma das mais amplas tribos dentro de Pentatominae estudada, e *Brachystethus rubromaculatus* (Dallas, 1851) dentro de Edessinae apresentam meiose atípica (REBAGLIATI et al., 2005).

Segundo Schuh e Slater (1995) a família Pentatomidae é subdividida oito subfamílias: Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae, portanto somente três subfamílias (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) possuem o lobo *harlequin*.

Segundo Schrader e Schrader (1946a,b) e Schrader (1945a,b) o lobo *harlequin* não possui ocorrência acidental ou esporádica dentro das espécies possuidoras. Eles são encontrados em todos os testículos e em todos os machos de uma dada espécie e é sempre o mesmo lobo. Em Discocephalinae, por exemplo, geralmente é o lobo 5, contado a partir do ducto ejaculatório, o *harlequin*. Isto pode ser confirmado a partir do levantamento bibliográfico realizado na Tabela 2.

Há relatos, na literatura, de que algumas espécies que não possuem o lobo *harlequin*, possuem polimegalia e que, geralmente, estão

relacionados aos lobos 4 e 6 (SCHRADER, LEUCHTENBERGER, 1950, 1951; SCHRADER, 1960a, b). A espécie *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae) analisada por Souza et al. (2007) também apresenta seis lobos testiculares, sendo o 5 o *harlequin*. Esse é o maior que os demais, enquanto que o lobo 4 é o mais delgado e o lobo 6 é interno ao 5, ambos lobos (4 e 6), nesta espécie, apresentam formação de células polimégalas.

A espécie *Euschistus heros* (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatominae) analisada no presente trabalho, possui seis lobos testiculares e apesar de não possuir o lobo *harlequin* propriamente dito, as células da prófase meiótica dos lobos 4 e 6 são maiores do que as dos demais lobos. Portanto, esses resultados são concordantes com os descritos na literatura com relação a esses lobos nas espécies possuidoras do lobo *harlequin*. *Euschistus heros*, por não apresentar o lobo *harlequin*, propriamente dito, possui características evolutivas intermediárias e seu estudo é importante para auxiliar na compreensão da evolução de espermatozóides não fecundantes em espécies de Heteroptera. Outra conclusão que se pode chegar, até o momento, é que os lobos 1 a 3 de todas as espécies analisadas possuem espermatozóides normais e fecundantes, pois são provenientes de processos de espermatogênese normal.

A outra espécie analisada no presente trabalho, *Platycarenum umbractulatus* possui sete lobos testiculares e, também, não possui o lobo *harlequin*, mas as células espermatogênicas dos lobos 4 e 6 apresentam diferenças na concentração de cromatina e material impregnado pela prata, indicando, mais uma vez, que estes são lobos relacionados com a polimegalia.

A exceção dentro da subfamília Discocephalinae a não apresentar lobo *harlequin* é *Platycarenum notalus* (REBAGLIATI et al., 2005). No presente estudo, a espécie *P. umbractulatus*, também não apresenta lobo *harlequin*, contudo apresenta características diferenciadas na formação das espermátides no lobo 5 com diferentes concentrações de heterocromatina e marcações pelos íons prata sugerindo pré-adaptação para formação de espermatozóides diferenciados neste lobo. Essas diferenças, observadas em *Euschistus heros* e *P. umbractulatus* e inéditas na literatura, podem evidenciar



uma evolução independente para formação de espermatozóides não fecundantes ou serem um passo intermediário na formação do lobo *harlequin*, mas que necessitam de outras avaliações, assim como, da análise de outras espécies da mesma subfamília.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais à Profa. Dra Sonia Maria Oliani do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP pela oportunidade de captura das imagens celulares. À FUNDUNESP e à FAPESP pelo apoio financeiro.

## BIBLIOGRAFIA

BUCK, R.C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and difuse kinetochore. **Journal Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.

BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis IV. The phenomenon of polymegaly in the sperm cells of the family Pentatomidae. **Proceedings of the American Academy of Arts**, v. 57, p. 391-423, 1922a.

BOWEN, R. H. Notes on the occurrence of abnormal mitoses in spermatogenesis. **Biology Bulletin**, v. 43, p. 184-203, 1922b

CAMACHO, J. P. M.; BELDA, J.; CABRERO, J. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed by C-banding and silver impregnation. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 27, p. 490-497, 1985.

COMINGS, D.E.; OKADA, T.A. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. **Chromosoma** (Berl.), v. 37, p. 177-192, 1972.

FOOT, K.; STROBELL, E. C. The chromosomes of *Euschistus variolarius*, *Euschistus servus* and the hybrids of the F1 and F2 generations. **Archiv für zellforschung**, v. 12, p. 485–512, 1914.

GONZALEZ-GARCIA, J.M.; ANTONIO, C., SUJA, J.A., RUFAS, J.S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 4, p. 124-132, 1996.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. Polyteny as a factor in the chromosomal evolution of Pentatomini (Hemiptera). **Chromosoma**, v. 8, p. 135–151, 1956.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The Nezara complex (Pentatomidae Hemiptera) and its taxonomic and cytological status. **Journal of Morphology**, v. 101, p. 1–23, 1957.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The Kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v. 12, p. 327-350, 1961.

JOHN, B.; KING, M. Pseudoterminalization, terminalization and non-chiasmate modes of terminal association. **Chromosoma**, v. 92, p. 89-99, 1985.

JONES, G.H. Chiasmata. In: Monees PB, ed, **Meiosis**. Orlando: Academic Press, p. 213-244, 1987.

LANZONE, C., EBENEZER, B.; SOUZA, M. J. Comportamiento meiotico en tres especies de la familia Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of Basic and Applied Genetics (formerly Mendeliana)**, v. 15 (Suppl. 2), p. 100, 2003.

MANNA, G. K. A study of chromosomes during meiosis in forty-three species of Indian Heteroptera. **Proceedings of the Zoological Society of Bengal**, v. 4, p. 1–116, 1951.

MARTIN, B. A. Temporary elimination of the autosomes from the meiotic spindle in a Halyinid pentatomid. **Journal of Morphology**, v. 92, p. 207–239, 1953.

MONTGOMERY, T. H. Preliminary note of the chromatin reduction in the spermatogenesis of *Pentatoma*. **Zoologischer Anzeiger**, v. 20, p. 457–460, 1897.

MONTGOMERY, T. H. The spermatogenesis in *Pentatoma* up to the formation of the spermatid. **Zoologische Jahrbucher**, v. 12, p. 1–88, 1898.

MONTGOMERY, T. H. A study of chromosomes of the germ cells of Metazoa. **Transactions of the American Philosophical Society**, v. 20, p. 154–236, 1901.

MONTGOMERY, T. H. Chromosome in the spermatogenesis of the Hemiptera. **Transactions of the American Philosophical Society**, v. 21, p. 97–173, 1906.

MOTZKO, D.; RUTHMANN, A. Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 33, p. 205–216, 1984.

NICKLAS, R.B. The Relationship between DNA Content and Alternative Meiotic Patterns in Certain Discocephalinids (Pentatomidae; Heteroptera). **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, n. 2, p. 486–490, 1961.

NUAMAH, K. A. Karyotypes of some Ghanaian shield-bugs and the higher systematics of the Pentatomoidea (Hemiptera Heteroptera). **Insect Science and its Application**, v. 3, p. 9–28, 1982.

PAPESCHI, A. G., MOLA, L. M., BRESSA, M. J., GREIZERSTEIN, E. J., LIA, V.; POGGIO, L. Behaviour of ring bivalents in holokinetic systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). **Chromosome Research (UK)**, v. 11, p. 725–733, 2003.

REBAGLIATI, P. J., MOLA, L. M.; PAPESCHI, A. G. Karyotype and meiotic behaviour of the holokinetic chromosomes of six Argentine species of Pentatomidae (Heteroptera). **Caryologia**, v. 54, p. 339–347, 2001.

REBAGLIATI, P. J., PAPESCHI, A. G.; MOLA, L. M. Meiosis and fluorescent banding in *Edessa meditabunda* and *Edessa rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). **European Journal of Entomology**, v. 100, p. 11–18, 2003.

REBAGLIATI, P.J.; MOLA, M.L. PAPESCHI, A.G.; GRAZIA, J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review, **Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research**, v. 43, n. 3, p. 199-213, 2005.

RUFAS, J. S.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Ultrastructure of the kinetochore in *Graphosoma italicum* (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**, v. 32, p. 142-148, 1986.

SCHRADER, F. Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. **Cytologia** (Toldo), v. 6, p. 422-430, 1935.

SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). **Journal Morphology**, v. 67, p. 123-141, 1940.

SCHRADER, F. Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). **Biological Bulletin**, n. 88, p. 63-70, 1945a.

SCHRADER, F. The cytology of regular heteroploidy in the genus *Loxa* (Pentatomidae ± Hemiptera). **Journal of Morphology**, n. 76, p. 157-177, 1945b.

SCHRADER, F. Autosomal elimination and preferential segregation in the harlequin lobe of certain Discocephalini (Hemiptera). **The Biological Bulletin**, v. 90, p. 265-290, 1946a.

SCHRADER, F. The elimination of chromosomes in the meiotic divisions of *Brachystethus rubromaculatus* Dallas. **The Biological Bulletin**, v. 90, p 19-31, 1946b.

SCHRADER, F. Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). **Chromosoma**, n. 11, p. 103-128, 1960a.

SCHRADER, F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). **Evolution**, n. 14, p. 498-508, 1960b.

SCHRADER, F.; LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). **Experimental Cell Research**, n. 1, p.421-452, 1950.

SCHRADER, F.; LEUCHTENBERGER, C. The cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. **Chromosoma**, v. 4, n.1, p. 404-428, 1951.

SCHRADER, F.; HUGHES-SCHRADER, S. Polyploidy and fragmentation in the chromosomal evolution of various species of *Thyanta* (Hemiptera). **Chromosoma**, v. 7, p. 469-497, 1956.

SCHRADER, F.; HUGHES-SCHRADER, S. Chromatid autonomy in *Banasa* (Hemiptera: Pentatomidae). **Chromosoma**, v. 9, p. 193-215, 1958.

SCHUH, T. T.; SLATER, J.A. **The bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history**, Cornell UNIVERSITY press, 1995.

SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microscopia Electronica y Biologia Celular**, v. 11, p. 179-195, 1987.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 104, p. 353-362, 2007.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Pattern of silver nitrate-staining during meiosis and spermiogenesis in testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 196-206, 2008a.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 686-691, 2008b.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in Insects. **Biological Reviews**, n. 77, p.153-182, 2002.

TAVARES, M.G. AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera. Reduviidae) as analyzed by silver staining. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.

WILSON, E. Studies on chromosomes I. The behaviour of idiochromosomes in Hemiptera. **Journal of Experimental Zoology**, v. 2, p. 371–405, 1905a

WILSON, E. Studies on chromosomes II. The paired microchromosomes, idiochromosomes and heterotropic chromosomes in Hemiptera. **Journal of Experimental Zoology**, v. 2, p. 507–545, 1905b.

WILSON, E. Studies on chromosomes III. The sexual differences of the chromosome-groups in Hemiptera, with some considerations on the determination and inheritance of sex. **Journal of Experimental Zoology**, v. 3, p. 1–40, 1906

WILSON, E. Notes on the chromosomes group of *Metapodius* and *Banasa*. **Biological Bulletin**, v. 12, p. 303–313, 1907.

WILSON, E. Studies on chromosomes IV. The accessory chromosome in *Syromastes* and *Pyrrhocoris*, with comparative review of the types of sexual difference of the chromosome groups. **Journal of Experimental Zoology**, v. 6, p. 69–99, 1909.

WILSON, E. Studies on chromosomes VII. A review of the chromosomes of *Nezara* with some more general considerations. **Journal of Morphology**, v. 22, p. 71–110, 1911.

WILSON, E. A chromatid body simulating an accessory chromosome in *Pentatoma*. **Biological Bulletin**, v. 24, p. 392–411, 1913.

WOLF, K. W. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin in male meiotic spindles of *Pyrrhocoris apterus*, an insect with holocentric chromosomes. **Protoplasma**, v. 191, p. 148–157, 1996.

Xavier, A., Da, C. M. Cariologia comparada da alguns Hemipteros Heteropteros (Pentatomídeos e Coreídeos). **Memórias e Estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra**, v. 163, p. 1–105, 1945.

YOSIDA, T. H. Studies on the chromosomes of coleopteran and hemipteran insects, with special regard to the quantitative relationship between autosomes and sex chromosomes. **Proceedings of the 10th International Congress of Entomology, Montreal**, v. 2, p. 979–989, 1956.

**Tabela 1.** Média dos valores medidos do diâmetro da células em estágio difuso e seus respectivos núcleos e das espermátides arredondadas de *Euschistus heros*, escolhidas aleatoriamente. As barras laterais indicam igualdade entre os valores.

Lobos	Valores ( $\mu\text{m}$ )		
	Células	Núcleo	Espermátides
1	23,60 $\pm$ 0,20	16,68 $\pm$ 0,15	8,32 $\pm$ 0,06
2	23,51 $\pm$ 0,22	17,45 $\pm$ 0,15	8,72 $\pm$ 0,06
3	23,06 $\pm$ 0,24	15,79 $\pm$ 0,20	8,53 $\pm$ 0,05
5	26,08 $\pm$ 0,25	19,53 $\pm$ 0,17	8,64 $\pm$ 0,09
4	37,78 $\pm$ 0,43	27,70 $\pm$ 0,28	14,15 $\pm$ 0,10
6	42,72 $\pm$ 0,43	30,28 $\pm$ 0,29	13,27 $\pm$ 0,11
	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001



**Tabela 2.** Espécies de Pentatomidae estudadas cujos autores informaram o número dos lobos testiculares e aquele(s) com a ocorrência de meiose atípica e polimegalia.

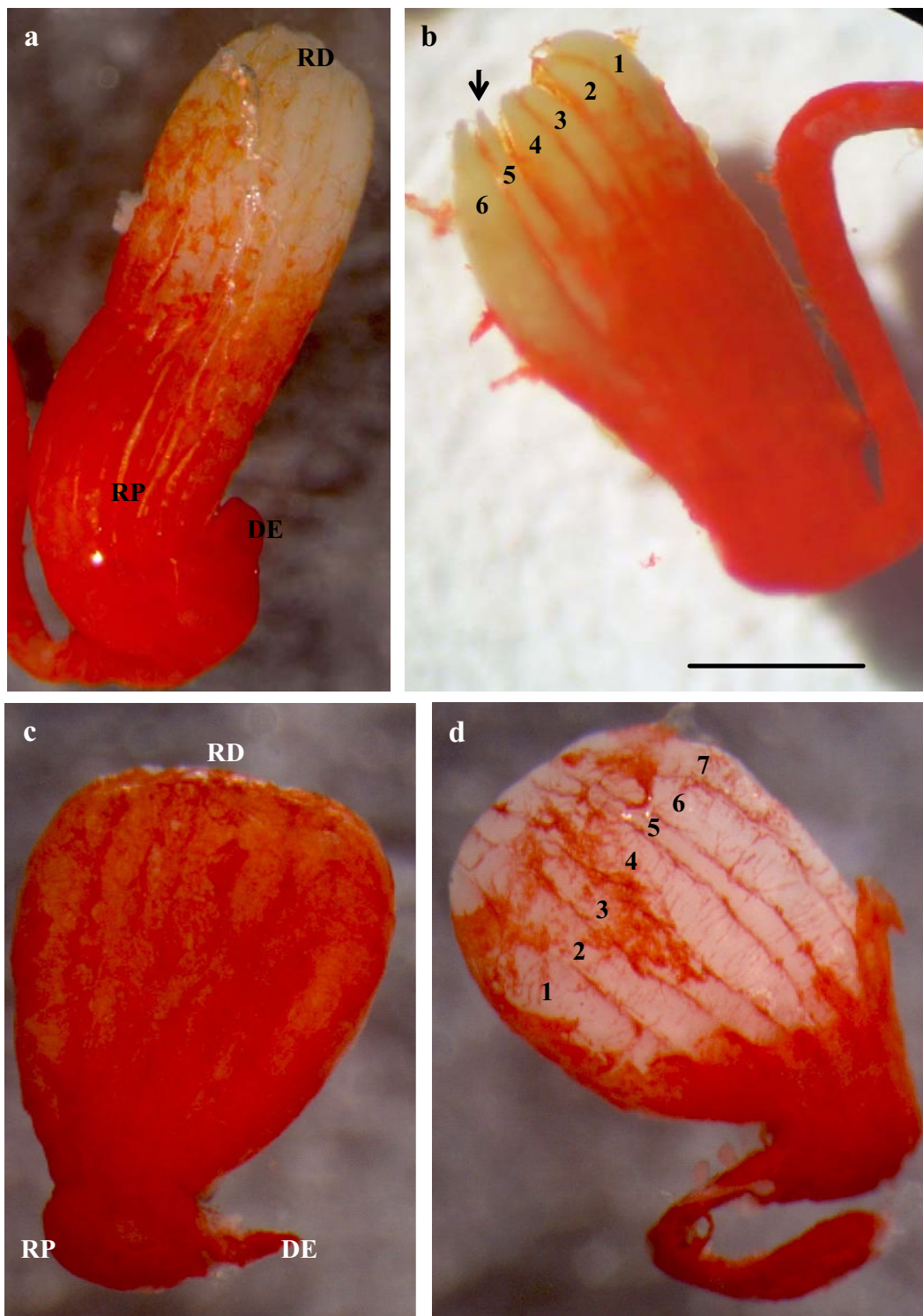
Espécie	Nº de Lobos	Lobo com Meiose Atípica	Lobo com Polimegalia	Referências
<b>Família Pentatomidae</b>				
<b>Subfamília Asopinae</b>				
<i>Apateticus crocatus</i>	7	Não	Não	Bowen (1922a)
<i>Euthyrhynchus floridanus</i> (Linnaeus)	6	Não	Não	Bowen (1922a)
<i>Perillus bioculatus</i> (Fabricius 1775) (as <i>Mineus bioculatus</i> , 1775)	7	Não	Não	Wilson (1906), Bowen (1922a)
<i>Podisus maculiventris</i> (Say) [as <i>P. modestus</i> (Dallas, 1851)] [as <i>P. spinosus</i> (Dallas, 1851)]	7	Não	Não	Bowen (1922a) Wilson (1906, 1909) Montgomery (1901, 1906) Wilson (1905a, 1906, 1909)
<i>Stiretrus anchorago</i> (Fabricius 1775)	7	Não	Não	Wilson (1909), Bowen (1922a)
<b>Subfamília Acanthosomatinae</b>				
<i>Elasmostethus cruciatus</i> (Say)	7	Não	Não	Bowen (1922a)
<b>Subfamília Discocephalinae</b>				
<b>Tribo Discocephalini</b>				
<i>Antiteuchus tripterus</i> (Fabricius, 1787) (as <i>Mecistorhinus tripterus</i> )	6	5	4 e 6	Schrader (1946b, 1960a), Lanzone et al. (2003), Souza et al. (2007)
<i>Dinocoris rufitarsus</i> (Ruckes, 1958)	8			Schrader (1960a,b)
<i>Discocephalessa humilis</i> (Herrich-Schaeffer, 1843) [as <i>Platycarenum notulatus</i> (Stal, 1862)]	4	Não		Schrader (1946b)
<i>Platycarenum umbractulatus</i>	7	Não		Present work
<b>Tribo Ochlerini</b>				
<i>Alitocoris schraderi</i> (Sailer, 1950)	5	5	4 degenerado	Martin (1953), Schrader (1960a)
<b>Subfamília Edessinae</b>				
<i>Brachystethus rubromaculatus</i> (Dallas, 1851)	4	4		Schrader 1946b
<i>Edessa bifida</i> (Say)	5	Não	2 e 4	Bowen (1922a)
<i>E. meditabunda</i> (Fabricius, 1794)	4	Não		In press, Rebagliati et al. (2003)
<b>Subfamília Pentatominae</b>				
<b>Tribo Aeliini</b>				
<i>Aelia americana</i>	7	Não	Não	Bowen (1922a)
<b>Tribo Carpocorini</b>				
<i>Carpocoris</i> sp.	6	Não	3 ?	Bowen (1922a)
<i>Coenus delius</i> (Say, 1832)	6	5	4 e 6	Montgomery (1901, 1906), Wilson (1905a), Wilson (1906), Bowen (1922a)
<i>Cosmopepla bimaculata</i> (Distant)	5	Não	?	Bowen (1922a)
<i>Euschistus euschistoides</i> , (Vollenhoven, 1868) (as <i>E. fissilis</i> Uhler, 1871)	6	5	4 e 6	Wilson (1905a, 1906), Bowen (1922a)
<i>Euschistus heros</i> (Fabricius, 1798)	6	Não	4 e 6	Rebagliati (2005), Present work
<i>E. ictericus</i> (Linnaeus, 1763)	6	5	4 e 6	Wilson (1906), Bowen (1922a)
<i>E. inflatus</i>	6	5	4 e 6	Bowen (1922a)

## Continuação

Classificação	N. Lobos	Meiose Atípica	Polimegalia	Referências
<i>E. servus</i> (Say, 1832)	6	5	4 e 6	Wilson (1906) Foot, Strobell (1914), Bowen (1922a)
<i>E. tristigmus</i> (Say, 1832)	6	5 ?	4 e 6	Hughes-Schrader, Schrader (1961) Montgomery (1901, 1906), Wilson (1906), Bowen (1922a), Hughes-Schrader, Schrader (1961)
<i>E. variolarius</i> (Palisot de Beauvois, 1805) (as <i>Pentatoma</i> )	6	5	4 e 6	Montgomery (1897, 1898, 1901, 1906) Wilson (1906), Foot, Strobell (1914), Bowen (1922a,b)
<i>Holcostethus limbolarius</i> (Stål, 1872) (as <i>Peribalus</i> )	6	Não	Não	Montgomery (1901, 1906), Bowen (1922a)
<i>Mormidea quinqueluteum</i> (Lichtenstien, 1796)	3	Não		Rebagliati et al. (2005), Souza, et al. (2008b)
<i>Oebalus poecilus</i>	4	Não		Souza, et al. (2008b)
<i>O.</i> (Fabricius, 1775) (as <i>Solubea pugnax</i> )	4	Não	Não	Wilson (1909), Bowen (1922a), Hughes-Schrader, Schrader (1961)
<i>O. ypsilongriseus</i> (De Geer, 1773)	4	Não		Rebagliati et al. (2005), Souza, et al. (2008b)
<i>Trichopepla semivittata</i> (Say)	7	Não	Não	Montgomery (1901, 1906), Bowen, (1922a)
<b>Tribo Chlorocorini</b>				
<i>Arvelius albopunctatus</i> (De Geer, 1773)	6	4	3 e 5	Bowen (1922a), Hughes-Schrader, Schrader (1956), Rebagliati, et al. (2005)
<i>Chlorocoris complanatus</i>	7	5	4 e 6	In press
<i>Loxa flavicollis</i> (Drury, 1773) [as <i>L. florida</i> (Van Duzze)]	7	5	4 e 6	Bowen (1922b), Schrader (1945a,b)
<i>L. viridis</i> (Palisot de Beauvois, 1805) [as <i>L. picticornis</i> (Horvath, 1925)]	7	5	4 e 6	Schrader (1945a,b) 1960a)
<b>Tribo Nezarini</b>				
<i>Chlorochroa uhleri</i> (Stål)	6	Não	3 e 5	Bowen (1922a)
<i>Nezara viridula</i> (Linnaeus, 1758)	6	4	3 e 5	Bowen (1922a), Wilson (1911), Xavier, Da (1945) Manna (1951), Yosida (1956) Hughes-Schrader, Schrader (1957) Nuamah (1982), Camacho et al. (1985) Papeschi et al. (2003)
<i>Rhytidolomia saucia</i> (as <i>Chlorochroa saucia</i> ) (Say, 1832)	6	Não	3 e 5	Bowen (1922a), Schrader (1940)
<i>R. senilis</i> (as <i>Chlorochroa senilis</i> ) (Say, 1832)	6	3 e 5	Não	Bowen (1922a), Wilson (1913) Schrader (1940)
<b>Tribo Halyini</b>				
<i>Brochymena quadripustulata</i> (Fabricius)	7	Não	4 e 5	Bowen (1922a)
<b>Tribo Pentatomini</b>				
<i>Acedra hilare</i> (Say, 1832) (as <i>Nezara hilaris</i> )	6	Não	Não	Bowen (1922a), Hughes-Schrader, Schrader (1957) Montgomery (1901, 1906) Wilson (1905a, 1906) Wilson (1906, 1911)

## Continuação

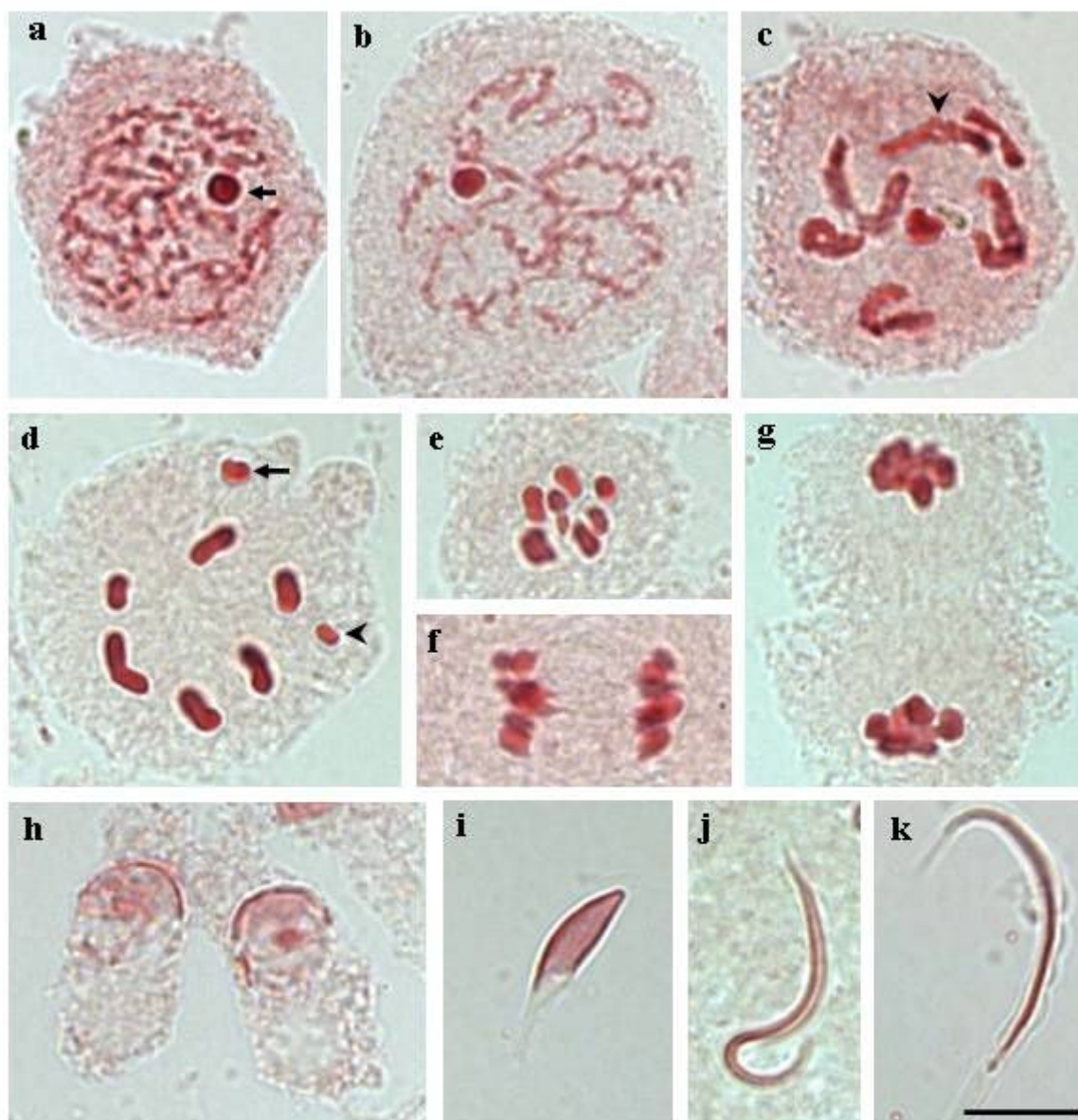
Classificação	N. de Lobos	Meiose Atípica	Polimegalia	Referências
<i>Adevoplitus longicomis</i> (Ruckes, 1958) (as <i>Pseudevoplitus longicomis</i> )	6		3 e 5	Schrader; Leuchtenberger 1951, Schrader (1960a)
<i>Banasa calva</i> (Say, 1832)	3	Não	Não	Bowen (1922a), Wilson (1905b, 1907), Schrader, Hughes-Schrader (1958)
<i>B. dimidiata</i> (Say, 1832)	3	Não	Não	Bowen (1922a), Wilson (1907) Schrader, Hughes-Schrader (1958)
<i>Thyanta calceata</i> (Say, 1832) [as <i>T. custator</i> (Fabricius, 1803)]	4	3 ?	Não	Bowen (1922a), Wilson (1911) Schrader, Hughes-Schrader (1956)
<i>T. casta</i>	6	Não	3 e 6	Bowen (1922a)
<i>T. custator</i>	4	3 ?	Não	Bowen (1922a)
<i>T. perditor</i> (Fabricius, 1794)	3	Não		Schrader, Hughes-Schrader (1956), Present work
<b>Tribo Strachiini</b>				
<i>Murgantia histriônica</i>	5	Não	3 e 4	Bowen (1922a)
<i>M. histriônica</i> (var. <i>nigricans</i> )	5	Não	3 e 4	Bowen (1922a)
<b>Tribo Piezodorini</b>				
<i>Piezodorus guildinii</i> (Westwood)	5 ?	Não	Não	Bowen (1922a), Rebagliati et al. (2001)



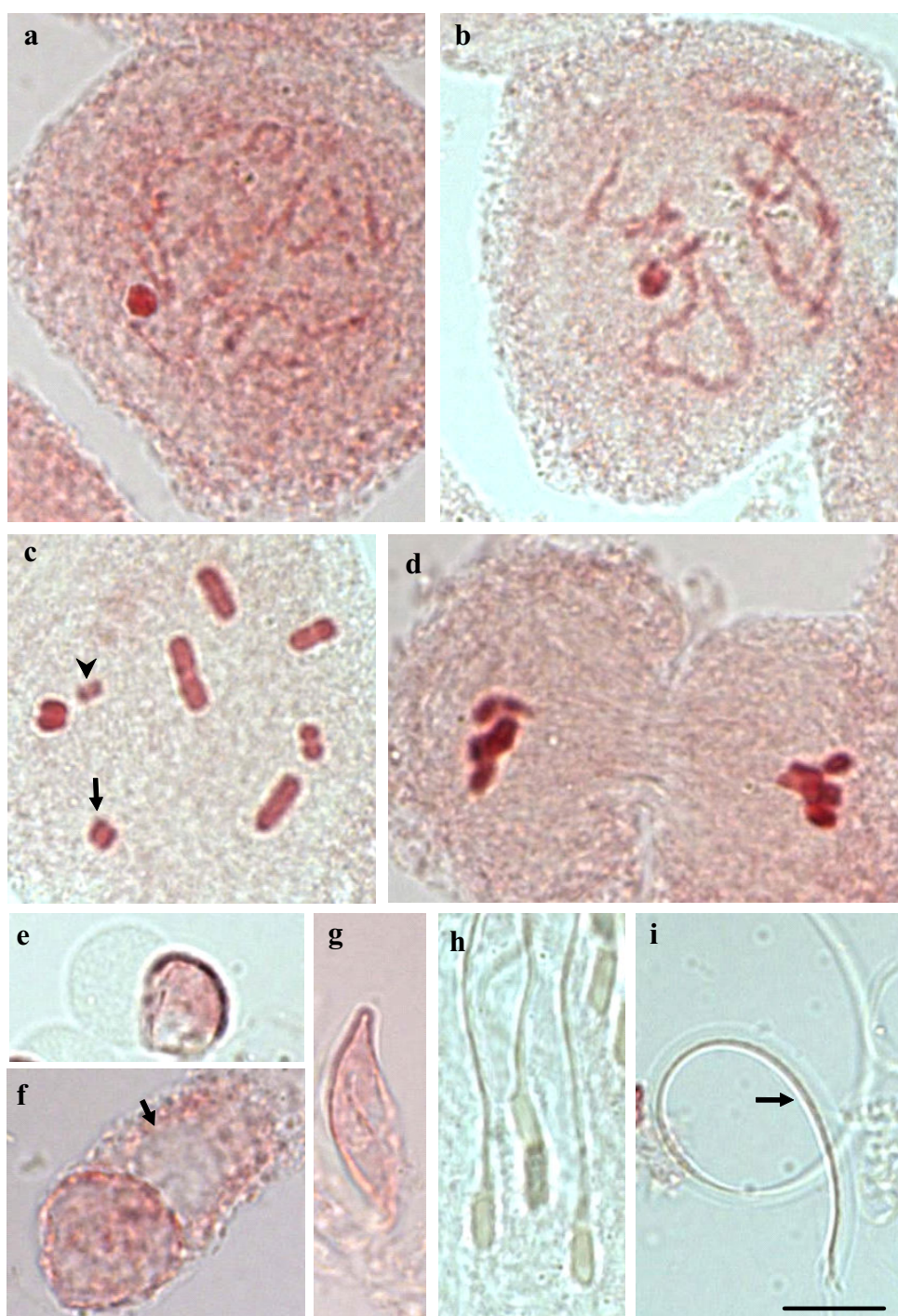
**Figura 1.** (a) Testículo de *Euschistus heros* envolto por membrana avermelhada sendo a região proximal (RP) do ducto ejaculatório (DE) mais avermelhada do que a distal (RD); observar em (b) a presença dos 6 lobos alongados, sendo o 5 o mais delgado (seta). Barra= 1 mm; c) testículo de *Platycarenum umbractulatus*, envolto por membrana avermelhada e constituído por 7 lobos testiculares alongados (b). Aumento 32x



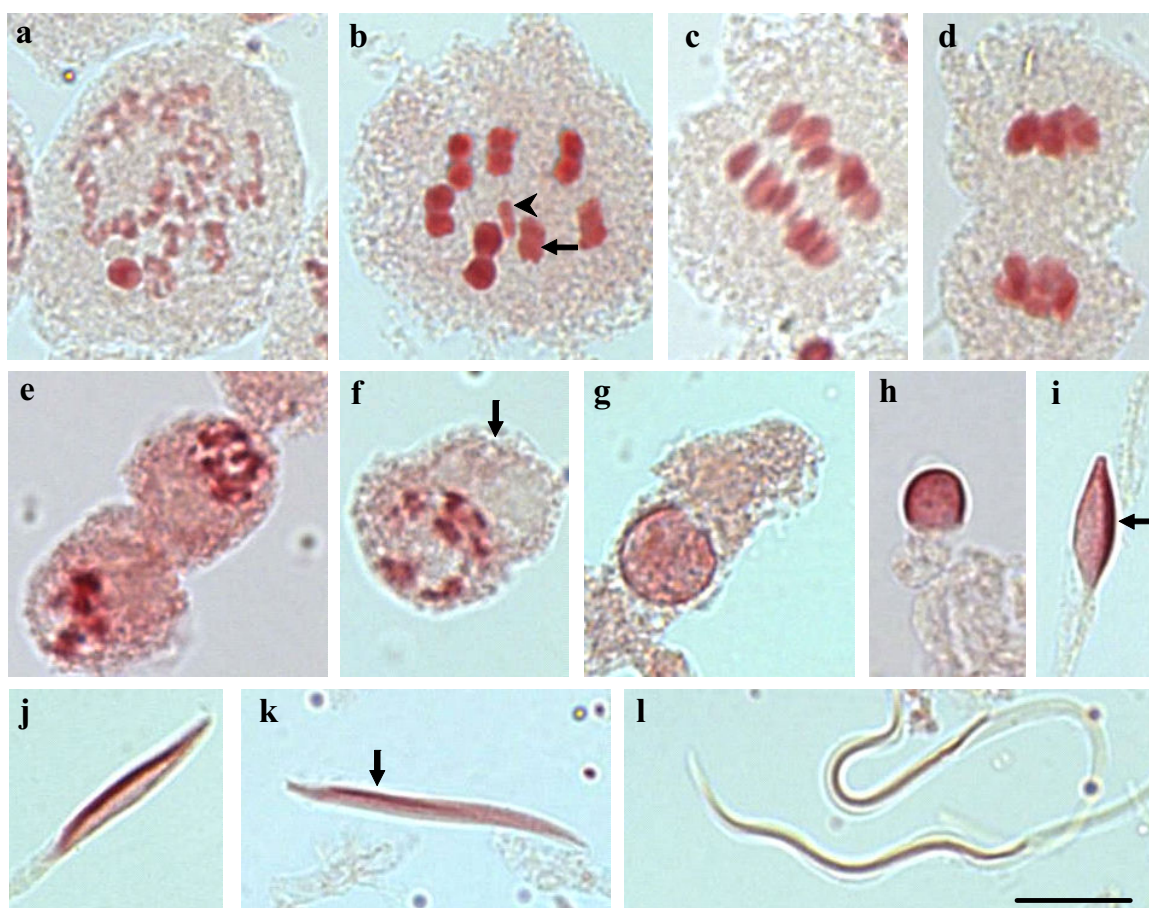
**Figura 2.** Testículo de *Thyanta perditor* envolto por membrana amarelada na região proximal (RP), tornando-se transparente na região distal (RD) do ducto ejaculatório (DE), observar a presença de 3 lobos testiculares. Aumento 32x



**Figura 3.** Células dos lobos testiculares 1, 2, 3 e 5 de *Euschistus heros* coradas comorceína lacto-acética. a-d) Prófases I mostrando uma região heteropicnótica proeminente (seta) e a presença de quiasmas (cabeça de seta); e) metáfase I, em visão polar, apresentando 14 cromossomos (12A + XY); f,g) anáfase e telófase, com migração regular dos cromossomos; h) espermatíde arredondada com material heteropicnótico arredondado no centro e, em forma de meia lua, próximo ao envoltório nuclear; i-k) espermatídes em alongamento com material heteropicnótico próximo ao envoltório nuclear (i,j) ou distribuído uniformemente na região anterior ou posterior da cabeça das espermatídes (k). Barra= 10  $\mu$ m

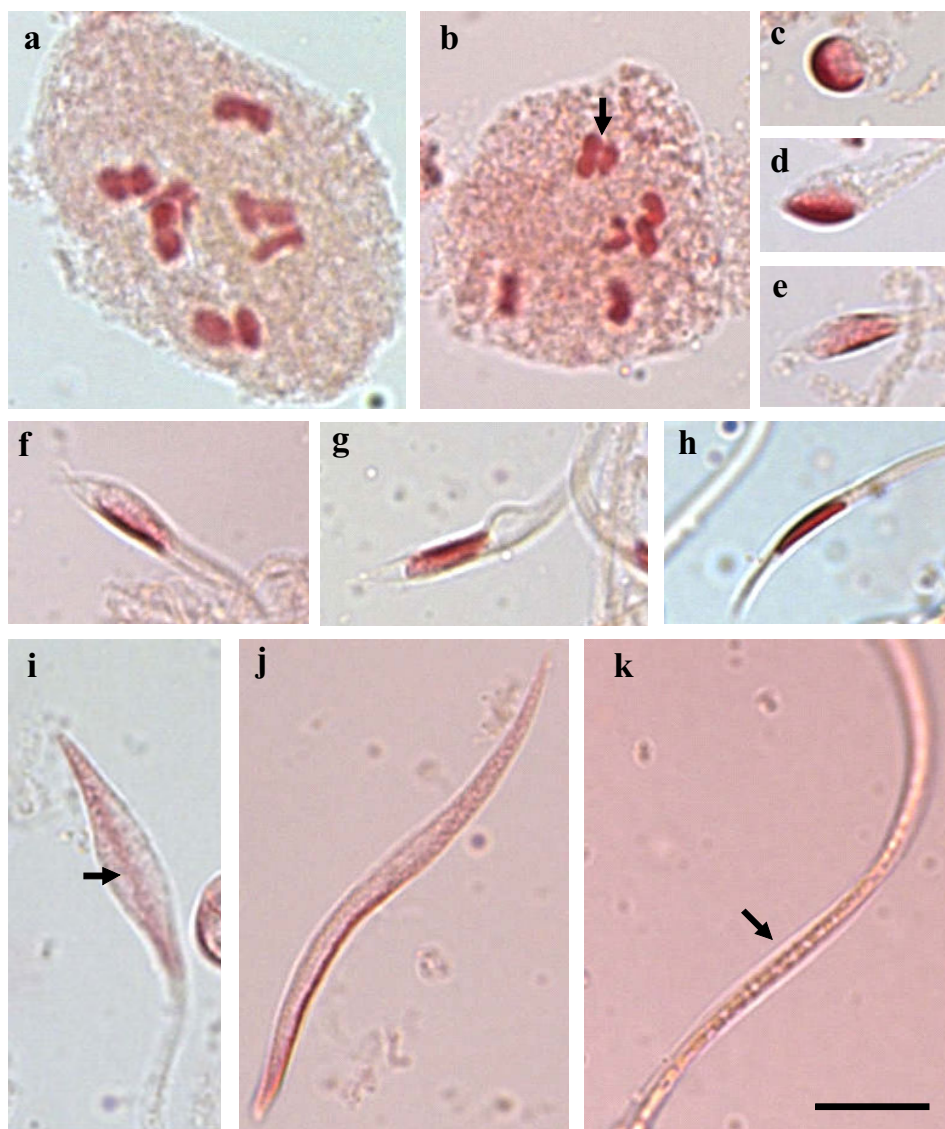


**Figura 4.** Células dos lobos testiculares 4 e 6 de *Euschistus heros* coradas com orceína lacto-acética. a,b) Prófases I com material heteroploicótico arredondado evidente; c) metáfase I constituída de  $2n=14$  cromossomos (12A + XY) (seta mostra o cromossomo X e cabeça de seta o Y); d) telófase com separação regular dos cromossomos; e) espermatíde arredondada com material heteroploicótico localizado próximo ao envoltório nuclear em forma de meia lua; f) espermatíde em início de alongamento, notar uma vesícula do tamanho do núcleo (seta); g-i) espermatídes em alongamento (i, seta mostra cromatina tênue). Notar que a cromatina passa a não ser mais visualizada (h). Barra= 10  $\mu\text{m}$

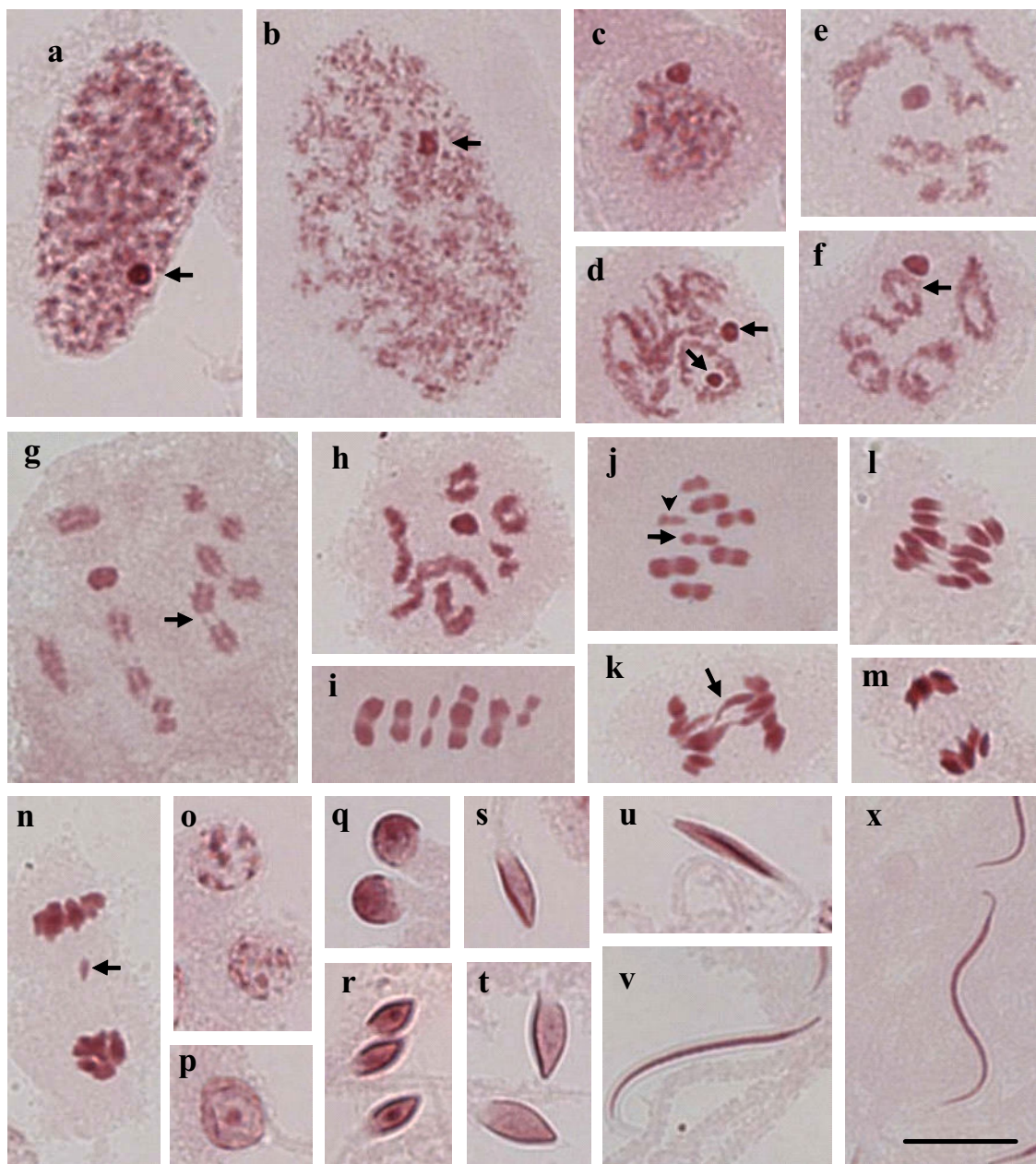


**Figura 5.** Células dos lobos testiculares de *Platycarenum umbractulatus* coradas com orceína lacto-acética. a) Prófase I com material heteropicnótico deslocado para periferia do núcleo; b) metáfase I composta de 14 cromossomos ( $2n= 12A + XY$ ) com os cromossomos sexuais no centro do anel formado pelos autossomos (X e Y; seta e cabeça de seta respectivamente); c-e) anáfase/telófase, com segregação regular dos cromossomos; f) espermatíde arredondada apresentando uma vesícula grande ao lado do núcleo (seta); g,h) espermatíde com material heteropicnótico próximo ao envoltório nuclear em forma de C; i-k) espermatíde em alongamento com material heteropicnótico em um dos lados do núcleo (seta); l) espermatíde no final do processo de alongamento com material heteropicnótico ao longo da cabeça. Barra = 10  $\mu\text{m}$

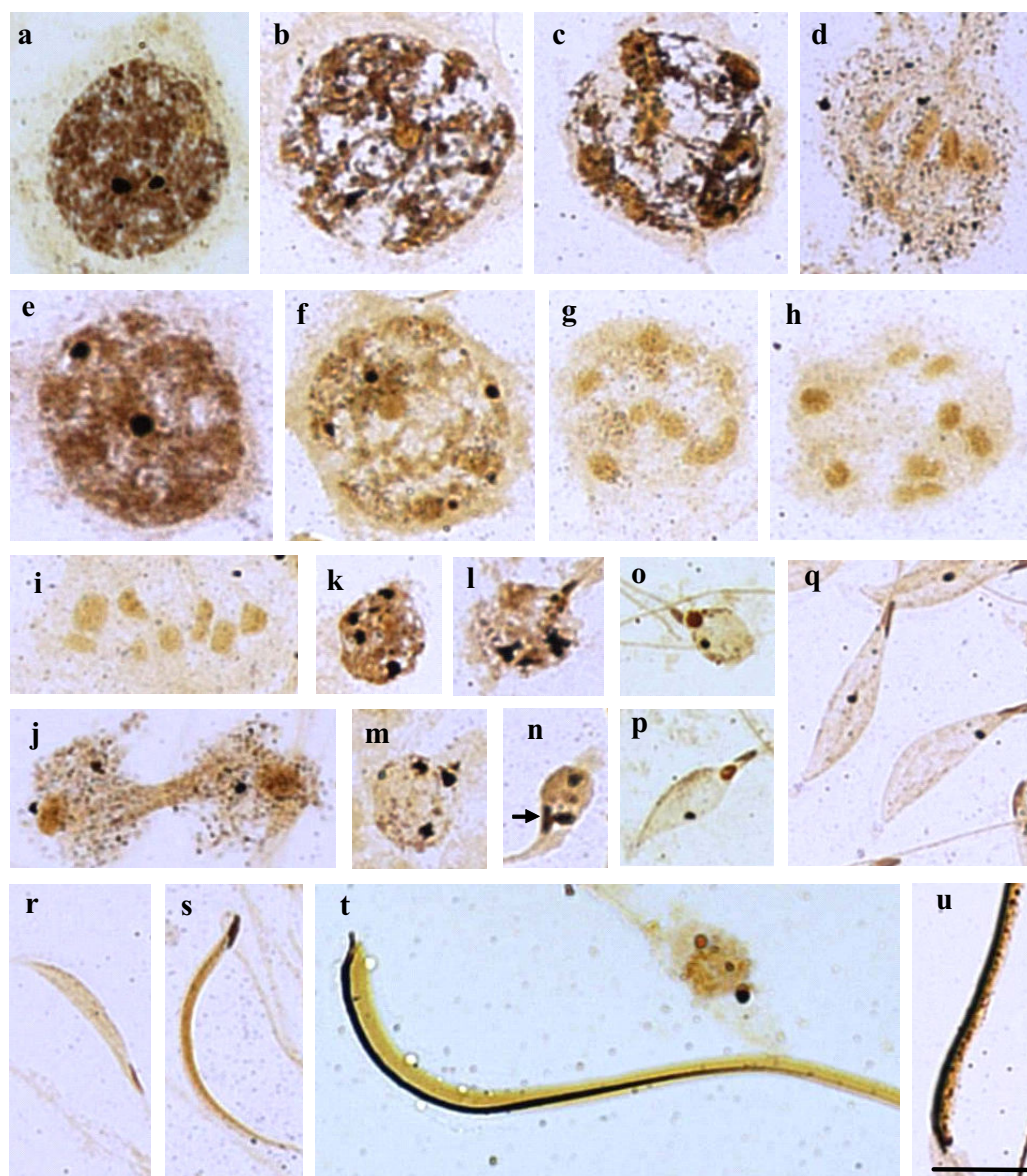




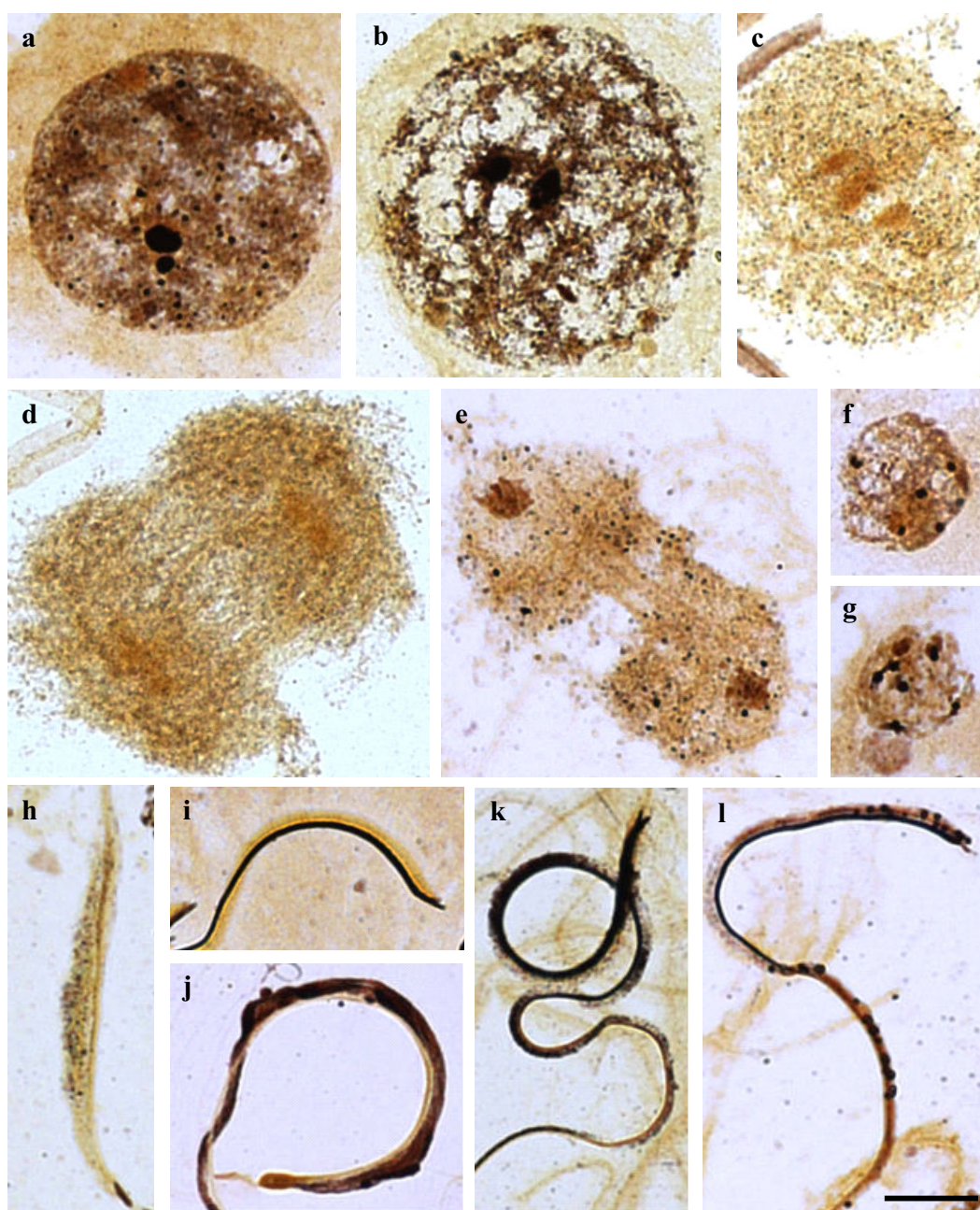
**Figura 6.** Diferenças observadas nas células testiculares dos lobos 4 e 6 (a, b, i, j, k) e 5 (c-h) de *Platycarenum umbractulatus*. a,b) Metáfases I com cromossomos agrupados, sendo geralmente de 2 a 2 (seta); c-h) espermátides com diferentes concentrações de material heteroploide; i) espermátide com material heteroploide localizado no centro; j,k) observar presença de vesículas nas espermátides em alongamento (seta). Barra = 10  $\mu$ m



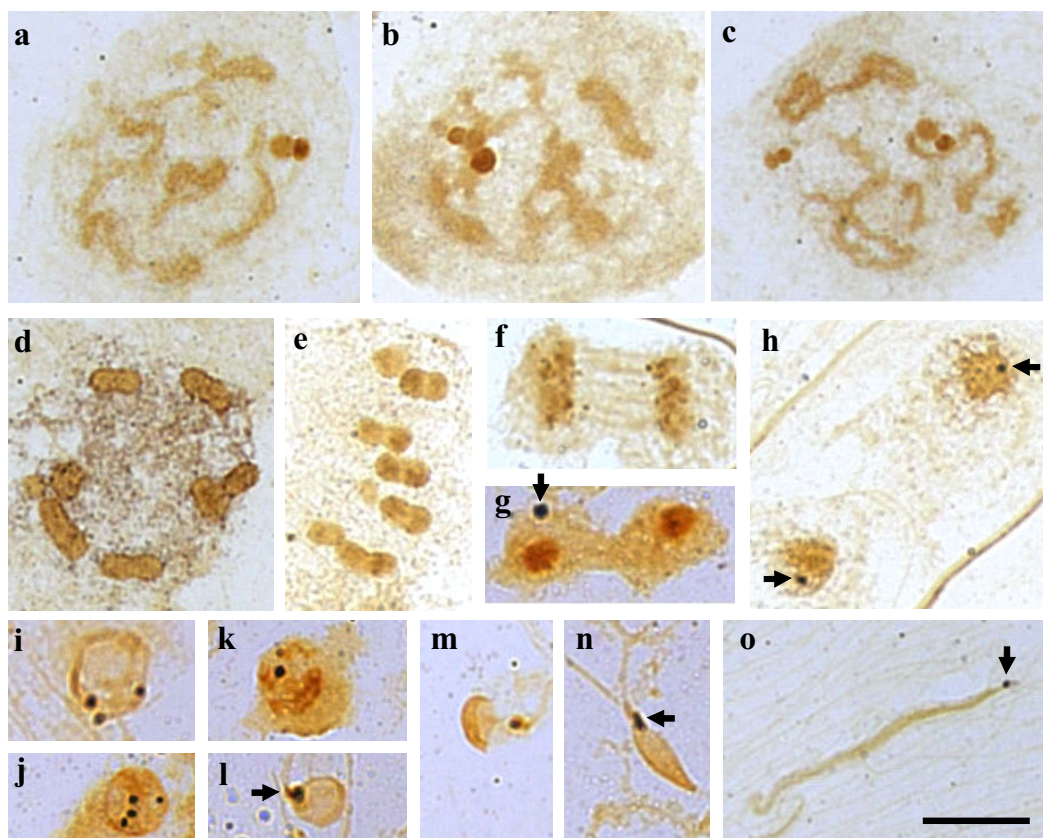
**Figura 7.** Células testiculares de *Thyanta perditor* coradas com orceína-lacto acética. a,b) Núcleo poliplóide, revelando um corpúsculo heteropiconótico (setas); c) prófase inicial com corpúsculo heteropiconótico deslocado para periferia nuclear; d) paquíteno, notar a presença de dois corpúsculos heteropiconóticos (setas); e-g) diplótenos: observar em (f) a formação de quiasma e em (g) associação telomérica (seta); h) diacinese; i) metáfase I, em visão lateral; j) metáfase I, em visão polar; notar os cromossomos sexuais no centro (seta e cabeça de seta, indicando respectivamente o X e o Y); k-n) anáfases I (seta mostrando cromossomos com migração tardia; o-x) processo de espermiogênese; o) espermatócito; p,q) espermatíde arredondada com corpúsculo heteropiconótico ao centro (p); r-u) espermatíde média, verificar corpúsculo heteropiconótico no centro em (r) e na periferia do núcleo em forma de C (s-t); v,x) espermatíde em final de desenvolvimento. Barra= 10  $\mu$ m



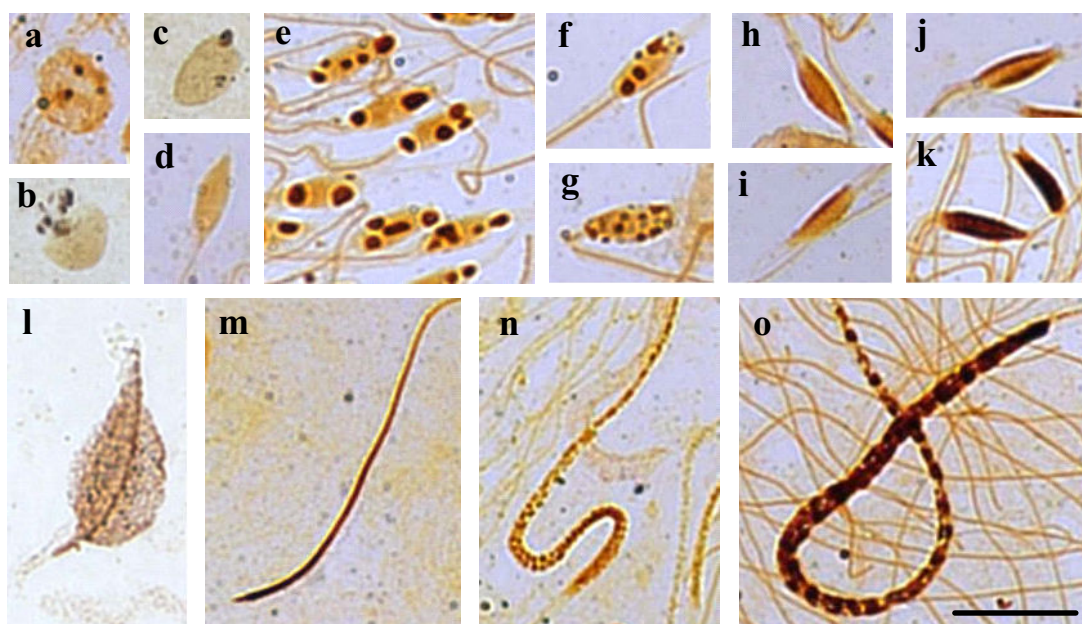
**Figura 8.** Células dos lobos testiculares 1, 2, 3 e 5 de *Euschistus heros* impregnadas pelos íons prata. a-c) Células dos lobos 1-3 evidenciando em (a) prófase I com dois corpúsculos e em (b,c) o início da desorganização desses corpúsculos; d) metáfase I, dos lobos 1-3, com o material impregnado disperso pelo citoplasma e ao redor dos cromossomos; e-n) células do lobo 5, demonstrando em (e) prófase I com dois corpúsculos, em (f,g) início da desorganização desses corpúsculos; (h,i) metáfases I com pequenas impregnações nos cromossomos; (j) telófase com início da reorganização do material impregnado pela prata; (k,n) espermiogênese: em (k) espermátide com vários corpúsculos impregnados, (l,m) espermátides arredondadas e em (n) início do alongamento apresentando deslocamento da marcação para região posterior (seta) e mediana da cabeça; o,p) espermátides médias dos lobos 1-3 com 3 marcações, uma arredondada e escura na região anterior da cabeça e outra mais clara na posterior, abaixo desta uma marcação em forma de bastão; q-s) espermátides em alongamento do lobo 5, (q) com marcação mediana e posterior da cabeça e em (r,s) apenas marcação na região posterior; (t,u) espermátides no final do alongamento mostrando em (t) dos lobos 1-3 com marcação contínua na região posterior e em (u) do lobo 5 com marcação contínua e, ao lado desta, inúmeras marcações descontínuas. Barra= 10  $\mu$ m



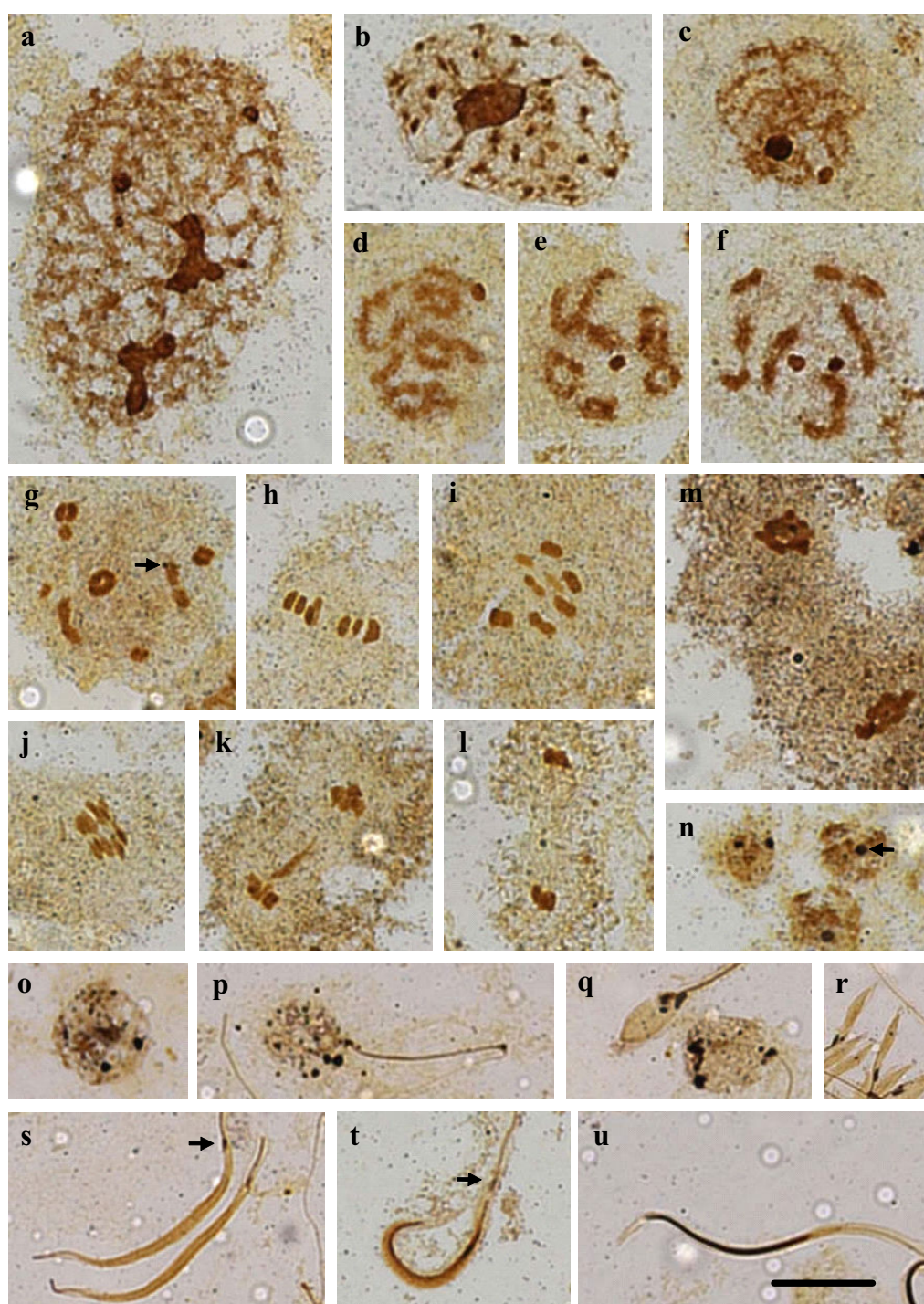
**Figura 9.** Células do lobo testicular 4 e 6 de *Euschistus heros* impregnadas pelos íons prata. a,b) Células em prófase I com dois corpúsculos impregnados pela prata de diferentes tamanhos e vários bem menores; c) metáfase I em visão lateral com impregnação nos cromossomos e no citoplasma; d,e) anáfase/telófase com diversas marcações pelo citoplasma que se juntam formando corpúsculos maiores durante reorganização no final da telófase; f,g) espermátides arredondadas evidenciando várias marcações pelo núcleo; h) início do alongamento da espermátide no lobo 4 com marcação na região posterior da cabeça em forma de bastão e uma mais alongada pela região mediana, ao lado desta, marcações descontínuas; i) na espermátide do lobo 6 apenas marcação contínua na região da cabeça; j,l) espermátides no final do desenvolvimento em (j,k) do lobo 4 com marcações mais intensas na região posterior e com marcação descontínua ao lado desta em (j) e marcações irregulares em (k); (l) espermátide do lobo 6 com marcação contínua na região posterior e marcações arredondadas dispersas pelo citoplasma. Barra= 10 µm



**Figura 10.** Células dos lobos testiculares de *Platycarenum umbractulatus* impregnadas pelos íons prata. a-c) Prófases com 2 ou 4 corpúsculos mais impregnados ou menos pelos íons prata.; d) diplóteno/diacinese com impregnação ao redor dos cromossomos e no citoplasma; e) metáfase I com impregnação ao redor dos cromossomos, no citoplasma; f) anáfase I com pequenas marcações nas massas cromatínicas; g,h) telófase apresentando marcação em uma célula em formação ou nas duas (setas); i-k) espermátides arredondadas apresentando de uma a 4 marcações (seta); l,m) espermátides arredondadas com marcação na região posterior da cabeça; n,o) espermátides em alongamento com marcação na região posterior do núcleo (setas). Barra= 10  $\mu$ m



**Figura 11.** Diferenças observadas nos lobos 4 (m, n e o), 5 (a-k) e 6 (l-o) testiculares de *Platycarenum umbractulatus* impregnadas pelos íons prata. a-c) Espermátides arredondadas com uma marcação evidente e arredondada (c), em torno de 5 marcações distribuídas por toda espermátide (a) ou localizada em uma única região (b); d) espermátide em início de alongamento, sem marcação; e-g) espermátides em alongamento com várias marcações distribuídas ao longo da cabeça (e-g) ou apenas de um lado da cabeça (i) ou de ambos os lados (j,h) ou distribuído uniformemente por toda a cabeça (k); l) espermátide em alongamento com várias regiões pequenas impregnadas e um filamento na região central; m-o) espermátides alongadas com impregnação ao longo da cabeça (m), com várias impregnações pequenas (n) ou grandes (o) distribuídas na cabeça. Barra= 10  $\mu$ m



**Figura 12.** Células testiculares de *Thyanta perditor* impregnadas por íons prata. a,b) Núcleo poliplóide com marcação amórfica, c-g) prófase I, com desorganização do corpúsculo até o final da diacinese. Note marcação telomérica em um dos autossmos (g-seta), (h,i) metáfase I, em (i) cromossomo sexual Y corado fracamente, j-m) anáfases e telófases, n) espermatócito, observar reorganização do material impregnado pela prata no centro (seta), o,p) espermatíde arredondada com inúmeras marcações, q,s) espermatíde média, note marcação na região posterior e anterior da cabeça, t,u) espermatíde final, seta indica marcação na região posterior da cabeça. Barra= 10  $\mu$ m





## **Avaliação da espermatogênese após o uso de Periodic Acid Schiff (PAS) em Pentatomidae (Heteroptera)**

Hederson Vinicius de Souza, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Mary Massumi Itoyama.

UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP.

**Resumo:** Heteroptera da família Pentatomidae são fitófagos, causadores de grandes prejuízos a agricultura, podendo afetar diretamente os humanos, além disto, apresentam os testículos formados de lobos, sendo um deles às vezes denominados de *harlequin* por produzirem diferentes tipos de espermatozóides. É atribuído ao acrossomo a capacidade de reconhecimento e penetração do espermatozóide no ovo e cujo tamanho e forma varia amplamente entre as espécies. Com o objetivo de ampliar as informações com relação a formação do acrossomo, foram analisados testículos das espécies *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus* sp., *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor*. Foi verificado que, de modo geral, o comportamento das marcações para todas as espécies analisadas assemelha-se. No início há uma marcação central que migra para uma das extremidades da espermátide e que, posteriormente, alonga-se, não sendo mais distinguível no espermatozóide. Algumas espécies, como *A. tripterus*, *E. heros* e *P. umbractulatus* apresentaram, em determinados lobos, diferenças significativas no comportamento das marcações sugerindo formação de espermatozóides com funções não fecundantes.

## INTRODUÇÃO

Os Heteroptera constituem um dos mais importantes grupos de insetos do ponto de vista econômico, pois a maioria, durante os estádios de ninfa e adulto, alimenta-se de plantações ou grãos armazenados para o consumo humano. Os Heteroptera incluem aproximadamente 37.000 espécies distribuídas em oito infraordens, cinco das quais abrigam essas espécies nocivas (REBAGLIATI et al., 2005). Entre estas se encontra a família Pentatomidae, que inclui 4112 espécies, muitas das quais são pragas de plantações (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Esses insetos são comumente denominados de maria-fedidas devido ao seu desagradável odor, produzido por meio de uma glândula que se abre na região da metapleura. Essa família é constituída de oito subfamílias (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae) e uma de suas características é a presença de testículo multilobulado, sendo que um dos lobos, em algumas espécies, é do tipo *harlequin* (REBAGLIATI et al., 2005).

O lobo *harlequin* segundo revisão de Rebagliati et al. (2005), diferencia-se dos demais lobos por apresentar pareamento meiótico irregular, associação não-específica dos autossomos, uma disposição anômala dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e fusão celular, trazendo como consequência a produção de espermatozóides com número cromossômico altamente variável. A literatura registra 23 espécies pertencentes a 15 gêneros, três subfamílias (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) como portadoras deste lobo (REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

Uma estrutura essencial para o reconhecimento e penetração do espermatozóide dentro do ovo, levando a fertilização é o acrossomo, tal estrutura é formada pelo Complexo de Golgi (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972). O desenvolvimento do acrossomo começa com um corpo esférico, o grânulo pré-acrossomal. Esta estrutura resulta da fusão de vesículas produzidas pelo Complexo de Golgi, e é gradualmente modificada até atingir sua forma final. O

tamanho, forma e estrutura interna do acrossomo maduro variam entre as diferentes espécies de animais (ANDERSON; PERSONNE, 1975).

Investigações mais exatas e detalhadas, em insetos, foram feitas por Bowen (1922) que analisou os corpos formadores do complexo de Golgi e os dictiosomos dos espermátocitos até o espermatozóide e mostrou que eles estão intimamente envolvidos no processo de formação do acrossomo (BOWEN, 1924).

Através da técnica de “Periodic Acid Schiff”, Schrader e Leuchtenberger (1951) analisaram a estrutura do acrossomo em *Arvelius albopunctatus*, espécie de Pentatomidae que contém lobo *harlequin* e evidenciaram que o reativo de Schiff liga-se no agrupamento 1,2 glicol dos polissacarídeos. Assim, o acrossomo, além de estruturas como complexo de Golgi e dictiosomos, as quais formam o acrobasto, ficam marcados por este corante. Este estudo permitiu verificar que esta espécie apresenta seis lobos, sendo o terceiro e o quinto os que contêm células grandes, o quarto contêm células menores e o primeiro, segundo e sexto lobos contêm células normais. Ainda, verificaram que os espermatozóides possuem diferentes tamanhos acrossômicos quando comparados os seus lobos. Esses pesquisadores ressaltaram também, que os espermatozóides com acrossomos muito grandes podem ter o processo de fecundação prejudicado (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1951).

Com o objetivo de ampliar as informações com relação a formação do acrossomo, os testículos de *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus* sp., *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* foram submetidos ao Reativo de Schiff, após o uso do ácido periódico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Quinze machos adultos de *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus* sp., *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* coletados em São José do Rio Preto (20°47'32" S, 49°21'37" W), SP, Brasil, tiveram seus testículos extraídos, os lobos separados, fixados em Carnoy (etanol: ácido acético 3:1). As lâminas contendo o material foram

mergulhadas em ácido periódico por 15 minutos e, posteriormente, coradas com Reativo de Schiff (GARCIA, 1990) para identificação dos polissacarídeos presentes nas células. As imagens que compõem as ilustrações deste trabalho foram capturadas no microscópio de luz AXIOSKOP 2 ZEISS (programa AXIOVISION) do laboratório de Morfologia, do Departamento de Biologia, do IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto - SP.

## RESULTADOS

Em todas as espécies analisadas (*Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus* sp., *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor*), de modo geral, tiveram o início da formação das marcações no início da espermiogênese (espermatócitos ou espermatídes arredondadas). Pode ser observada a presença de várias marcações dispersas pela célula (Figuras 1a,b; 2a; 3a,b; 4a-c; 5a,b), as quais se juntam formando uma marcação única localizada no centro (Figuras 2c-e; 3c,d; 5c,d; 6a-f) que se desloca para uma das extremidades da célula (Figuras 2f-k; 3e-i; 4d-i; 5e-h), que, em alguns casos, adquire a forma de C (Figuras 3g-i; 4f; 5g,h).

Na espermatíde média ocorre o alongamento da marcação (Figuras 1c-j; 2l-q; 3j-p; 4j-n; 5i-k), contudo, em alguns casos, observa-se que a célula permanece, aproximadamente, com mesmo comprimento (Figuras 1f-j; 2n-q; 3j-p 4l,m; 5j,k). No final do desenvolvimento da espermatíde a marcação já atinge todo o comprimento da espermatíde (Figuras 1k-m; 2r,s; 3q,r; 4r-o; 5l,m; 6k,l).

As marcações obtidas na espécie *Antiteuchus tripterus* foram bastante tênues com relação as das demais espécies, contudo pode-se observar algumas diferenças nos lobos 4, 5 e 6. No lobo 4 as espermatídes arredondadas possuem marcação intensa por toda célula (Figura 1o,p), as espermatídes arredondadas do lobo 6 apresentam uma grande marcação no centro (Figura 1q,r). No lobo 5 as marcações são proporcionais ao tamanho da espermatíde (Figura 1s-z).

A espécie *Euschistus heros* apresentou, nos lobos 4, 5 e 6 uma marcação maior e bem evidente, mas de comportamento semelhante aos dos demais lobos (Figura 2t-z). Foi verificada marcação na região posterior da espermátide em fase final de desenvolvimento dos lobos 4 e 6 (Figura 2z) e no lobo 5, as espermátides no final do desenvolvimento apresentaram marcação ampla ao longo da cabeça (Figura 2a1,b1).

Na espécie *Platycarenum umbractulatus* os lobos 1-3 e 7 apresentaram comportamento semelhante ao descrito anteriormente para *Euschistus heros*, contudo foi observado nos lobos 4 e 6, no início do alongamento das espermátides uma marcação acentuada em uma das extremidades e uma marcação menos pronunciada ao longo da espermátide (Figura 5p). Durante seu desenvolvimento, a marcação longitudinal tornou-se menos evidente, permanecendo apenas a marcação situada na extremidade da célula (Figura 5q,r). No lobo 5 as marcações na espermátide arredondada apresentaram diversas intensidades de coloração até mesmo sem marcações aparentes (Figura 5s-w). No início do desenvolvimento verifica-se espermátides com marcação apenas em uma das extremidades (Figura 5z,d1), em um dos lados da célula (Figura 5y), sem marcação aparente (Figura 5a1-c1) ou com marcação por toda célula (Figura 5e1).

As espermátides de *Thyanta perditor* apresentaram marcação localizada no centro (Figura 6a-f) e esta permaneceu nesta região até a espermátide no final do desenvolvimento (Figura 6g-i), onde é possível verificar um ligeiro alongamento da marcação (Figura 6j).

## DISCUSSÃO

O material acrossomal é depositado pelo acrobasto (Complexo de Golgi) próximo ao envoltório nuclear, geralmente antes do alongamento do núcleo. Se este material não é originalmente localizado na região anterior do núcleo, ele geralmente migra em direção a esta região, e eventualmente avança para a porção terminal do espermatozóide maduro (BOWEN, 1924). Bowen

(1924) propôs que a posição relativa do acrossomo pode ser localizada em qualquer lugar na periferia do núcleo, que, contudo apresenta uma tendência quase universal para algumas porções desta estrutura alcançar a porção anterior dos espermatozóides.

No presente trabalho foi verificado um comportamento na formação acrossomal semelhante para todas as espécies analisadas, isto é, várias marcações que se unem e desloca-se para uma das extremidades da célula. Pode-se verificar que há um alongamento da marcação durante a espermátide média, a qual não é acompanhada pelo alongamento da espermátide, como ocorre em *Euschistus heros*. Tal estrutura pode indicar etapas do desenvolvimento do acrossomo durante esta fase de desenvolvimento da espermátide e ainda, pode indicar que o alongamento da espermátide independe do alongamento do acrossomo nesta espécie. No final deste alongamento não é mais possível sua identificação, já que não há distinção entre o núcleo e a marcação formada.

Schrader e Leuchtenberger (1951) demonstraram que na síntese de material acrossomal pode exibir certo grau de independência da síntese de outras estruturas celulares. As mudanças fisiológicas no terceiro e quinto lobos testiculares de *Arvelius albopunctatus* provocam um grande aumento de nucleoplasma, citoplasma e nucléolo, induzindo, até mesmo, um crescimento do material acrossomal. O resultado é um acrossomo enorme que possivelmente afeta a eficiência do espermatozóide na sua fertilização. Assim, os pesquisadores sugeriram que alterações muito discretas no ambiente fisiológico podem afetar a formação do acrossomo e, conseqüentemente, podem provocar algum grau de esterilidade.

Souza et al. (UNPUBLISH) verificaram na espécie *Euschistus heros*, a formação de espermátides de tamanhos diferenciados nos lobos 4 e 6 e no lobo 5 a formação de espermátides com padrões morfológicos atípicos, que provavelmente estariam relacionadas com outras funções não fecundantes. Neste trabalho verificou-se que, em *E. heros* há uma deposição maior de marcação nos lobos 4, 5 e 6 quando se compara com os demais lobos e que no final do desenvolvimento da espermátide, no lobo 4 e 6 há uma forte marcação na região

posterior do núcleo. Como o acrossomo é considerado uma estrutura relacionada a fertilização, um aumento exagerado nesta estrutura pode indicar a substituição de função do acrossomo para os espermatozóides de certos lobos do mesmo indivíduo, corroborando com a hipótese proposta no trabalho de Souza et al (UNPUBLISH).

Na espécie *Platycarenum umbractulatus* foi verificado padrões diferenciados para alguns lobos, principalmente para o 5. Esta mudança pode ser devido a diferentes fisiologias dos lobos testiculares. Os lobos 1-3 e 7 apresentaram comportamentos semelhantes entre si, assim como o lobo 4 e o 6. O lobo 5 apresenta espermátides, em um mesmo estágio de desenvolvimento, com diferentes marcações sugerindo que, além de mudanças fisiológicas no testículo influenciarem na formação do acrossomo, mudanças na fisiologia celular também pode alterar a estrutura do acrossomo dentro de um mesmo lobo.

Essas mudanças na estrutura do acrossomo podem afetar de alguma forma, a fertilidade do indivíduo. Souza et al. (2007, 2008) analisando a espécie *Antiteuchus tripterus* sugeriram que as mudanças observadas entre os lobos testiculares poderiam afetar a fertilidade do indivíduo, contudo podem-se sugerir outras funções não fecundantes como fornecer nutrientes adicionais, especialmente nucleoproteínas para o desenvolvimento dos ovos (SCHRADER, 1945, 1960a, b), para as fêmeas ou para os espermatozóides fertilizantes (McLAIN, 1998; SWALLOW; WILKINSON, 2002), mantendo assim o valor adaptativo dos machos das espécies com espermatozóides não fecundantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos especiais à Profa. Dra Sônia Maria Oliani do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP pela oportunidade de captura das imagens celulares. À FUNDUNESP e à FAPESP pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W.A.; PERSONNE, P. **The form and function of spermatozoa: a comparative view**. In: Afzelius, B.A. (ed) *The Functional Anatomy of the Spermatozoon*, Pergamon Press, Oxford, p 3-14, 1975.

BACCETTI, B. Insect sperm cell. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 315-397, 1972.

BOWEN, R. H. Notes on the occurrence of abnormal mitosis in spermatogenesis. **Biological Bulletin**, n.43, p.184-203, 1922.

BOWEN, R. H. On the acrosome of the animal sperm. **Anatomical Record**, v. 28, p. 1-13, 1924.

GARCIA, A. **Manual de técnicas citogenéticas**. Colégio de Pósgraduados, Chapingo, México, 196p, 1990.

McLAIN, D. K. Non-genetic benefits of mate choice: fecundity enhancement and sexy sons. **Animal Behaviour**, v. 55, p.1191-1201, 1998.

PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 44, p. 243-277, 1970.

REBAGLIATI, P. J.; MOLA, L. M.; PAPESCHI A. G.; GRAZIA, J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.43, n. 3, p. 199-213, 2005.

SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. **Heteroptera of Economic Importance**. 1. ed. Boca Raton - Florida: CRC Press, v. 1, 828 p., 2000.

SCHRADER, F. Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). **Biological Bulletin**, n. 88, p.63-70, 1945



SCHRADER, F. Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). **Chromosoma**, n. 11, p.103-128, 1960a.

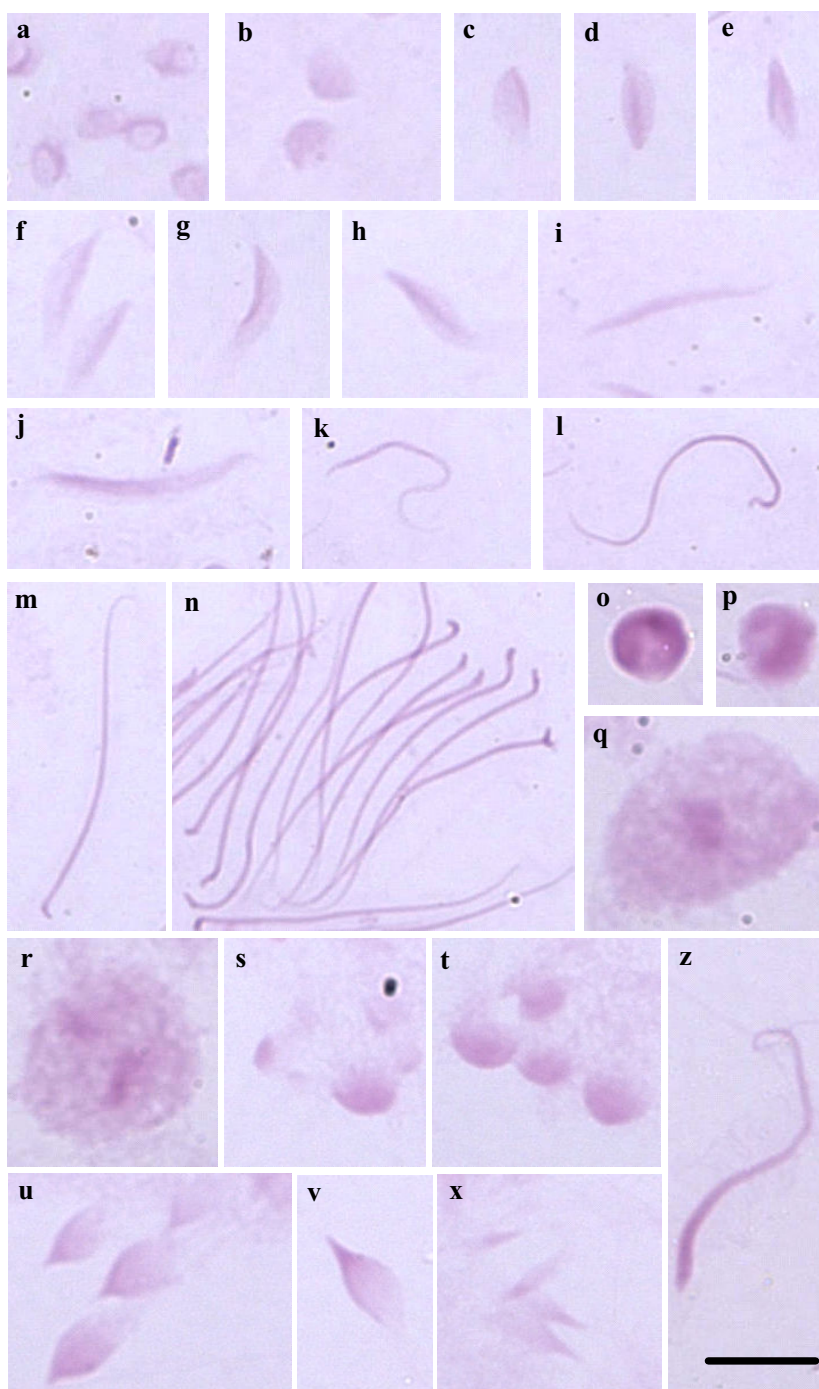
SCHRADER, F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). **Evolution**, n. 14, p.498-508, 1960b.

SCHRADER, F.; LEUCHTENBERGER C. The Cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. **Chromosoma**, v. 4, p.404-428, 1951.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 104, p. 353-362, 2007.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Pattern of silver nitrate-staining during meiosis and spermiogenesis in testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 196-206, 2008.

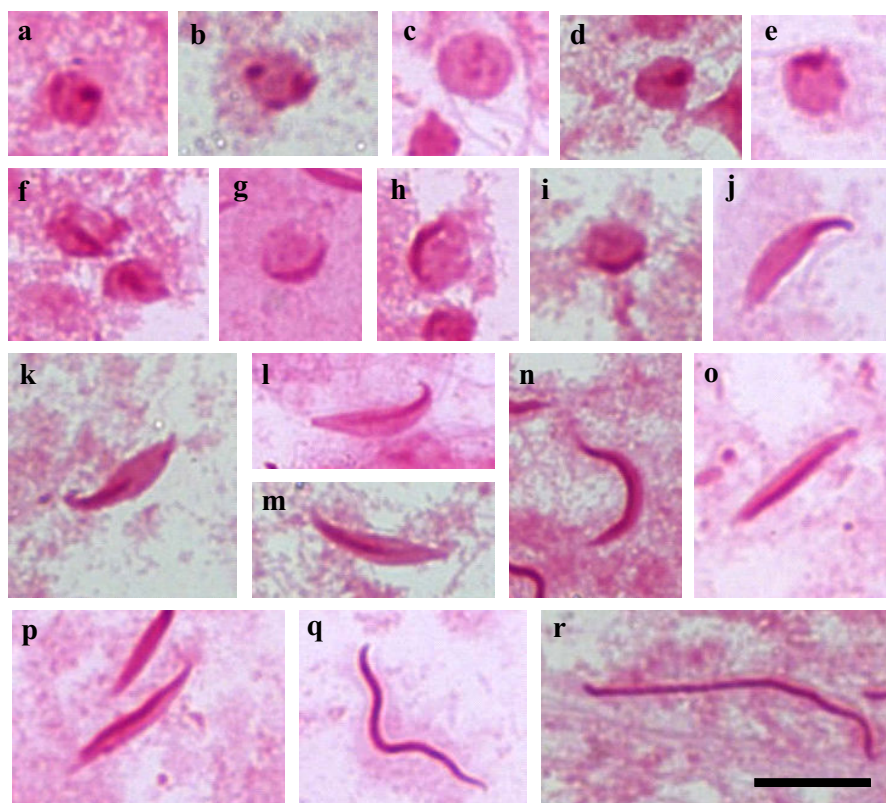
SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in Insects. **Biological Reviews**, n. 77, p.153-182, 2002.



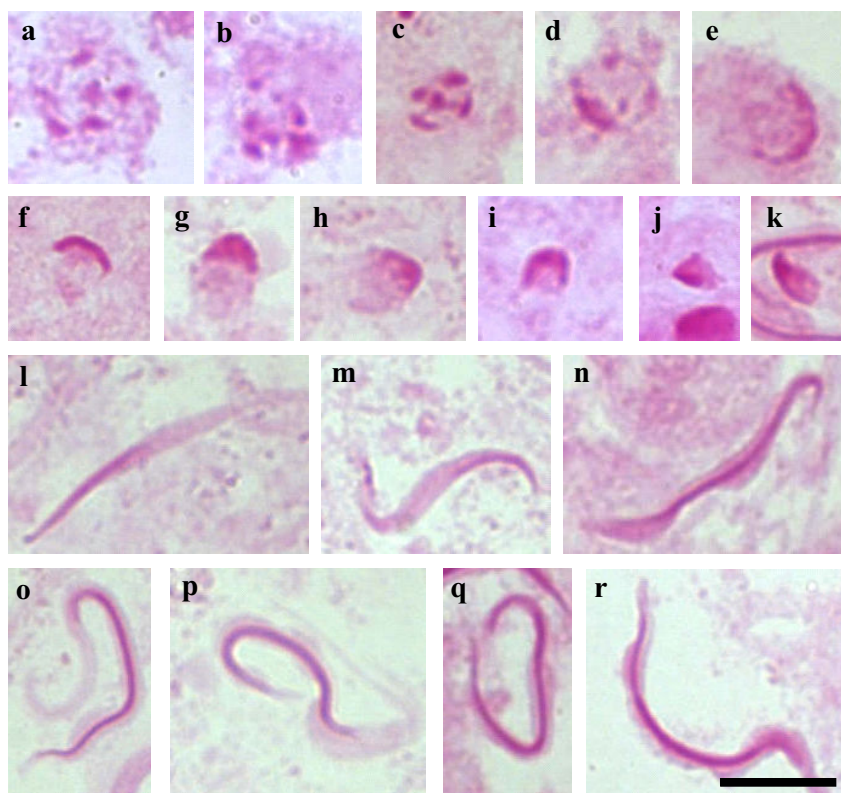
**Figura 1.** Células dos lobos testiculares de *Antiteuchus tripterus* coradas com P.A.S. a-n) Células dos lobos 1-3; a,b) espermátide arredondada evidenciando marcações dispersas pela célula; (c-h) espermátide em alongamento com as marcações localizadas na periferia da célula (c-g) ou no centro (h); i-n) espermátides no final do desenvolvimento sem marcação. o,p) Espermátides arredondadas do lobo 4 com marcação intensa por toda célula; q,r) espermátide arredondada do lobo 6 com marcação ao centro; s-z) células do lobo 5; s,t) espermátide arredondada: observar tamanhos diferentes das células e marcações, u-x) espermátides grande (u), média (v) e pequena (x); z) espermátide no final do desenvolvimento. Barra: 10  $\mu$ m



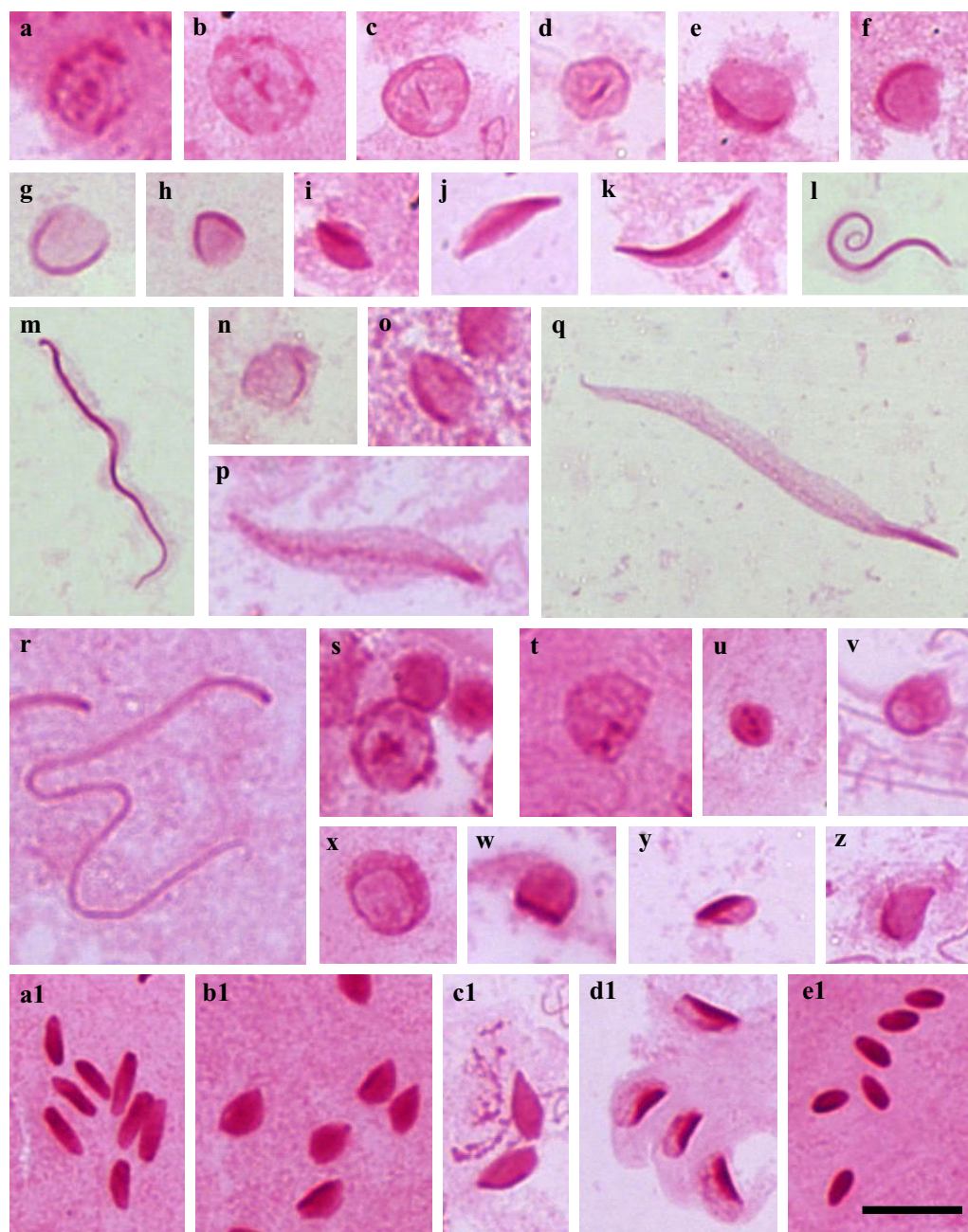
**Figura 2.** Células dos lobos testiculares de *Euschistus heros* coradas com P.A.S. a-s) Células dos lobos 1-3; a-e) espermátide arredondada evidenciando em (a) várias marcações dispersas pela célula ou com as marcações no centro da célula(c,e); h-q) espermátides médias com marcações deslocadas para uma das extremidades da célula (h-k) e posteriormente alongam-se em direção ao centro (l-q); r,s) espermátides no final do desenvolvimento evidenciando marcação em toda célula; t,u) espermátides arredondadas do lobo 5 evidenciando forte marcação; v-y) células dos lobos 4 e 6 mostrando em v-z espermátides arredondadas com grande marcação que se desloca para periferia; w,y) espermátides no final do desenvolvimento com marcação na porção inferior da cabeça; a1,b1) espermátide no final do desenvolvimento do lobo 5 com uma ampla marcação ao longo da célula. Barra: 10  $\mu$ m



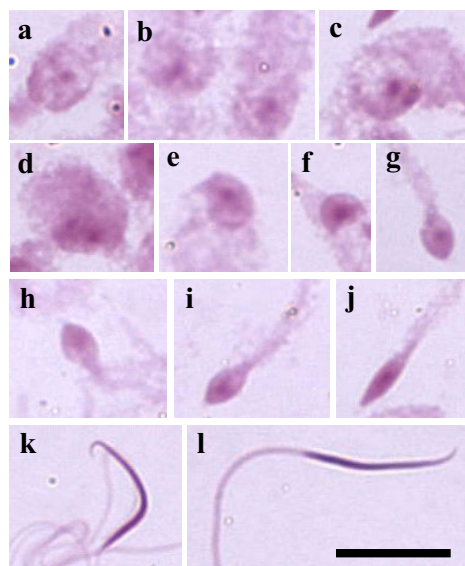
**Figura 3.** Células dos lobos testiculares de *Mormidae quinqueluteum* coradas com P.A.S. a-i) espermátides arredondadas evidenciando em a,b várias marcações dispersas pela célula, em c,d as marcações estão localizadas no centro da célula e deslocam-se para a periferia (e,f), adquirindo a forma de C (g-i); j-p) espermátides médias com marcação em uma das extremidades (j,k), que se alonga em direção ao centro celular (m) ou pela periferia da célula (n-p); q,r) espermátides no final do alongamento evidenciando uma marcação contínua por toda cabeça. Barra= 10  $\mu$ m



**Figura 4.** Células dos lobos testiculares de *Oebalus* sp. coradas com P.A.S. a-f) espermatídes arredondadas com várias marcações dispersas pela célula (a,c), que se deslocam para a periferia (d,f); (g-k) espermatídes no início do desenvolvimento com marcação em uma das extremidades da célula; (l-n) espermatídes médias com marcação alongando-se em direção a outra extremidade da célula; o-r) espermatídes no final do desenvolvimento adquirindo a forma de C (g-i); j-p) espermatídes médias com marcação evidenciando uma marcação contínua por toda cabeça. Barra= 10  $\mu$ m



**Figura 5.** Células dos lobos testiculares de *Platycarenum umbractulatus* coradas com P.A.S. a-m) Células dos lobos 1-3 e 7; a-g) espermátides arredondadas evidenciando em (a,b) várias marcações dispersas pela célula, em (c,d) as marcações localizadas no centro da célula que se deslocam para a periferia da célula em forma de C (e-g); h-k) espermátides médias com marcação em um dos lados; l-m) espermátides no final do desenvolvimento com marcação por toda cabeça. n-r) Células do lobo 4 e 6; n,o) espermátides em alongamento com marcação em forma de C, p,q) espermátides médias com marcação fragmentada ao longo da célula, mais evidente em uma das extremidades, r) espermátide no final do desenvolvimento com uma marcação em uma das extremidades. s-e1) Células do lobo testicular 5; s-x) espermátides arredondadas com diferentes marcações, z-e1) espermátides em desenvolvimento com diferentes marcações. Barra= 10  $\mu$ m



**Figura 6.** Células dos lobos testiculares de *Thyanta perditor* coradas com P.A.S. a-f) espermatídes arredondadas evidenciando marcações localizadas no centro da célula; g-i) as marcações permanecem no centro da célula até o final do alongamento da espermatíde; j) espermatíde alongada demonstrando um ligeiro alongamento da marcação central; k,l) espermatídes no final do desenvolvimento com marcação contínua por toda cabeça. Barra: 10  $\mu$ m

#### **IV. DISCUSSÃO GERAL**

---



#### IV. DISCUSSÃO GERAL

Os testículos de todas as espécies de Pentatomidae consistem de um número de subdivisões, compartimentos ou lobos. O número mais comum de lobos é sete, embora haja variações entre tribos e espécies (NICKLAS, 1961; REBAGLIATI et al., 2005). Nas espécies analisadas do presente trabalho verificou-se a presença de três lobos testiculares nas espécies *Mormidea quinqueluteum* (Pentatominae, Carpocorini) e *Thyanta perditor* (Pentatominae, Pentatomini), quatro nas espécies do gênero *Oebalus* (Pentatominae, Carpocorini), seis em *Euschistus heros* (Pentatominae, Carpocorini) e *Antiteuchus tripterus* (Discocephalinae, Discocephalini) e sete em *Platycarenum umbractulatus* (Discocephalinae, Discocephalini) demonstrando, desse modo, que há uma ampla variação nos números de lobos testiculares na família.

Em Pentatomidae há um lobo denominado de *harlequin* que possui uma meiose diferente do padrão normal. Interessantemente, este lobo corresponde ao maior lobo que produz o espermatozóide de morfologia menor na maioria das espécies e torna-se então desproporcionalmente maior, relativo aos outros lobos, que em alguns casos, produzem os testículos torcidos ou enrolados (SCHRADER, 1960b). Este lobo não tem ocorrência acidental ou esporádica nos testículos das espécies possuidoras e é sempre o lobo 5 (Discocephalinae). No gênero *Loxa*, e na espécie *Brachystethus rubromaculatus*, é o 4, contado a partir do ducto ejaculatório (SCHRADER, 1945a, b; SCHRADER, 1946a, b).

A constatação de um lobo interno ao lobo *harlequin* na espécie *A. tripterus* pode ser indício de que forças evolutivas estejam atuando para manutenção deste lobo já que pode estar relacionado a nutrição dos seus espermatozoides (SOUZA, 2007b, 2008). Dos quinze gêneros estudados com a presença do lobo *harlequin* em Pentatomidae, 11 pertencem a subfamília Discocephalinae, somente o gênero *Platycarenum* não o possui, contudo não há evidência direta entre a presença do lobo *harlequin* e um grupo taxonômico (REBAGLIATI et al., 2005). Embora *Platycarenum umbractulatus*, espécie do presente trabalho, seja uma exceção, foi verificado que as espermátides do lobo 5

apresentam um padrão diferenciado de heterocromatina e do comportamento nucleolar, evidenciando um processo, talvez, intermediário na formação do lobo *harlequin*.

Schrader e Leuchtenberger (1950) verificaram em *Arvelius albopunctatus* (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatomini) a presença de seis lobos testiculares, sendo o terceiro e o quinto os que contêm células grandes, o quarto, maior dos lobos, contêm células menores e o primeiro, segundo e sexto lobos contêm células de tamanho médio. Este estudo permitiu verificar que os espermatozoides dessa espécie possuem diferentes tamanhos quando comparados aos seus lobos, sendo os maiores denominados de polimégalos. É importante ressaltar que estes espermatozoides de diferentes classes resultem de meiose normal. Assim, o conteúdo de proteína e RNA das diferentes classes de espermatozoides está positivamente relacionado ao tamanho enquanto o número cromossômico haplóide permanece constante. Tamanho dos espermátócitos não é correlacionado com o tamanho do lobo. De fato o lobo que produz o espermatozoide de tamanho menor é frequentemente o maior e o lobo que produz o espermatozoide maior é o menor (SCHRADER, LEUCHTENBERGER, 1950, 1951; SCHRADER, 1960a, b).

A espécie *Euschistus heros*, analisada no presente trabalho, apresenta meiose normal em todos os lobos e embora pertença a mesma tribo e contenha seis lobos testiculares, difere da espécie *A. albopunctatus*, pois apresenta o lobo 5 mais delgado, enquanto que os demais lobos apresentam comprimentos e larguras semelhantes, bem como tamanhos celulares e nucleares das células em prófase de “estágio difuso” dos lobos 4, 5 e 6 sejam maiores que nos lobos 1-3. Diferenças entre as marcações por impregnação por íons prata dos lobos demonstram que, provavelmente, há diferentes taxas biosintéticas entre os lobos.

Até o momento, para todas as espécies analisadas há, no mínimo, três lobos formadores de espermatozoides fecundantes (lobos 1-3), exceto na espécie *A. albopunctatus* que possui seis lobos testiculares, mas os lobos 3, 4 e 5 apresentam células diferenciadas, as quais podem ter papéis não fecundantes (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1951). As espécies *Mormidea*

*quinqueluteum*, *Oebalus poecilus*, *O. ypsilongriseus* e *Thyanta perditor* apresentam de três a quatro lobos testiculares e não apresentam o lobo *harlequin*. Pode-se supor que a perda dos demais lobos testiculares no ancestral desta espécie foi mais adaptativa que a evolução do lobo *harlequin* e que atualmente, mesmo havendo pressões evolutivas para formação do lobo *harlequin*, este pode diminuir o valor adaptativo da espécie, devido ao número reduzido de lobos formadores de espermatozoides fecundantes.

Todas as espécies analisadas do presente trabalho apresentaram  $2n= 14$  cromossomos ( $12A + XY$ ), sendo concordantes com relatos citogenéticos de espécies de Pentatomidae que mostram número diplóide de cromossomos, em machos, de seis a 27, sendo o mais frequente o de 14 cromossomos (85%) (REBAGLIATI et al., 2005) e sistema cromossômico do sexo XX/XY (fêmea/macho), exceto em três espécies (*Macropygium reticulare*, X1X2Y; *Rhytidolomia senilis*, neo-XY; *Thyanta calceata*, X1X2Y) e não apresentam m-cromossomos.

Ainda, o estudo do material nucleolar na espécie *P. umbractulatus* permitiu verificar que, provavelmente os cromossomos sexuais estão associados ao nucléolo. Foi verificada, nesta espécie, a presença do mesmo padrão de coloração, mas com diferentes comportamentos, sendo que as partes mais escuras provavelmente são os cromossomos sexuais e as mais claras os nucléolos, podendo evidenciar, desta forma, a participação dos cromossomos sexuais na formação do nucléolo. Nas espécies do gênero *Oebalus* verificou-se a presença de uma marcação do tipo “mushroom” onde o chapéu é a parte mais escura e a haste a mais clara e não foi evidenciada variação neste comportamento.

Bowen (1924) propôs que a posição relativa do acrossomo pode ser localizada em qualquer lugar na periferia do núcleo, que, contudo apresenta uma tendência quase universal para algumas porções desta estrutura alcançar a porção anterior dos espermatozoides.

Nas espécies do presente trabalho foi verificado um comportamento na formação acrossomal semelhante, isto é, várias marcações que se unem e desloca-se para uma das extremidades da célula, exceto para *Thyanta*

*perditor*, cuja marcação localiza-se no centro da espermatíde arredondada e permanece nesta posição até o final do alongamento. Nas demais espécies pode-se verificar que há um alongamento da marcação durante a espermatíde média, o qual não é acompanhado pelo alongamento da espermatíde, como ocorre em *Euschistus heros*, tal estrutura pode indicar etapas do desenvolvimento do acrossomo durante esta fase de desenvolvimento da espermatíde e ainda, pode indicar que o alongamento da espermatíde independe do alongamento do acrossomo nesta espécie. No final deste alongamento não é mais possível sua identificação, já que não há distinção entre núcleo e a marcação formada. Algumas espécies, como *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros* e *Platycarenum umbractulatus* apresentaram, em determinados lobos, diferenças significativas no comportamento das marcações sugerindo formação de espermatozóides com funções não fecundantes.

## **V. CONCLUSÕES GERAIS**

---

## V. CONCLUSÕES GERAIS

As análises da espermatogênese e do comportamento nucleolar nas espécies da família Pentatomidae (Heteroptera), de importância econômica, possibilitou confirmar que as espécies *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus poecilus*, *O. ypsilongriseus*, *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* possuem: 1) cromossomos holocêntricos, isto é, sem centrômero localizado; 2) comportamento pré-reducional para os autossomos e pós-reducional para os cromossomos sexuais; 3) sistema cromossômico do sexo XY para os machos; 4) quiasmas intersticiais ou terminais; 5) complemento cromossômico de  $2n=14$  ( $12A + XY$ ), seguindo o padrão da família; 6) formação do acrossomo a partir de várias marcações que se unem e desloca-se para uma das extremidades da célula.

Algumas características ainda não descritas na literatura para a família Pentatomidae foram observadas pelo fato dos lobos terem sido analisados separadamente.

- a) *Antiteuchus tripterus* possui comportamento meiótico semelhante nos lobos 1 a 3 e comportamento diferente quando se compara 1 a 3, com os demais lobos, sendo o 5, o *harlequin*. O lobo 6 localiza-se internamente ao 5 e foi denominado de lobo composto.
- b) A descoberta do lobo composto em *A. tripterus*, o qual pode estar relacionado com a nutrição do lobo *harlequin*, evidencia que pressões evolutivas ocorreram para a manutenção deste lobo, nesta espécie, o que demonstra a importância, desse lobo, para algumas espécies. Além disso, as análises do comportamento nucleolar evidenciaram que há atividade metabólica diferenciada para os lobos 4, 5 e 6.
- c) A espécie *Euschistus heros* não possui lobo *harlequin*, porém, as análises da espermatogênese demonstraram que há diferenças significativas no tamanho

das células dos lobos 4 e 6, os quais podem estar relacionados com a formação de espermátides não-fecundantes.

- d) Em *Platycarenum umbractulatus*, apesar do processo de espermatogênese ter sido semelhante entre os sete lobos, algumas diferenças foram observadas como, por exemplo, nos lobos 4 e 6, onde os cromossomos foram encontrados agrupados dois a dois em algumas células da metáfase I e no lobo 5 as espermátides arredondadas e em início de alongamento apresentaram diferentes padrões de concentração de material heteropicnótico. Tais características podem evidenciar a formação de possíveis espermatozóides não fecundantes.
- e) Com relação à Impregnação pelos íons prata, foi verificada a presença de corpos nucleolares na forma de “mushroom” nas prófases das espécies do gênero *Oebalus*, característica, ainda não descrita na literatura. Em *P. umbractulatus*, observou-se, durante a prófase, dois corpos escuros e dois mais claros que podem demonstrar a participação dos cromossomos sexuais na formação e organização do nucléolo desta espécie.
- f) Em *P. umbractulatus* foi possível, também, verificar a presença de marcações diferenciadas pelos íons prata nas espermátides do lobo 5. Embora não possua lobo *harlequin*, tais marcações podem indicar formação de espermatozóides não fecundantes neste lobo.
- g) Com relação a formação do acrossomo, em *Euschistus heros* pode-se verificar que há um alongamento da marcação durante a espermátide média, o qual não é acompanhado pelo alongamento da espermátide. Foi observado, ainda, em *E. heros* maior intensidade de coloração nas espermátides dos lobos 4 a 6 que podem indicar formação de espermatozóides não fecundantes. Em *P. umbractulatus* houveram marcações diferenciadas nas espermátides do lobo 5, que podem indicar diferenças fisiológicas neste lobo com relação aos demais.

A espécie *Thyanta perditor* apresentou uma marcação central durante todo o desenvolvimento da espermatíde, padrão diferente das espécies analisadas.

Assim, verifica-se a importância dessas análises para compreensão do cenário evolutivo da família Pentatomidae.



## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWEN, R. H. Notes on the occurrence of abnormal mitosis in spermatogenesis. **Biological Bulletin**, n.43, p.184-203, 1922.

BOWEN, R. H. On the acrosome of the animal sperm. **Anatomical Record**, v. 28, p. 1-13, 1924

BRESSA, M.J.; FUMAGALLI, E.; ITUARTE, S.; FRASSA, M.V.; LARRAMENDY, M.L. *Meiotic studies in Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). II. Evidence on variations of the diffuse stage between wild and laboratory-inbred populations of *Dysdercus chaquency* Freiberg, 1948. **Hereditas**, v. 137, p. 125-131, 2002.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; FUMAGALLI, E.; VAN DOESBURG, P.H., LARRAMENDY. Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. **Folia Biologica** (Kraków), v. 51, p. 135-141, 2003.

BUCK, R.C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and difuse kinetochore. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.

CAMACHO, J.P.M.; BELDA, J.; CABRERO, J. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezera viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed C-banding and silver impregnation. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 27, p. 490-497, 1985.

CHICKERING, A.M.; BACORN, B. Spermatogenesis in the Belatomatidae. IV. Multiple chromosomes in *Lethocerus*. **Papers of the Michigan Academy of Science, Arts, and Letters**, v. 17, p. 529-534, 1933.

COMINGS, D.E.; OKADA, T.A. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. **Chromosoma** (Berl.), v. 37, p. 177-192, 1972.

FOSSEY, A.; LIEBENBERG, H. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carlisis wahlbergi* Stal (Coreidae: Heteroptera). **Cytobios**, v. 81, p. 7-15, 1995.

GONZALEZ-GARCIA, J.M.; ANTONIO, C., SUJA, J.A., RUFAS, J.S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 4, p. 124-132, 1996.

HEALY, J.M.; JAMIESON, B. G. M. An ultrastructural examination of developing and mature paraspermatozoa in *Pyrazus ebeninus* (Mollusca, Gastropoda, Potamididae). **Zoomorphology**, n. 98, p.101-119, 1981.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. **Experientia**, v. 36, p. 104-104, 1980.

HUGHES-SHCRADER, S.; SHCRADER, F. The Kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v. 12, p. 327-350, 1961.

JANDE, S.S. An analysis of the chromosomes in four species of the family Belostomatidae (Heteroptera, Cryptocerata). **Research bulletin (N.S.) of the Panjab University**, v. 10, p. 25-34, 1959.

JOHN, B.; KING, M. Pseudoterminalisation, terminalization and non-chiasmate modes of terminal association. **Chromosoma**, v. 92, p. 89-99, 1985.

JONES, G.H. Chiasmata. In: Monees PB, ed, **Meiosis**. Orlando: Academic Press, p. 213-244, 1987.

LANZONE, C., EBENEZER, B.; SOUZA, M. J., Comportamiento meiotico en tres especies de la familia Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of Basic and Applied Genetics (formerly Mendeliana)**, v. 15, n. 2, p. 100, 2003.

MANNA, G. K. **Chromosomes in evolution in Heteroptera**. In: Chromosomes in evolution in eukariotic groups. v. II, cap. 8, (eds A. K. Sharma and A. Sharma), CRC Press, Florida p. 189-225, 1984.

McLAIN, D. K. Non-genetic benefits of mate choice: fecundity enhancement and sexy sons. **Animal Behaviour**, n. 55, p.1191-1201, 1998.

McLAIN, D.K.; MARSH, N. L. Male copulatory success : heritability and relationship to mate fecundity in the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Heredity**, n. 64, p.161-167, 1990.

MEVES, F. Ueber oligopyrene und apyrene spermien und uber ihre entstehung nach beobachtungen an *Peludina* und *Pygaera*. **Archive fur Mikroskopische Anatomie**, n. 61, p.1-84, 1903.

MOTZKO, D.; RUTHMANN, A. Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 33, p. 205-216, 1984.

NICKLAS, R.B. The Relationship between DNA Content and Alternative Meiotic Patterns in Certain Discocephalinids (Pentatomidae; Heteroptera). **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, n. 2, p. 486-490, 1961.

PAPESCHI, A.G.; BRESSA, M.J. Cytogenetic studies in Belostomatidae from Argentina. **Abstracts of the Second Quadrennial Meeting of the International Heteropteristis Society**, v. 46, 2002.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; BRESSA, M.J.; GREIZERSTEIN, E.J., LÌA, V.; POGGIO, L. Behaviour of ring bivalents in holocentric systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 11, p. 725-733, 2003.

REBAGLIATI P. J.; MOLA, L. M.; PAPESCHI, A. G. Karyotype and meiotic behaviour of the holokinetic chromosomes of six Argentine species of Pentatomidae (Heteroptera). **Caryologia**, v. 54, p. 339-347, 2001.

REBAGLIATI, P.; PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M. Meiosis and fluorescent banding in *Edessa mediatubunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). **European Journal Entomology**, v. 100, p. 11-18, 2003.

REBAGLIATI, P. J.; MOLA, L. M.; PAPESCHI A. G.; GRAZIA, J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.43, n. 3, p. 199-213, 2005.

RUFAS, J.S.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Ultrastructure of the kinetochore in *Graphosomaitalicum* (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**, v. 32, p. 142-148, 1986.

SCHRADER, F. Notes on the mitotic behaviour of long chromosomes. **Cytologia** (Tokio), v. 6, p. 422-430, 1935.

SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). **Journal Morphology**, v. 67, p. 123-141, 1940.

SCHRADER, F. Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). **Biological Bulletin**, n. 88, p.63-70, 1945a.

SCHRADER, F. The cytology of regular heteroploidy in the genus *Loxa* (Pentatomidae ± Hemiptera). **Journal of Morphology**, n. 76, p.157-177, 1945b.

SCHRADER, F. Autosomal elimination and preferential segregation in the harlequin lobe of certain Discocephalini (Hemiptera). **The Biological Bulletin**, v. 90, p. 265-290, 1946a.

SCHRADER, F. The elimination of chromosomes in the meiotic divisions of *Brachystethus rubromaculatus* Dallas. **The Biological Bulletin**, v. 90, p 19-31, 1946b.

SCHRADER, F. Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). **Chromosoma**, n. 11, p.103-128, 1960a.

SCHRADER, F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). **Evolution**, n. 14, p.498-508, 1960b.

SCHRADER, F.; LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopuntatus* (De Geer). **Experimental Cell Research**, n. 1, p.421-452, 1950.

SCHRADER, F.; LEUCHTENBERGER, C. The cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. **Chromosoma**, v. 4, n.1, p. 404-428, 1951.

SILBERGLIED, R. E.; SHEPHERD, J. G.; DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? **American Naturalist**, n. 123, p.255-265, 1984.

SIVINSKI, J. Sexual selection and insect sperm. **Florida Entomologist**, n. 63, p.99-111, 1980.

SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microscopia Elettronica y Biologia Celular**, v. 11, p. 179-195, 1987.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2007a.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, 2007b.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Pattern of silver nitrate-staining during meiosis in testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 196-206, 2008.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in Insects. **Biological Reviews**, n. 77, p.153-182, 2002.

TAVARES, M.G. AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera. Reduviidae) as analyzed by silver staining. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.

UESHIMA, N. Hemiptera II: Heteroptera. In: JOHN, B. **Animal cytogenetics**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, v. 3, Insecta: 6, p. 1-117, 1979.

WOLF, K.W. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin in male meiotic spindles of *Pyrrhocoris apterus*, an insect with holocentric chromosomes. **Protoplasma**, v. 191, p. 148-157, 1996.





## VII. ANEXOS

### 1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1.1. Obtenção e Armazenamento dos Insetos

Para a análise citogenética, foram coletados em torno de 15 indivíduos machos adultos das espécies: *Antiteuchus tripterus*, *Euschistus heros*, *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus poecilus*, *O. ypsilongriseus*, *Platycarenum umbractulatus* e *Thyanta perditor* da família Pentatomidae em exemplares vegetais de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link.), boldo (*Pneumus boldus*), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*), pé-de-bucha (*Luffa cylindrica*) na região de São José do Rio Preto (20°47'32" S, 49°21'37" W), SP, Brasil. Os insetos foram transportados até o laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, montados para serem encaminhados para a identificação ou para a coleção no laboratório ou fixados em metanol:ácido acético (3:1) ou etanol absoluto e armazenados no refrigerador, para posteriores análises. A identificação dos insetos foi realizada pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Alves Costa do Departamento de Entomologia do Museu Nacional do Rio de Janeiro, RJ.

#### 1.2. Dissecção dos Insetos

Após a coleta, os insetos, machos adultos, foram eterizados e dissecados, já que a espermatogênese em Heteroptera não se encerra no estágio larval. Para a dissecção, os insetos foram fixados com um alfinete na região posterior do cefalotórax em uma placa de Petri contendo parafina sólida e tiveram suas patas, asas, escutelo e laterais do abdome seccionados com uma tesoura pequena e pontiaguda. Foi gotejada uma gota de solução fisiológica de Demerec sobre os órgãos expostos, estes foram removidos com auxílio de um estilete,

deixando os testículos evidentes. Os testículos, localizados latero-ventralmente, são mantidos em sua posição por meio de ramificações dos troncos das traquéias dos respectivos segmentos. Uma membrana de coloração variável (de transparente à vermelha) envolve os testículos em cujo interior localizam-se as células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento.

### **1.3. Colorações**

#### **1.3.1. Orceína Lacto-Acética**

Os testículos extraídos, conforme descrito anteriormente, tiveram os lobos separados e corados com orceína lacto-acética, para sua caracterização morfológica. Em seguida, os lobos foram individualmente submetidos ao esmagamento para o estudo citogenético da meiose e espermiogênese.

#### **1.3.2. Impregnação com Nitrato de Prata (HOWELL; BLACK, 1980, com modificações)**

Os insetos foram dissecados em solução fisiológica de Demerec e os túbulos seminíferos transferidos para solução de ácido acético a 45% por 1 minuto e, posteriormente, ácido láctico a 50% por 5 minutos. O material foi esmagado em ácido acético a 45%. As lâminas ficaram em câmara úmida por 10 minutos e a lamínula foi retirada com auxílio de nitrogênio líquido. As lâminas foram guardadas para o envelhecimento.

As lâminas envelhecidas foram tratadas com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 1%); posteriormente, foram adicionadas duas gotas de nitrato de prata a 50%, o material foi coberto com lamínula e

incubado em estufa a 60°C por 10 minutos em câmara úmida até o aparecimento de coloração marrom dourada. A lâmina foi lavada com água destilada, para desprendimento da lamínula e recebeu dois banhos de água destilada secando à temperatura ambiente. Após um dia, a lâmina foi montada com verniz cristal para análise.

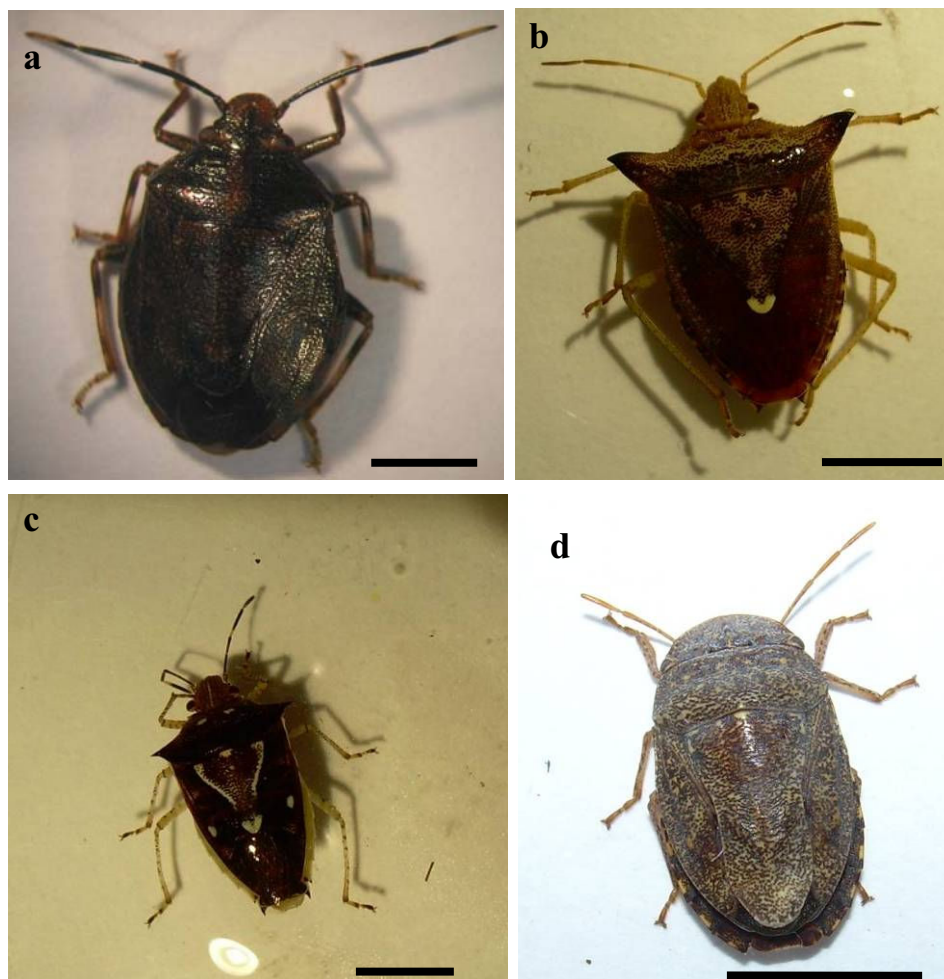
### **1.3.3. Reação por Reativo de Schiff e Ácido Periódico (P.A.S.)**

Após o envelhecimento das lâminas, como mencionado anteriormente, estas foram tratadas com algumas gotas de ácido periódico a 0,5% por 1 hora. Foram lavadas por três vezes em água destilada. Posteriormente, foram adicionadas algumas gotas de reativo de Schiff sobre o material e as lâminas foram deixadas em câmara escura por mais 1 hora. Foram lavadas com água destilada e contra-corada com hematoxilina por 10 minutos e lavadas em água destilada. Após secas, as lâminas foram montadas em verniz cristal para análise.

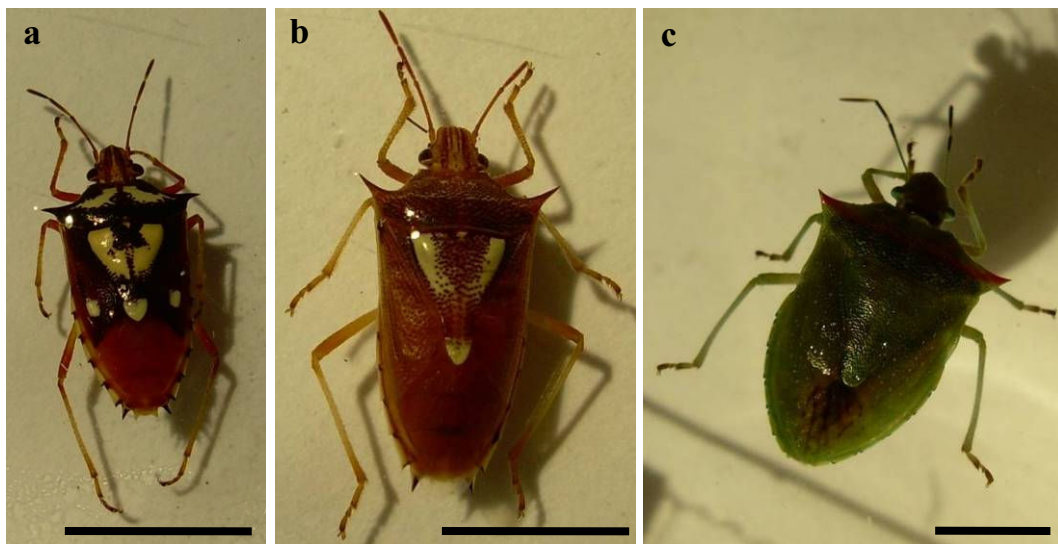
### **1.4. Análise das lâminas**

As lâminas foram analisadas no microscópio de luz, Olympus modelo BX40, do laboratório de Citogenética de Insetos. As imagens foram capturadas no microscópio de luz AXIOSKOP 2 ZEISS (programa AXIOVISION) do laboratório de Morfologia, do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP, Campus de São José do Rio Preto, SP.

## 2. ESPÉCIES ANALISADAS



**Figura 1.** Machos adultos das espécies: a) *Antiteuchus tripterus*; b) *Euschistus heros*; c) *Mormidea quinqueluteum*; d) *Platycarenum umbractulatus*. Barras= 1 cm



**Figura 2.** Machos adultos das espécies: a) *Oebalus poecilus*; b) *Oebalus ypsilongriseus*; c) *Thyanta perditor*. Barras= 1 cm

## VIII. RESUMO

Os Heteroptera constituem um dos mais importantes grupos de insetos do ponto de vista econômico, pois a maioria, durante os estádios de ninfa e adulto, alimenta-se de plantações ou grãos armazenados para o consumo humano. As análises citogenéticas permitiram verificar que *Antiteuchus tripterus* possui um lobo composto (5/6), o qual pode estar envolvido na nutrição do lobo *harlequin*, evidência que pressões evolutivas ocorreram para a manutenção deste lobo, nesta espécie, o que demonstra a importância, desse lobo, para algumas espécies. Permitiram, ainda, verificar que todas as espécies apresentam sistema cromossômico do sexo XY e complemento cromossômico de  $2n= 14$  cromossomos. Além disso, as análises do comportamento nucleolar evidenciaram que há atividade metabólica diferenciada para os lobos 4, 5 e 6 em *Antiteuchus tripterus* e também em espécies não possuidoras do lobo *harlequin*, como *Platycarenum umbractulatus*, que apresentou marcações diferenciadas no lobo 5, a qual pode indicar a formação de espermatozoides não fecundantes. A espécie *Euschistus heros* não apresenta lobo *harlequin*, porém as análises da espermatogênese demonstraram que há diferenças significativas no tamanho das células dos lobos 4 e 6, os quais podem estar relacionados com a formação de espermátides não-fecundantes. Foi verificada a presença de corpos nucleolares na forma de “mushroom” nas espécies do gênero *Oebalus*, característica, ainda não descrita na literatura, além disso, foi observada, em *P. umbractulatus*, a presença de dois corpos escuros e dois mais claros, que podem demonstrar a participação dos cromossomos sexuais na formação e organização do nucléolo desta espécie. Assim, verifica-se a importância dessas análises para compreensão do cenário evolutivo da família Pentatomidae.

## IX. ABSTRACT

The Heteroptera are the most important group of insect related with economic importance, because the most of them, during ninfal stage and adult stage, feed in plantations or stored grains to the human consumption. The cytogenetical analyses permitted verify that *Antiteuchus tripterus* has a compound lobe (5/6), which should be involved in the nutrition of *harlequin* lobe, evidences that evolutionary pressures occurred for the maintenance of this lobe in this species, which shows the importance of this lobe for some species. The analyses also permitted to evidence that all species analyzed have XY sexual chromossomic systems and a chromossomic complement  $2n= 14$  chromosomes. Furthermore, the analyses of the nucleolar behavior showed there are different metabolic activities in the lobes 4, 5 and 6 in *Antiteuchus tripterus* and in the species without the *harlequin* lobe, as *Platycarenum umbractulatus*, also had different marcation in lobe 5, which can indicate the formation of non-fertilizing sperm. The species *Euschistus heros* do not have *harlequin* lobe, but the analyses of spermatogenesis showed that there are significant differences in cell size in the lobes 4 and 6, which may be related to the formation of non-fertilizing spermatids. It was verified the presence of nucleolar bodies with morphology like "mushroom" in the species of the genus *Oebalus*, feature not yet observed. Moreover was observed in *P. umbractulatus*, the presence of two dark bodies and two lighter, which may demonstrate the participation of sex chromosomes in the formation and organization of the nucleolus in these species. Thus, this present work shows the importance of such analyses for understanding the evolutionary scenario of the family Pentatomidae.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

**São José do Rio Preto, 18/02/2009**

Hederson Vinícius de Souza