

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Márcia Maria Urbanin Castanhole

**Espermatogênese e comportamento nucleolar
em machos de Heteroptera aquáticos**

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

São José do Rio Preto-SP
2009



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

Márcia Maria Urbanin Castanhole

Espermatogênese e comportamento nucleolar em machos de Heteroptera aquáticos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração em 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, SP.

Orientadora: Profa. Dra. Mary
Massumi Itoyama

São José do Rio Preto, SP
2009

Castanhole, Márcia Maria Urbanin.

Espermatogênese e comportamento nucleolar em machos de Heteroptera aquáticos / Márcia Maria Urbanin Castanhole. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

115 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. Comportamento nucleolar. 4. Hemíptera. 5. Heteroptera. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

“Dedico esse trabalho aos meus pais e minha orientadora que sempre me auxiliaram”.

*“Agradeço a Deus em primeiro lugar, aos meus pais, meu
namorado, parentes e amigos, por todo apoio e
companheirismo. Obrigada!”*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades e por ser o grande suporte em minhas caminhadas.

Aos meus pais, peças-chave da minha vida, pelo grande apoio, confiança, amor e dignidade. Obrigada por me ensinarem que nunca devemos ter medo e, sim coragem para podermos lutar e vencer. Tenho muito orgulho de tê-los como meus pais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, pela amizade, confiança, estímulo, compreensão e atenção. Agradeço à oportunidade de aprender e aperfeiçoar meus conhecimentos. Agradeço por ter acreditado em mim, me estimulado e chamado minha atenção quando necessário. Sua franqueza e transparência sempre foram motivos de minha grande admiração.

À minha família, amigos que sempre presenciaram minha vida e torceram por mim.

Ao meu irmão, Júnior, que de uma maneira ou de outra sempre torceu e torce por mim.

Às minhas avós, Aparecida e Josephina, por sempre rezarem por mim e pela minha felicidade.

Às minhas madrinhas, Vera e Marisa, por sempre acreditarem no meu potencial e me incentivarem a tentar.

Ao Cleiton, pelo carinho, amor, atenção e uma maneira alegre de sempre ver a vida. Por me ajudar a compreender que as coisas sempre podem melhorar.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Alves Costa, pela colaboração na identificação das espécies coletadas.

À Profa. Dra. Sônia Maria Oliani, pela disponibilização do seu laboratório e equipamentos para a captura das imagens.

Aos meus amigos da Pós-Graduação, que sempre estiveram presente nas minhas atividades, me incentivando e me auxiliando sempre que possível e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

Ao meu companheiro de coletas e pesquisa, Luis Lênin Vicente Pereira, pela sua espontaneidade e força de vontade.

Aos meus amigos de uma vida inteira, pela força, confiança e pelos grandes momentos que passamos juntos. Agradeço sempre por fazerem parte da minha vida.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Rosemar, Rosana, Silvinha e Gil, pela grande alegria, esforço e boa vontade em ajudar.

À coordenação e vice-coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos e Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela atenção e auxílio nas partes burocráticas e durante a representação discente no ano de 2008.

À Simone, secretária do Departamento de Biologia, por sempre ser tão prestativa.

À todos os meus amigos do laboratório que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho e pelos bons momentos vividos.

MUITO OBRIGADA!

*Escrevo sem pensar, tudo o que o meu inconsciente grita. Penso
depois: não só para corrigir, mas para justificar o que
escrevi.”*

Mário de Andrade

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	09
II. OBJETIVOS	21
III. CAPÍTULOS	23
Artigo 1. Cromatina heteropicnótica e atividade nucleolar na meiose e espermiogênese de <i>Limnogonus aduncus</i> (Heteroptera, Gerridae): uma NOR marcada servindo como modelo para o estudo do comportamento cromossômico.....	24
Artigo 2. Espermatogênese e comportamento nucleolar de espécies da família Gerridae (Heteroptera)	36
Artigo 3. Estudos citogenéticos da espermatogênese e caracterização nucleolar de espécies das famílias Veliidae e Notonectidae	57
IV. DISCUSSÃO GERAL	90
V. CONCLUSÕES	96
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
VII. ANEXOS	110
1. Material e Métodos	111
1.1. Obtenção e Armazenamento dos Insetos	111
1.2. Dissecação dos Insetos	111
1.3. Colorações	112
1.3.1. Orceína Lacto-Acética	112
1.3.2. Impregnação com Nitrato de Prata (HOWELL; BLACK, 1980, com modificações)	112
1.4. Análise das Lâminas	113
Resumo	114
Abstract	115

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Os Heteroptera, também conhecidos como percevejos verdadeiros, constituem o maior e mais diverso grupo de insetos com metamorfose incompleta. Eles são geralmente tratados como uma subordem dos Hemiptera e a maioria das famílias ocorrem em todos os continentes (exceto Antártica) e algumas ilhas. A sua antiga existência e, aparente adaptabilidade tem resultado sob o ponto de vista evolutivo, em extrema diversidade estrutural e biológica (SCHUH; SLATER, 1995).

Nenhum outro grupo de insetos possui tamanha diversidade com relação ao habitat, como os Heteroptera. Eles vivem como parasitas de pássaros e mamíferos, alimentam-se de todas as partes das plantas e de fungos, capturam outros artrópodes, vivem nas teias de aranhas, na água ou na sua superfície, com poucas espécies ocupando os oceanos. Eles podem ser fitófagos, predadores ou hematófagos (SCHUH; SLATER, 1995).

Pelo fato da maioria dos Heteroptera serem fitófagos, eles podem afetar diretamente os humanos, pois podem causar grandes danos às produções, por exemplo, de grãos que são utilizados para consumo ou remédio, podem afetar a cadeia alimentar, ou mesmo transmitir algumas doenças às plantas. A importância econômica de vários Heteroptera também envolve muitas espécies que são benéficas, pois consomem insetos destrutivos de várias plantas. Algumas espécies são ectoparasitas de humanos e animais domésticos e poucos transmitem sérias doenças aos humanos, como por exemplo, a doença de Chagas (SCHUH; SLATER, 1995).

Esses percevejos verdadeiros possuem, aproximadamente, 80 famílias: Acanthosomatidae, Aenictopecheidae, Aepophilidae, Alydidae, Anthocoridae, Aphelocheiridae, Aphyllidae, Aradidae, Belostomatidae, Berytidae, Canopidae, Ceratocombidae, Cimicidae, Colobathristidae, Coreidae, Corixidae, Cydnidae, Dinidoridae, Dipsocoridae, Enicocephalidae, Gelastocoridae, Gerridae, Hebridae, Helotrephidae, Hermatobatidae, Hydrometridae, Hyocephalidae, Hypsipterygidae, Idiostolidae, Joppeicidae, Largidae, Lasiochilidae,

Leptopodidae, Leptosaldinae, Lestoniidae, Lyctocoridae, Lygaeidae, Malcidae, Macroveliidae, Medocostidae, Megarididae, Mesoveeliidae, Microphysidae, Miridae, Nabidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, Ochteridae, Omanidae, Pachynomidae, Paraphynoveliidae, Pentatomidae, Phloeidae, Piesmatidae, Plataspidae, Pleidae, Plokiophilidae, Polychtenidae, Potamocoridae, Pyrrhocoridae, Reduviidae, Rhopalidae, Saldidae, Schizopteridae, Scutelleridae, Stenocephalidae, Termitaphididae, Tessaratomidae, Thaumastellidae, Thaumastocoridae, Tingidae, Urostylidae, Veliidae e Velocipedidae. Dentre essas, as famílias Aphelocheiridae, Corixidae, Gerridae, Hebridae, Hydrometridae, Mesoveeliidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, Pleidae e Veliidae, são as representantes aquáticas.

Heteroptera aquáticos pertencentes à família Gerridae, são conhecidos como animais de passadas largas, pois movimentam-se sobre a água usando simultaneamente as pernas medianas e posteriores. Vivem na superfície das lagoas, de córregos lentos, de pântanos, e de outras águas paradas. Podem mover-se muito rapidamente, até 1,5 m/s, na superfície da água. O comprimento do corpo é bastante variável, de 1,6 a 36 mm. Possuem pernas longas e o corpo é muito próximo do arredondado. Apresentam dieta insetívora, alimentando-se de pequenos insetos que eventualmente caem sobre a água. Seus ovos são depositados sobre objetos flutuantes (BORROR; DELONG, 1988). Os insetos da família Notonectidae, são comumente conhecidos como nadadores de costas, por nadarem ou saírem em disparada sobre suas costas. Além disso, eles são caracterizados por possuírem pernas posteriores adaptadas para a natação. As espécies da família Veliidae, são pequenos, gregários, predadores e, também, vivem na superfície de águas calmas (UESHIMA, 1979).

Os Heteroptera possuem cromossomos holocêntricos, isto é, não apresentam centrômero localizado, suas células meióticas não possuem estrutura cinetocóricas dispersa ao longo do cromossomo (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO; RUTHMAN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996). A atividade cinética é restrita aos finais dos cromossomos, ou seja, nas regiões teloméricas. Esses cromossomos são denominados telocinéticos, (MOTZKO; RUTHMAN, 1984; SCHRADER, 1935, 1940;

HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996) e, sendo assim, a terminalização dos quiasmas é presumido ocorrer (JOHN; KING, 1985). Porém há trabalhos que discutam esse assunto (JONES, 1987; SOLARI; AGOPIAN, 1987). Nesse grupo de cromossomos, a primeira divisão meiótica é reducional para os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais.

Nas células mitóticas dos cromossomos holocêntricos, os microtúbulos ligam-se em toda a extensão das cromátides-irmãs e na anáfase elas migram paralelamente e perpendicularmente aos pólos. Ultraestruturadamente, as placas cinetocóricas foram observadas cobrindo quase toda a superfície dos cromossomos mitóticos holocêntricos (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972).

Devido ao fato dos Heteroptera possuírem cromossomos holocêntricos, os fragmentos cromossômicos produzidos por radiação, por exemplo, são capazes de se fragmentar (HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961). Os fragmentos originados naturalmente também podem migrar regularmente para os pólos durante a anáfase e sobreviver por muitas gerações celulares. Fragmentação pode, portanto, levar facilmente ao aumento no número de cromossomos (JACOBS, 2004).

Os Heteroptera possuem, além dos autossomos, os cromossomos sexuais (sistemas simples ou múltiplos), os m-cromossomos, os univalentes e os cromossomos B. O comportamento meiótico desses cromossomos são altamente diferentes (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; PAPESCHI; MOLA, 1990; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; SUJA et al., 2000). Como regra, autossomos bivalentes são quiasmáticos, exceto para poucas espécies das famílias Saldidae (NOKKALA; NOKKALA, 1983); Nabidae (NOKKALA; NOKKALA, 1984a); Miridae (NOKKALA; NOKKALA, 1986a); Anthocoridae (NOKKALA; NOKKALA, 1986b) e Microphysidae (NOKKALA; GROZEVA, 2000) e os bivalentes em forma de bastão orientam-se axialmente e segregam-se pré-reducionalmente. Por outro lado, os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e comportam-se como univalentes na meiose dos machos. Eles dividem-se

equacionalmente na anáfase I e associam-se formando um pseudobivalente na meiose II. Entretanto, as ocorrências de pré-redução dos cromossomos sexuais foi encontrada em poucas espécies da família Tingidae (UESHIMA, 1979; GROZEVA; NOKKALA, 2001). Já os m-cromossomos, pequeno par de cromossomos, presentes em algumas famílias, são também aquiasmáticos, mas associam-se na primeira divisão e segregam-se pré-reducionalmente (PAPESCHI et al., 2003).

No sentido evolutivo, a meiose aquiasmática em Heteroptera pode ter origem em grupos ancestrais, assim algumas variações podem ter ocorrido nas características citológicas durante a evolução. O mais comum é a meiose semelhante a encontrada em Mycrophysidae, caracterizada por alinhamento lado a lado dos cromossomos homólogos, durante a prófase meiótica, arranjo não radial dos bivalentes na placa metafásica I e pareamento “touch-and-go” dos cromossomos X e Y no centro da placa metafásica II formando um pseudobivalente. Este tipo de meiose foi encontrado em Anthocoridae (NOKKALA; NOKKALA, 1986b) e Saldidae (NOKKALA; NOKKALA, 1983). A meiose em Nabidae difere ligeiramente, mas distintamente mostrando pareamento distante em vez de “touch-and-go” dos cromossomos X e Y na placa metafásica II (NOKKALA; NOKKALA, 1984a). O terceiro tipo de meiose difere dos outros, pois os cromossomos homólogos neste tipo de meiose não são fisicamente alinhados ao longo do comprimento inteiro durante a prófase, mas apresentam-se fisicamente associados em um ou dois sítios via “collochores”. Meiose deste tipo foi descrita em Miridae, mas provavelmente pode ser encontrada, também, em Cimicidae (NOKKALA; NOKKALA, 1986a). Estas características citogenéticas fornecem uma ferramenta vantajosa para explorar as relações evolutivas de taxa afins na infra-ordem Cimicomorpha.

Os cromossomos B são supranumerários ou membros adicionais de um grupo cromossômico, não essencial para a célula ou indivíduo, mas, possivelmente prejudicial, pelo menos se presente em grande número. Eles são reconhecidos como tais porque aparecem em alguns indivíduos, em algumas populações, de uma determinada espécie causando polimorfismo cromossômico.

Cromossomos B foram encontrados em inúmeras espécies de plantas e animais em uma diversidade de grupos. Eles formam um grupo altamente heterogêneo, pois podem apresentar diferentes tamanhos e variar grandemente na quantidade de heterocromatina e estabilidade mitótica. Vários autores consideram os cromossomos B como parasitas ou egoístas (NOKKALA; NOKKALA, 2004).

Um outro tipo de cromossomo encontrado no genoma de Heteroptera é o m-cromossomo (microcromossomo), como já mencionado anteriormente. Wilson (1905) introduziu o termo m-cromossomo para descrever o pequeno par de cromossomos em Hemiptera com comportamento diferente dos autossomos e dos cromossomos sexuais durante a meiose. Em Heteroptera foram primeiramente descritos nos Coreidae por Paulmier (1899). Subsequentemente foram encontradas em outras espécies das infra-ordens Nepomorpha, Leptopodomorpha e Pentatomomorpha (UESHIMA, 1979; GROZEVA; KUZNETSOVA, 1989).

Os m-cromossomos geralmente não estão pareados durante o início da prófase meiótica I, mas na diacinese eles se pareiam. Na metáfase I eles estão sempre associados formando o pareamento “end-to-end” ou “touch-and-go” como um pseudobivalente com segregação reducional na anáfase I. Na metáfase I os cromossomos autossomos arranjam-se em círculo e o m-pseudobivalente localiza-se no centro e o cromossomo X, geralmente, encontra-se fora do círculo formado pelos autossomos. Os m-cromossomos segregam-se equacionalmente na segunda divisão meiótica, assemelhando-se aos bivalentes autossômicos (BRESSA et al., 2001).

Com relação aos cromossomos univalentes, todos os autossomos podem apresentar essa característica. No paquíteno tardio são observados como cromossomos não pareados ou segmentos não pareados. No diplóteno os univalentes são encontrados separados e eles continuam separados até o final da prófase. Na metáfase I os dois univalentes localizam-se no centro do anel dos autossomos bivalentes e dividem equacionalmente na anáfase I. Na metáfase II associam-se em um pseudobivalente, o qual geralmente localiza-se no centro do

anel bivalente. Na anáfase II o pseudobivalente divide-se reducionalmente (MOLA; PAPESCHI, 1993).

A presença de autossomos univalentes pode ser devido à falha na formação primária do complexo sinaptonêmico no zigóteno (assinapse) ou falha na formação de quiasma seguido de sinapse normal (disinapse) (BRESSA et al., 2001). Segundo Nokkala (1986a,b) aparentemente, a ocorrência de univalentes é devido à falha na formação de “collochores” entre os cromossomos homólogos.

Os cromossomos univalentes podem originar-se nas espécies por uma variedade de causas, tais como, genotípicas ou ambientais, contudo, não se sabe qual é a principal. Em geral, esta é a dificuldade para estabelecer se os univalentes observados na metáfase I resultam de uma assinapse ou disinapse no início da prófase I (RILEY; LAW, 1965; PAPESCHI; MOLA, 1990; BRESSA et al., 2002).

Os Heteroptera apresentam algumas particularidades com relação ao comportamento meiótico. No leptóteno-zigóteno o cromossomo X é positivamente heteropicnótico e localiza-se na periferia do núcleo. No zigóteno e paquíteno, os cromossomos estão emaranhados. Após o diplóteno, as células aumentam de tamanho e o núcleo assemelha-se com o estágio interfásico, sendo denominado de estágio “difuso”. 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 (BRESSA et al., 2002).

O número de autossomos em Heteroptera varia de quatro (Belostomatidae) a 80 (Miridae), mas estes números não são típicos para a subordem (UESHIMA, 1979). É difícil de dizer qual é o número cromossômico modal para a subordem inteira, pois todas as infra-ordens (Cimicomorpha, Dipsocoromorpha, Enicocephalomorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha,

Nepomorpha, Pentatomorpha) dentro dos Heteroptera foram estudadas citogeneticamente na mesma extensão (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Com relação aos sistemas cromossômicos do sexo há o simples, XY/XX (74,7% das espécies) e X0/XX (14,8%), e o múltiplo (originados por fragmentação do cromossomo X e, menos frequentemente, do cromossomo Y, X_n0/X_nX_n, X_nY/X_nX_n e XY_n/XX, 10,3%) (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984). Há, ainda, um sistema particular neo-XY, 0,2% (CHICKERING; BACORN, 1933; SCHRADER, 1940; JANDE, 1959).

A família Gerridae é caracterizada por possuir sistema cromossômico do sexo X0, disposição cromossômica em anel na metáfase meiótica e ausência de m-cromossomos. Apresentam, ainda, cromossomos holocêntricos, divisão pré-reducional dos autossomos e pós-reducional dos cromossomos sexuais. O número cromossômico modal é de 2n= 21 (20A + X0) ou 2n= 23 (22A + X0) cromossomos (UESHIMA, 1979).

Segundo Ueshima (1979) somente 12 espécies e 2 gêneros pertencentes à família Notonectidae, foram analisadas citogeneticamente. O gênero *Anisops* (Anisopinae) é caracterizado por apresentar sistema cromossômico do sexo X₁X₂0, um par de m-cromossomos e número diplóide (2n) de cromossomos de 26 para o macho e 28 para a fêmea. Espécies do gênero *Notonecta* (Notonectidae) analisadas possuem sistema cromossômico do sexo X0 ou XY e 2n= 24 (20A + 2m + XY) ou 2n= 26 (22A + 2m + XY) cromossomos.

As espécies da família Veliidae, *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata*, apresentam 2n= 21 (20A + X0) cromossomos (COBBEN, 1968), e as espécies *Velia currens* (POISSON, 1936) e *V. sp.* (UESHIMA, 1979) apresentam 2n= 25 (24A + X0) cromossomos. Enquanto todas as espécies têm sistema cromossômico do sexo X0, Takenouchi e Muramoto (1971) relataram o sistema cromossômico do sexo XY para *Microvelia douglasi*, contudo novos estudos deverão ser realizados para confirmação (UESHIMA, 1979).

Uma das mais importantes questões relacionadas à evolução cariotípica em Heteroptera é o problema dos diferentes sistemas cromossômicos do sexo. A questão básica relacionado à evolução dos sistemas cromossômicos do

sexo em Heteroptera é a dúvida de qual sistema é o ancestral, X0 ou XY. O sistema mais comum em Heteroptera é o XY, mas ao mesmo tempo o taxa mais primitivo em Heteroptera tem, principalmente, o sistema X0 (UESHIMA, 1979). O sistema X0 é mais comum em insetos das ordens primitivas Odonata, Orthoptera e Psocoptera (WHITE, 1973). Este sistema prevalece, também, na ordem Homoptera juntamente com Heteroptera (HALKKA, 1959; KIRILLOVA, 1986, 1987). Segundo Ueshima (1979) acredita-se que o sistema XY evoluiu do sistema X0, em Heteroptera, mas ele reconhece que a informação disponível é rica nas espécies avançadas e muito pobre, nos táxons primitivos (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Uma proposta alternativa foi feita por Nokkala (1983) com base na descoberta de um cromossomo Y em uma espécie de *Saldula* (Saldidae) pertencendo a um dos mais primitivos taxa de Heteroptera. Nokkala e Nokkala (1984b) observando espécies de Tingidae verificaram que *Dictyonota tricornis* não possui cromossomo Y (X0) e isto seria um indicativo de que houve perda deste cromossomo. Portanto, a perda deste cromossomo, em *D. tricornis*, deve ter ocorrido posteriormente, pois outras espécies de *Dictyonota* (*D. fuliginosa*) possuem este cromossomo.

Enquanto a presença do sistema neo-XY é uma característica comum em outros insetos com cromossomos holocêntricos tais como Odonata (MOLA; PAPESCHI, 1993), em Heteroptera, está quase que ausente. Até a última revisão em 2003 realizada por Papeschi et al., o sistema neo-XY foi observado somente em *Lethocerus* (Belostomatidae) (CHICKERING; BACORN, 1933; JANDE, 1959), *Rhytidolomia senilis* (Pentatomidae) (SCHRADER, 1940), *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) (BRESSA et al., 1999) e *Cacopsylla peregrina* (Frst) (Psylloidea, Homoptera) (NOKKALA et al., 2003). Em Belostomatidae e Pentatomidae foi sugerido que a fusão de ambos os cromossomos, X e Y, ancestrais com um par de autossomos tenha ocorrido originando um sistema particular neo-XY (BRESSA et al., 1999). O trabalho de Bressa et al. (1999) corrobora a hipótese de Ueshima (1979), assim o sistema neo-XY teria evoluído do sistema X0 ancestral (BRESSA et al., 1999).

Segundo Nokkala et al. (2003), o sistema neo-XY teria derivado do sistema X0 por fusão do cromossomo X com um autossomo, resultando no cromossomo neo-X e o homólogo é transformado em cromossomo neo-Y. A presença do sistema neo-XY foi revelada pela presença de um cromossomo sexual bivalente, quiasma heteromórfico na meiose de machos e uma diminuição no número de autossomos no cariótipo. Estas características são também típicas para sistema neo-XY em Psylloidea com somente poucas exceções.

Além de todas as características anteriormente mencionadas, os Heteroptera aquáticos são, ainda, muito importantes economicamente, pois podem ser utilizados para bio-monitorar a poluição do ar por metais pesados (STEINNES, 1989). Muitos invertebrados aquáticos podem acumular cádmio e outros metais pesados, pois eles são relativamente insensíveis a estas substâncias (SPEHAR et al., 1978). Apesar da importância destes organismos, eles são pouco utilizados como bioindicadores, pois não são coletados em grandes quantidades e há necessidade de taxonomistas bastante experientes (NUMMELIN et al., 1998). Entretanto, há outras vantagens como, por exemplo, a de que apesar de possuírem asas, não se dispersam por longas distâncias (FAIRBAIRN, 1986). Segundo Nummelin et al. (1998) parece que há uma tendência das fêmeas possuírem uma maior quantidade de metais pesados do que os machos, o que é justificado pela maior necessidade de energia pelas fêmeas para a produção de ovos.

Uma estrutura que vem sendo bastante estudada pelos citogeneticistas é o comportamento nucleolar durante as divisões mitóticas ou meióticas. Sabe-se que o tamanho do nucléolo está relacionado com a atividade biossintética da célula, portanto, o seu tamanho, a sua quantidade e a presença de corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e podem refletir, então, em diferenças metabólicas e funcionais (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; SOUZA et al., 2007a, b). A persistência do nucléolo e dos corpos pré-nucleolares observados através da meiose de *Dysdercus imitator* (BRESSA et al., 2003) pode então estar relacionado com a intensa atividade sintética a fim de produzir RNAr necessário para a espermatogênese.

Entretanto, a possibilidade que a alta taxa de transcrição de RNAr possa estar relacionado a outros fatores não pode ser descartado (BRESSA et al., 2003).

Na maioria das espécies de artrópodos, os nucléolos dissociam-se no diplóteno ou diacinese. Portanto, os corpúsculos impregnados pela técnica Ag-NOR, específica para proteínas associadas ao RNAr, não são visíveis da metáfase à telófase I. Essas marcações vão reaparecer no início da formação das espermátides, indicando o reinício das funções transcricionais de RNA ribossomal e, finalmente, desaparecem no final da formação das espermátides (BRESSA et al., 2003). Entretanto, a literatura relata algumas exceções. Em *Asellus aquaticus* (Isopoda), os corpúsculos Ag-NOR foram visualizados durante todo o processo de espermatogênese (DI CASTRO et al., 1983). Em *Callicrania seoanei* (Orthoptera), as RONS foram observadas da intercinese até a pró-metáfase II (SANTOS et al., 1987) e em *Triatoma infestans* e *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), as marcações Ag-NOR estavam presentes até a metáfase I (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Finalmente em *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae) a semi-persistência nucleolar (presença de corpúsculos nucleolares durante as metáfases) foi observada até a metáfase II (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995), enquanto em *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) e *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae), os nucléolos foram detectados nas placas metafásicas de espermátocitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947).

A observação do material nucleolar durante a mitose de diferentes organismos mostrou que as proteínas que o compõem comportam-se de três modos, quando os corpúsculos nucleolares deixam de ser visíveis: um grupo dessas proteínas permanece associado com as regiões organizadoras nucleolares; outro grupo se localiza na periferia dos cromossomos, onde permanece desde a prófase tardia até a telófase inicial e um terceiro grupo de proteínas e também RNAs ficam uniformemente distribuídos no citoplasma entre a prófase e a telófase (OCHS et al., 1985; FAKAN; HERNANDEZ-VERDUN, 1986; FISCHER et al., 1991; WACHTLER; STAHL, 1993; SCHWARZACHER; WACHTLER, 1993; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1995; DUNDR et al., 1997).

Denominam-se regiões organizadoras nucleolares (RONs) às regiões cromossômicas com as quais os nucléolos se associam e que são responsáveis por sua formação. A RON é o sítio do DNA ribossômico, onde é transcrito o RNAr (MCCLINTOCK, 1934; BROWN; GURDON, 1964; PERRY, 1965).

O número e a localização das RONs são conhecidos em poucas espécies de Heteroptera, tendo sido determinados por diferentes técnicas citogenéticas. Todas as espécies descritas apresentaram uma única região organizadora nucleolar (RON) localizada na posição média ou subterminal de um autossomo ou de um cromossomo sexual (CAMACHO et al., 1985; FOSSEY; LIEBENBERG, 1995; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; PAPESCHI; BRESSA, 2002; PAPESCHI et al., 2003; CATTANI et al., 2004).

Em Belostomatidae, as RONs foram descritas nos telômeros dos cromossomos sexuais X e Y, (*Belostoma oxyurum* e *B. micantulum*), ou na região telomérica de um autossomo (*Belostoma elegans*) (PAPESCHI; BRESSA, 2002). Nos Coreidae, uma única RON está presente na região intersticial do maior autossomo de *Pachylis argentinus* (PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica de um autossomo em *Carlisi wahlbergi* (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995) e *Spartocera fusca* (CATTANI; PAPESCHI, 2004). Nos Pentatomidae, uma única RON foi detectada na região telomérica de um autossomo em *Edessa meditabunda* (REBAGLIATI et al., 2003), na posição mediana do maior autossomo em *Nezara viridula* (CAMACHO et al., 1985; PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica do cromossomo X em *Graphosoma italicum* (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996).

Outro aspecto observado em Heteroptera é a presença do material nucleolar na bainha pericromossômica, nas metáfases e anáfases, de *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae, Heteroptera) (SOUZA et al., 2007a). Esse tipo de distribuição havia sido descrito somente para os cromossomos mitóticos em plantas (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1993; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1995).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Pelas características anteriormente mencionadas de número variável de cromossomos, poucos trabalhos relacionados com a citogenética (comportamento meiótico e nucleolar), o objetivo geral, do presente projeto foi o de ampliar conhecimentos do comportamento meiótico, que permitam melhor conhecer a biologia dos Heteroptera aquáticos.

Os nossos objetivos específicos foram:

- a) Analisar os testículos com relação à morfologia e o número de lobos das espécies das famílias Gerridae (*Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris*, *Halobatopsis platensis*, *Limnogonus aduncus*), Veliidae (*Rhagovelia whitei*, *Rhagovelia* sp.) e Notonectidae (*Martarega* sp.);
- b) Analisar detalhadamente a espermatogênese (comportamento meiótico e espermiogênese), através do esmagamento dos testículos de machos adultos corados com orceína lacto-acética;
- c) Analisar o comportamento nucleolar das espécies, durante a espermatogênese, através da impregnação pelos íons prata;
- d) Estabelecer parâmetros comparativos entre as espécies trabalhadas.

III. CÁPITULOS

ARTIGO 1

Cromatina heteropicnótica e atividade nucleolar na meiose e espermiogênese de *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): uma NOR marcada servindo como modelo para o estudo do comportamento cromossômico

Márcia Maria Urbanin Castanhole, Luís Lênin Vicente Pereira, Hederson Vinicius Souza, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Luis Antônio Alves Costa, Mary Massumi Itoyama. UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Resumo: Os machos de *Limnogonus aduncus* analisados no presente trabalho apresentaram sistema cromossômico do sexo X0 e número diplóide de cromossomos $2n= 23$ (22A + X0). As observações realizadas nas células meióticas de *L. aduncus*, após coloração comorceína lacto-acética e impregnação com íons prata mostraram as modificações que ocorrem, ao longo da meiose e da espermiogênese, com relação à cromatina heteropicnótica e ao material nucleolar. Foi possível verificar também que essas estruturas ocorrem nas mesmas posições nucleolares e podem ser vistas até quase ao final da espermiogênese. A impregnação com nitrato de prata permitiu visualizar marcação indicativa da região organizadora nucleolar (RON), raramente observada nos Heteroptera. Na espécie analisada a marcação ocorre em um só membro do par de autossomos. Foi possível, também, observar que, na anáfase, a extremidade cromossômica que contém a RON marcada é aquela através da qual o cromossomo é puxado para o pólo. Embora os cromossomos dos Heteroptera sejam holocinéticos, a literatura discute a possibilidade de que apenas uma ou ambas as extremidades apresentem atividade cinética. Como essa questão encontra-se, ainda, em aberto, esse é mais um dado para solucioná-lo. A seguir encontra-se o artigo na íntegra, publicado pela revista Genetics and Molecular Research.



Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior

M.M.U. Castanhole¹, L.L.V. Pereira¹, H.V. Souza¹,
H.E.M.C. Bleudo¹, L.A.A. Costa² and M.M. Itoyama¹

¹Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil
²Museu Nacional, Departamento de Entomologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

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

Genet. Mol. Res. 7 (4): 1398-1407 (2008)
Received October 6, 2008
Accepted October 15, 2008
Published December 16, 2008

ABSTRACT. Males of *Limnogonus aduncus* were found to have the sex chromosome system X0 and chromosome number $2n = 23$ ($22A + X0$). Testis cells were stained with lacto-acetic orcein and silver nitrate so that changes in the morphology and degree of staining of the heteropicnotic chromatin and the nucleolar material could be observed during meiosis and spermiogenesis. These structures share the same nuclear position and could be seen until almost the end of spermiogenesis. A chromosome region stained with silver ni-

trate was indicative of a nucleolar organizing region (NOR), which is rarely detected in Heteroptera with this technique. The NOR is located at one end of a single member of an autosome pair. The finding of this stained region enabled us to observe that the telomeric association of sister chromatids that characterizes the Heteroptera does not include the chromosome ends, where NORs are located; we also observed in anaphase that the chromosome end through which it is pulled to the pole is the one containing the NOR. Another observation was that the single nucleolar body present in the cells at anaphase never goes to the cell pole that does not receive the NOR. We conclude that *L. aduncus* is a good model for cytogenetic studies involving nucleolar activity and also may be useful for studying the mechanisms of activation and inactivation of kinetic activity at the chromosome ends. Although the chromosomes of Heteroptera are known to be holocentric, whether kinetic activity is restricted to one or involves both chromosome ends is still not well understood.

Key words: Stained nucleolar organizing region; Aquatic insects; Telomeric association; Kinetic activity of the chromosome ends

INTRODUCTION

The Heteroptera is a numerically large and highly diverse group of insects. About 40,000 species from this suborder have been described, many of which are pests of food and are often economically important. These insects are highly variable cytogenetically. Chromosome numbers vary from 4 to 80, and the mechanisms of sex determination are simple (XY/XX or X0/XX), multiple (Xn0/XnXn, XnY/XnXn and XYn/XX) or a neo-XY system (Chickering and Bacorn, 1933; Schrader, 1940; Jande, 1959; Ueshima, 1979; Manna, 1984). The chromosomes are holocentric. In meiosis, which is achiasmatic or chiasmatic, the autosomes go through a pre-reductional division, while in the sex chromosomes division is post-reductional. The karyotype may include microchromosomes, B chromosomes or univalent chromosomes (Ueshima, 1979; Manna, 1984; Papeschi and Mola, 1990; González-García et al., 1996; Grozeva and Nokkala, 1996; Suja et al., 2000; Nokkala and Nokkala, 2004). Nucleolar organizer regions (NORs) have been detected in a small number of species; in all cases their location was subterminal or median, occurring in a single pair of autosomes or in the sex chromosomes (Camacho et al., 1985; Fossey and Liebenberg, 1995; González-García et al., 1996; Papeschi and Bressa, 2002; Papeschi et al., 2003; Rebagliati et al., 2003).

Limnogonus aduncus, a member of the Gerridae family of Heteroptera, are surface-skimming aquatic insects. Cytogenetic information on the Gerridae is scarce. However, it is known that they are characterized by modal diploid chromosome numbers of 21 (20A + X0) or 23 (22A + X0), sometimes including microchromosomes (Ueshima, 1979). The X0 sex chromosome system predominates among species in this family, but there are some species with an XY system. In a polar view, the metaphase chromosomes seem to be arranged in a ring shape, at the equatorial region. Information regarding morphological

variation of heteropiconotic chromatin and nucleolar pattern during spermatogenesis was until now unavailable for the Gerridae family.

MATERIAL AND METHODS

Twenty specimens classified as *L. aduncus* were collected from the Municipal reservoir of São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil, using a net. The specimens were transported in flasks with water to the laboratory and separated by sex, and the 13 males were fixed in methanol:acetic acid (3:1) and kept at 4°C. The preparations were done by crushing the testes of each insect on a slide, followed by staining with the usual lacto-acetic orcein technique or with silver nitrate impregnation (Howell and Black, 1980), which preferentially stains the nucleolar material. Sequential staining using both techniques was tried without success, no matter which technique was used first. The images were captured on a Zeiss microscope using the AXIO VISION program for image analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Some Heteroptera are characterized by multilobed testes wrapped in a reddish membrane. This characteristic is common in the Pentatomidae family, in which the standard number is seven lobes. Variations may occur, such as in *Antitheticus tripterus*, which has six lobes (Souza et al., 2007a). We found that *L. aduncus* (Gerridae) also has multilobed testes. Two elongated lobes, wrapped in a transparent membrane, were found. The male sex chromosome system of *L. aduncus* is XO and its chromosome complement is $2n = 23$ ($22A + X0$). This number of chromosomes and the sex chromosome system were also detected in another species of the same genus, *L. fossarum* (Banerjee, 1958).

Preparations stained with lacto-acetic orcein

Polyploid nutritive cells of *L. aduncus* testes had more than 100 heteropiconotic chromatin bodies heavily stained by orcein (Figure 1a). In spermatogonial cells at the beginning of prophase I (leptotene), a single strongly stained region was observed, probably formed by the sex chromosomes, which remain condensed until pachytene (Figure 1b-d). Terminal or interstitial chiasmata were detected in diplotene and diakinesis (Figures 1e-l, 2a). One of the chromatids of the largest autosome pair showed telomeric association with a chromatid of another pair; this could be seen until the end of prophase I (Figure 1e-i). Another autosome pair showed a constriction that remained visible until diplotene (Figure 1e, f). After diplotene, the cells enter the diffuse stage, greatly increasing the nucleus size and decreasing chromatin condensation (Figure 2b).

As known from other Heteroptera, in a polar view, cells of *L. aduncus* males at metaphase I show the autosomes arranged in a ring shape, with the sex chromosomes located in the internal part, while in a lateral view they appear vertically aligned in the equatorial region of the cell (Figure 2c). The metaphase chromosomes of *L. aduncus* form interconnected chromosome groups joined by chromatin threads (Figure 2d). Telophase cells are large and show abundant chromatin with a network aspect. There are two major heteropiconotic formations interspersed in this background, one at each cell pole (Figure 2e).

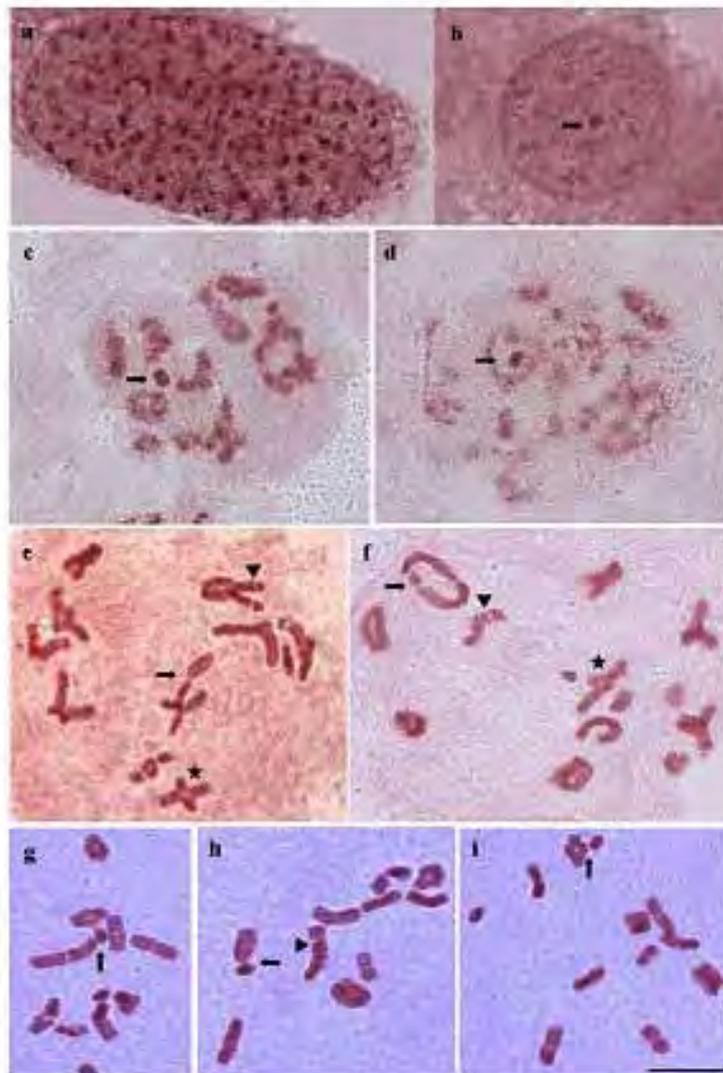


Figure 1. Cells of the seminiferous tubules of *Limnogonus aduncus* stained with lacto-acetic orcein. (a) Nutritive polyloid cell showing many heteroploidic regions, (b) prophase I (leptonema) with a relocated heteroploidic region (arrow), (c,d) cells in pachynema showing a halo around the single heteroploidic region (arrows), (e-l) diplotene: a constriction is observed in an autosome pair (arrowhead e, f, h), two autosomes are in telomeric association (arrow, e-l) and an autosome shows an interstitial chiasma (asterisk, e, f). Bar: 10 μ m.

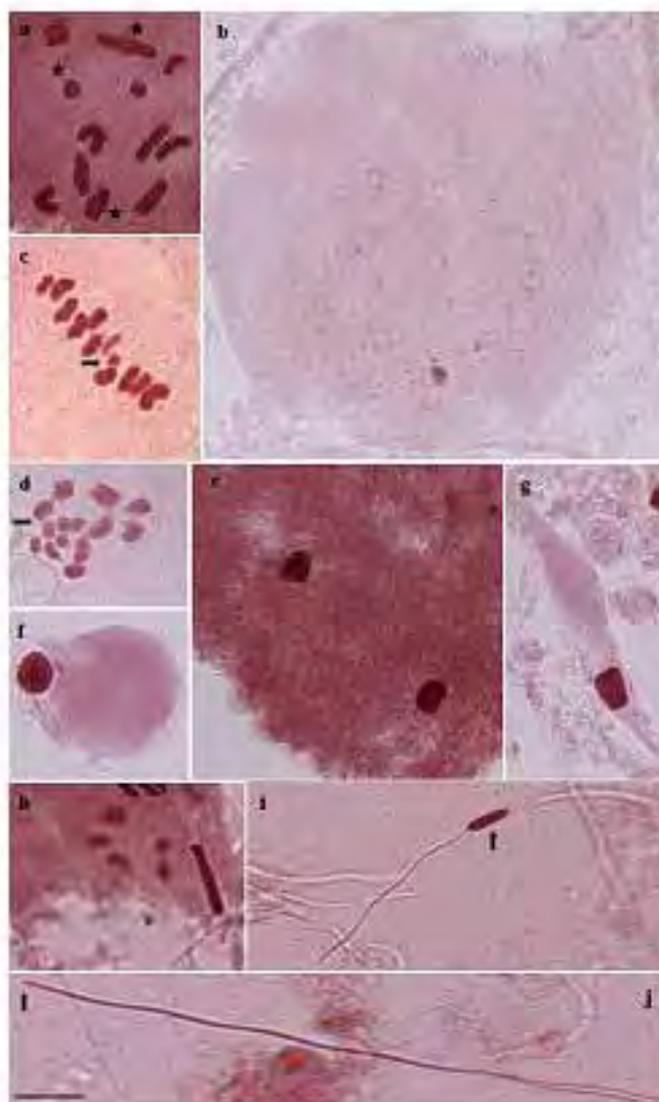


Figure 2. Cells of the seminiferous tubules of *Limnogonus adansoni* stained with lacto-acetic orcein. (a) Cell in diakinesis showing terminal or interstitial chiasmata (asterisks); (b) cell in diffuse stage; (c) metaphase I showing the II autosomes and the X chromosome (arrow); (d) metaphase I: chromosomes joined by chiasmata (arrow); (e) cell in telophase with two major heteroploid regions; (f) rounded spermatid showing a large heteroploid region located at the nucleus edge; (g) spermatid in elongation; note the change in morphology of the heteroploid material; (h) rod-shaped spermatid with strong staining; (i) spermatid head with heteroploid material located in the posterior region (arrow); (j) spermatid in elongation (arrow indicating the region of the head). Bar: 10 μ m.

At the end of the meiotic process, the round spermatids carry a single heteropicnotic formation, located at the nucleus edge (Figure 2f). As the spermatid nucleus elongates, this heteropicnotic material also assumes an elongated shape, which is seen in the posterior region of the spermatid head (Figure 2g). In a later stage, the spermatid heteropicnotic region is rod shaped (Figure 2h). During development, this region stands out within the head of the spermatids, due to its diameter (Figure 2i). Almost at the end of the spermiogenesis process, the spermatids have small head and a long tail, and the heteropicnotic region is no longer visible (Figure 2j).

Preparations impregnated by silver ions

Nuclei of the nutritive polyploid cells of the testes had many regions impregnated by silver ions, indicating that they are made of nucleolar material (Figure 3a). Some of them were markedly larger, but this may be due to the joining of smaller formations. The spermatogonial cells at the beginning of prophase show two nucleoli of very different sizes, one of them being about eight times the size of the other (Figure 3b).

In some organisms, silver impregnation stains not only the nucleolus, but also NORs, located at specific points of certain chromosomes. The stained NORs are those that were active during the previous interphase. The reason why these regions are silver stained in some organisms and not in others is still unknown. Silver-stained NORs have been rarely observed in Heteroptera species, but in *L. aduncus*, between diplotene and diakinesis, we start to see a terminal NOR in both sister chromatids of a single homologous chromosome of an autosome pair (Figure 3c-g). This pattern of NOR staining has been observed in some species of the Heteroptera families, Coreidae (Fossey and Liebenberg, 1995; Papeschi et al., 2003; Cattani et al., 2004), Pentatomidae (Camacho et al., 1985; Gonzalez-Garcia et al., 1996; Rebagliati et al., 2003) and Belostomatidae (Papeschi and Bressa, 2002).

At the beginning of metaphase I, the NOR is more strongly stained (Figures 3g,h, 4a). Data on other organisms, available in the literature (Bardella et al., 2008), support the hypothesis that in *L. aduncus* the NOR of a single chromosome member of the pair is active in the interphase. Also on the basis of data in the literature (Lanzone and Souza, 2006), we believe that the chromosome pair, which shows the constriction, is the same pair that in Heteropteran genus *Antitrichus* carries the NOR.

Several studies have provided evidence that during meiotic division of Heteroptera the kinetic activity is restricted to the ends of the chromosomes (Schrader, 1935; Hughes-Schrader and Schrader, 1961). Camacho et al. (1985) observed a bivalent monochiasmatic chromosome of *Nezara viridula* (Pentatomidae); they concluded that only the chromosome end farthest from the chiasma has kinetic activity. On the other hand, Pérez et al. (1997) observed in *Triatoma infestans* that both ends of the bivalent 3 have kinetic activity and that, in different metaphases, the kinetically active end varies; they also mentioned that even the end closest to chiasmata shows kinetic activity. A problem that arises from these observations on the kinetic activity of the chromosome ends is that the mechanism that determines whether they are active is unknown (Pérez et al., 1997).

The stained NOR of *L. aduncus* enabled us to observe that although the two chromatids of the same chromosome show telomeric association with each other in metaphase and anaphase I (telomeric association is also a feature of the other Heteroptera), this association does not occur in the chromatid end carrying NOR. The end carrying NOR was only observed directed towards one of the cell poles, seeming to be the end at which the sister chromatids

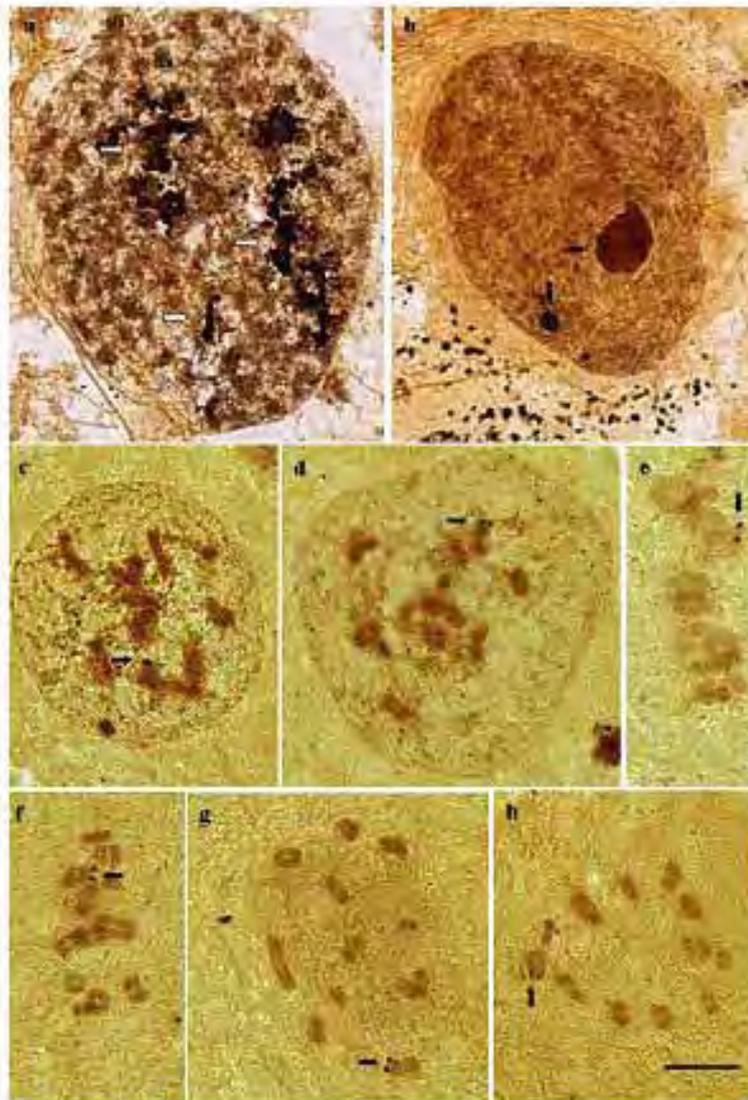


Figure 3. Cells of the sensitive fromoblasts of an adult *L. longipalpis* impregnated with silver nitrate. (a) Nutritive polyloid cell showing many impregnated regions (arrows), (b) initial prophase (leptonema) with two nucleolar bodies of different sizes (arrows), (c-g) cells in different stages of prophase following the nucleolar organizing region stained in an autosome (arrows), (h) cells in the final stage of prophase also showing the stained NOR (arrow). Bar: 10 μ m.

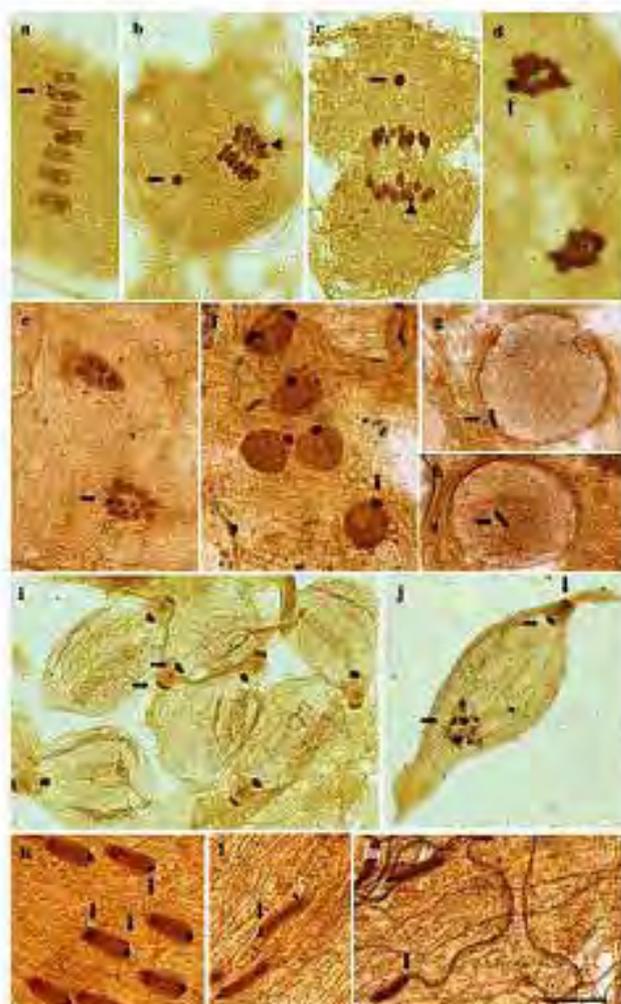


Figure 4. Cells of the seminiferous tubules of an adult *Leucophaea aduncus* impregnated with silver nitrate: (a) Metaphase I in side view showing an aurosome with a stained NOR (arrow) and the telomeric association of chromatosomes. (b,c) Anaphase I with a nucleolus (arrow) present in the daughter cell that did not receive the chromosome with the stained NOR (arrowhead). (d,e) telophase: a nucleolus is present only in one daughter cell (arrow). (f) rounded spermatid with a nucleolus located at the nucleus edge (arrow). (g, h) spermatid with elongate nucleolus (arrows). (i) spermatid with three silver stained formations inserted in a less strongly silver stained region, located in the posterior region of the head (arrows). (j) silver impregnated bodies in the anterior region of the spermatid head (arrow) and maintenance of the nucleolar structure located in the posterior region of the head (arrows); (k-m) spermatid in elongation, at the beginning showing staining in both the posterior and anterior regions of the head; as the development proceeds, the staining becomes restricted to the posterior region (arrows). Bar: 10 μ m.

are linked to the spindle fibers to be pulled to the poles. Thus, at least for this NOR-bearing chromosome, apparently only one chromosome end presents kinetic activity. Whether there is any association of the kinetic activity with NOR was not resolved in our study.

At the onset of anaphase I, we found only one nucleolar body in the cell (Figure 4b,c), which we also saw at telophase (Figure 4d,e). After migration of chromosomes to the cell poles, the nucleolus was always present at the pole that did not receive the chromosome pair carrying NOR (Figure 4c). So, apparently, the cell that does not receive the nucleolus is the one able to synthesize it through the active NOR. These observations suggest an imprinting process in NOR activity, a possibility that deserves further study.

At the beginning of spermiogenesis, the round spermatids show the single nucleolus located in the periphery of the nucleus (Figure 4f). As the process proceeds, the nucleolus elongates and locates at one of the nucleus poles (Figure 4g,h). As spermatid lengthening continues, there is a change in the nucleolus morphology, as if the nucleolar structure had been divided into three formations that appear included in a weakly silver-impregnated region. Two of the three formations are located at the ends of this region, and the third is in the intermediate space. The intermediate formation is less intensely stained than the other two. This entire nucleolar structure is located in the posterior region of the sperm head (Figure 4i). As the differentiation proceeds, several silver impregnated bodies are also observed in the anterior region of the sperm head (Figure 4j). In the final stages of spermiogenesis, the anterior region of the sperm head shows less stained nucleolar material, while a more strongly stained body is seen in its posterior region (Figure 4k-m). Silver-stained nucleolar material occurring in the sperm head has also been described in the Heteropteran families, Lygaeidae and Pentatomidae (Souza et al., 2007a,b).

Although we were not successful in the attempt to use both lacto-acetic orcein and silver impregnation sequentially, it was possible to observe by image comparison that the locations of the heterochromatin and the nucleolar material coincide. This is quite visible in the figures of the spermatids: Figures 2f (orcein) and 4f (silver nitrate) and Figures 2g (orcein) and 4j (silver nitrate). A halo is seen around heteropiconotic bodies in Figure 1c,d; a similar structure observed in *Triatoma* species was shown to be nucleolar material (Severi-Aguiar et al., 2006). The close approximation of heterochromatin and NORs is well known in the literature and reflects functional interaction of these structures. This proximity involves, among other phenomena, the mediation of the activity of rDNA genes (Santoro et al., 2002). In *Triatoma vitticeps*, the coincident locations of these structures were also described in testes (Severi-Aguiar et al., 2006). We conclude that *L. adoniensis* could be used as a model for cytogenetic studies.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to Dr. Sonia Maria Oliani of the Department of Biology, IBILCE/UNESP for allowing us to use the image system of her laboratory, and to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

REFERENCES

- Banerjee MK (1958). A study of the chromosomes during meiosis in twenty-eight species of Hemiptera (Heteroptera). *Genetics and Molecular Research* 7 (4): 1398-1407 (2008) ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

- Hemiptera). *Proc. Zool. Soc.* 11: 9-31.
- Bedeña VB, Azedo-Oliveira MT and Taniguti E (2008). Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Mutawa melanocera* (Reduviidae, Hemiptera). *Genet. Mol. Res.* 7: 326-335.
- Canadell JPM, Bedeña J and Cabredo J (1985). Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nasuta viridula* (Hemiptera, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. *Gen. J. Genet. Cytol.* 27: 490-497.
- Cattani MV, Gershenzon EJ and Pappeichi AG (2004). Male meiotic behaviour and nucleolar organizer regions in *Campylachium olivaceum* (Fabr.) (Coreidae, Heteroptera) analyzed by fluorescence banding and *in situ* hybridization. *Caryologia* 57: 267-273.
- Chickering AM and Bucam B (1933). Spermatogenesis in the Helioidea. IV. Multiple chromosomes in *Lathroscelus*. *Pap. Mich. Acad. Sci. Arts Lett.* 17: 529-534.
- Foxey A and Liebberg H (1995). Meiosis and nucleolar structures in the stick bug *Geilidia walthergi* Stål (Coreidae: Heteroptera). *Cytobios* 81: 7-15.
- González-García JM, Ammir C, Suja JA and Rufas JS (1996). Meiosis in holocentric chromosomes: kinetochore activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex trivalents in *Graphanus italicus* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 4: 124-132.
- Grozeva S and Nikkila S (1996). Chromosomes and their meiotic behaviour in two females of the primitive miteflyer *Diplocromapha* (Heteroptera). *Hereditas* 125: 31-36.
- Harwell WM and Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hughes-Schneider S and Schneider F (1961). The karyochromatid of the Hemiptera. *Chromosome* 12: 327-350.
- Jande SS (1959). Analysis of fibrochromosomes in four species of the family Helioidea (Heteroptera, Cryptocera). *Rev. Biol. Punjab Univ. Sci.* 10: 23-34.
- Landini C and Souza MID (2006). C-banding, fluorescence staining and NOR location in karyotypic chromosomes of bugs of the Neotropical genus *Arctiteuchus* (Heteroptera: Pentatomidae: Dictyopharinae). *Eur. J. Entomol.* 103: 239-243.
- Mirza GK (1984). Chromosomes in Evolution in Heteroptera. In: *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. (Sharma AK, ed.) CRC Press, Boca Raton, 189-225.
- Nikkila S and Nikkila C (2004). Interaction of B chromosomes with A or B chromosomes in segregation in insects. *Cytogenet. Genome Res.* 106: 394-397.
- Pappeichi AG and Mirza LM (1990). Meiotic studies in *Jassonius arbei* (Stål) (Coreidae, Heteroptera). I. Behaviour of univalentes: desynaptic individuals. *Genetics* 90: 31-38.
- Pappeichi AG and Hresko MJ (2002). Cytogenetic Studies in Helioidea from Argentina. Abstracts of the Second Quadrennial Meeting of the International Heteroptera Society, St. Petersburg, 46.
- Pappeichi AG, Mirza LM, Hresko MJ, Gershenzon EJ, et al. (2003). Behaviour of ring trivalents in karyotypic systems: alternative sites of apical attachment in *Archylyx argentinus* and *Nasuta viridula* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 11: 725-733.
- Pérez R, Panzer F, Page J, Suja JA, et al. (1997). Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of bivalents in *Mutawa irifera* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 5: 47-56.
- Rhagiani P, Papeichi AG and Mirza LM (2003). Meiosis and fluorescence banding in *Blattella germanica* and *E. nigriventris* (Heteroptera: Pentatomidae: Ectopinae). *Eur. J. Entomol.* 100: 11-18.
- Santon R, Liu and Grunert I (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat. Genet.* 32: 393-396.
- Schneider F (1935). Notes on the meiotic behavior of long chromosomes. *Cytology* 6: 422-430.
- Schneider F (1940). The formation of female and the meiotic process in the male of *Rhytidolomia serrilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). *J. Morphol.* 67: 123-141.
- Sever-Aguilar GD, Lourenco LB, Bido de HE and Azedo-Oliveira MT (2006). Meiotic aspects and nucleolar activity in *Triatominae vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetics* 26: 141-151.
- Souza HV, Bido de HE, Costa LAA and Soyama MM (2007a). Analysis of meiosis and spermiogenesis in the testicular tubes of *Arctiteuchus irifera* (Heteroptera: Pentatomidae). *Eur. J. Entomol.* 104: 353-362.
- Souza HV, Bido de HE and Soyama MM (2007b). Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Genet. Mol. Res.* 6: 33-40.
- Suja JA, del Cero AL, Page J, Rufas JS, et al. (2010). Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosome* 109: 35-43.
- Uphemia N (1979). Hemiptera II: Heteroptera. In: *Animal Cytogenetics*, Vol. 3, Issue 6, October Hemiptera. Berlin, 1-117.

Espermatogênese e impregnação por íons prata em espécies da família Gerridae (Heteroptera)

Márcia Maria Urbanin Castanhole, Luís Lênin Vicente Pereira, Hederson Vinicius Souza, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Luis Antônio Alves Costa, Mary Massumi Itoyama. UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Resumo: *Brachymetra albinerva* e *Halobatopsis platensis* apresentam complemento cromossômico de $2n= 25$ ($24A + X0$) e *Cylindrostethus palmaris* $2n= 29$ ($28A + X0$) cromossomos, portanto as três espécies apresentam sistema cromossômico do sexo $X0$. Após a coloração com orceína lacto-acética, observamos núcleos poliplóides com várias regiões heteropicnóticas. No início da prófase as células apresentam uma região heteropicnótica que provavelmente é o cromossomo sexual. Observamos, também, a presença de quiasmas. No início da espermiogênese as espermátides são arredondadas e apresentam uma região heteropicnótica na periferia do núcleo. Após o alongamento, os espermatozoides apresentam cabeça pequena e cauda longa. Posteriormente, a impregnação com íons prata, observamos células com um ou vários corpúsculos, que ao se desorganizarem esse material foi observado ao redor da bainha pericromossômica, seguindo o padrão normal, ou no final da metáfase I. Inicialmente as espermátides arredondadas apresentam dois corpúsculos próximos um ao outro, mas com o alongamento um desses corpúsculos permanece na região da cabeça e o outro migra para a parte inicial da cauda. Ao final do processo de espermiogênese essas marcações não são mais visualizadas.

Palavras-chaves: *Brachymetra*; *Halobatopsis*; *Cylindrostethus*; meiose; cromossomos holocêntricos; insetos aquáticos; quiasmas; espermátides.

Introdução

Brachymetra albinerva, *Cylindrostethus palmaris* e *Halobatopsis platensis* são insetos pertencentes à família Gerridae (Heteroptera) e conhecidos como animais aquáticos de passadas largas, pois eles movimentam-se sobre a água usando simultaneamente as pernas medianas e posteriores. Vivem na superfície das lagoas, de córregos lentos, de pântanos, e de outras águas tranquilas. Podem mover-se muito rapidamente, até 1,5 m/s, na superfície da água. O comprimento é bastante variável, de 1,6 a 36 mm. Eles possuem sempre pernas compridas e o corpo muito próximo do arredondado. Eles apresentam dieta insetívora, alimentam-se de pequenos insetos que eventualmente caem sobre a água. Seus ovos são depositados sobre objetos flutuantes (BORROR; DELONG, 1988).

Esta família é caracterizada por possuir sistema cromossômico do sexo X0, disposição cromossômica metafásica em anel e ausência de m-cromossomos. Apresentam, ainda, cromossomos holocêntricos, divisão pré-reducional dos autossomos e pós-reducional dos sexuais. O número cromossômico modal é de 21 (20A + X0) ou 23 (22A + X0) (UESHIMA, 1979).

Os dados citogenéticos dos Gerridae são extremamente raros, assim como, a descrição do comportamento nucleolar em Heteroptera. Os dados descritos na literatura mostram, por exemplo, que *Spartocera fusca* e *Carlisis wahbergi* (Heteroptera, Coreidae) apresentam semi-persistência do nucléolo durante a meiose (CATTANI; PAPESCHI, 2004), *Acanthocoris sordidus* (Coreidae, Heteroptera) e *Coptosoma punctissimum* (Plataspidae) os nucléolos foram observados na placa metafásica dos espermátócitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947, 1950; FOSSEY; LIENBERBERG, 1995) e, finalmente, *Eubule sculpta* (Coreidae) o nucléolo está presente até a telófase I localizado no interior dos grupos de cromossomos segregando (COLOMBO; BIDAU, 1985). Em *Nysius californicus* (Heteroptera, Lygaeidae) observou-se marcações pela prata ao redor da bainha pericromossômica e durante a espermiogênese as marcações pela prata foram observadas na periferia do envoltório nuclear quando as espermátides ainda eram arredondadas e na região posterior da cabeça na fase

de alongamento (SOUZA et al., 2007a). Em *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae) as marcações pela prata foram observadas, também, ao redor da bainha pericromossômica dos cromossomos. Durante a espermiogênese de *A. tripterus* a presença de material impregnado pela prata foi observado separadamente por lobo, chegando-se à conclusão de que há diferenças entre os lobos. (SOUZA et al., 2007b)

Além de todas as características anteriormente mencionadas, os Heteroptera aquáticos são, ainda, muito importantes economicamente, pois podem ser utilizados para bio-monitorar a poluição do ar por metais pesados (STEINNES, 1989). Muitos invertebrados aquáticos podem acumular cádmio e outros metais pesados, pois eles são relativamente insensíveis a estas substâncias (SPEHAR et al., 1978). Apesar da importância destes organismos, eles são pouco utilizados como bioindicadores, pois não são coletados em grandes quantidades e há necessidade de taxonomistas bastante experientes (NUMMELIN et al., 1998). Mas há outras vantagens como, por exemplo, a de que apesar deles possuírem asas, eles não se dispersam por longas distâncias (FAIRBAIRN, 1986). Segundo Nummelin et al. (1998) parece que há uma tendência das fêmeas possuírem uma maior quantidade de metais pesados do que os machos, o que é justificado pela maior necessidade de energia pelas fêmeas para a produção de ovos.

Devido à importância econômica anteriormente mencionada e o número reduzido de trabalhos citogenéticos dessas espécies, o nosso objetivo foi o de ampliar os conhecimentos citogenéticos com relação à espermatogênese e o comportamento nucleolar de três espécies da família Gerridae.

Material e Métodos

Dez exemplares de cada espécie de *Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris* e *Halobatopsis platensis* foram coletados na represa Municipal de São José do Rio Preto (20°47'32" S, 49°21'37" W), SP, com auxílio de puçá e transportados, em potes, contendo água, até o laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos da UNESP/IBILCE, onde foram separados, por sexo, e fixados em metanol:ácido acético (3:1) e mantidos em geladeira até a

confeção das lâminas por esmagamento em orceína lacto-acética e impregnação com íons prata segundo Howell e Black (1980). As imagens foram analisadas em microscópio Zeiss, AXIOSKOP 2, com lâmpada de 12V/100 watts, sendo as imagens capturadas pelo software Digital Image Processing AXIONVISION 3.1 (Zeiss) acoplado ao mesmo.

Resultados

Brachymetra albinerva, *Cylindrostethus palmaris* e *Halobatopsis platensis* possuem testículos envoltos por membrana transparente, formados por dois lobos alongados e localizados na região posterior do abdome.

A análise cromossômica de *B. albinerva* e *H. platensis* mostrou-nos que o complemento cromossômico destas espécies é de $2n= 25$ (24A + X0) e o de *C. palmaris* é de $2n= 29$ (28A + X0) cromossomos.

Comportamento meiótico e espermiogênese

Os núcleos poliplóides das células nutritivas de *B. albinerva*, *C. palmaris* e *H. platensis* são grandes e apresentam várias regiões heteropicnóticas pequenas, distribuídas uniformemente pela célula (Figura 1a). Em Heteroptera, o processo de espermiogênese ocorre dentro dos cistos espermatogoniais, sendo estas células possuidoras de várias regiões heteropicnóticas, como pode ser observada na Figura 1b. No início da prófase I (leptóteno) as células das três espécies possuem cromatina descondensada e uma ou duas regiões heteropicnóticas evidentes que podem estar próximas ou separadas e são de tamanhos diferentes (Figura 1c,d). A presença do corpúsculo pode ser observada até o final da prófase I (Figuras 1d-h e 2a,b), juntamente com o processo de condensação da cromatina e, desta maneira, pode-se observar, também, a presença de quiasmas terminais e/ou intersticiais (Figura 2a). A frequência de quiasmas nestas espécies é baixa. Podemos observar, ainda, que durante o processo de condensação, os cromossomos de *B. albinerva* e *H. platensis* comportam-se de maneira semelhante, mas diferem de *C. palmaris*, pois nestes os cromossomos não

possuem morfologia definida, parecendo, ainda, apresentar associações cromossômicas (Figura 1g). Um outro fenômeno observado é que durante o diplóteno as células de *C. palmaris* possuem o dobro de tamanho das de *B. albinerva* e *H. platensis*.

No final do processo de condensação dos cromossomos, metáfase I (Figura 2b-e), estes podem ser visualizados na placa equatorial da célula formando um anel através dos autossomos e no seu centro o cromossomo sexual, isto em visão polar. Na visão lateral os cromossomos são observados alinhados.

O processo de espermiogênese inicia-se com espermatídes arredondadas e com uma região heteropicnótica deslocada para a periferia do núcleo, em todas as espécies, só diferenciando com relação ao tamanho, *H. platensis* possui células oito vezes maior que as outras espécies. Durante o alongamento há o aparecimento de uma vesícula pequena em *B. albinerva* e grande em *H. platensis* e *C. palmaris* (Figura 2g-h). Com o aparecimento desta vesícula o material heteropicnótico vai deslocando-se para uma das extremidades da célula e esta vai alongando-se (Figura 3a,b), ficando o material heteropicnótico deslocado para a parte posterior da cabeça da espermatíde em formação (Figura 3b). As espermatídes em uma etapa mais avançada do desenvolvimento, apresentam o material heteropicnótico em forma de bastão (Figura 3c-i). Este material, torna-se muito reduzido no final do processo.

Impregnanção por íons prata

Os núcleos poliplóides das células nutritivas de *Brachymetra albinerva* e *Halobatopsis platensis* apresentam uma massa impregnada por íons prata sem morfologia definida e várias impregnações pequenas (Figura 4a). Em *Cylindrostethus palmaris* observamos a presença de vários corpúsculos impregnados pequenos, arredondados e distribuídos pela célula (Figura 4b). As células em prófase I inicial (leptóteno-paquítenu) apresentam um único corpúsculo arredondado e fortemente corado na periferia da célula (Figura 4c).

Com o processo de condensação dos cromossomos os corpúsculos começam a se desorganizar, sendo observados, além do corpúsculo arredondado, visualizado no início da prófase I, outros menores e com colorações menos evidente (Figura 4d, e, g). A marcação pela prata é mais evidente em *H. platensis* (Figura 4f) até no início do diplóteno (Figura 5a). Após a desorganização do corpúsculo, esse material pode ser observado ao redor da bainha pericromossômica em *B. albinerva* (Figura 5b) ou na região que, possivelmente, é a da região organizadora nucleolar (RON) (Figura 5c,d). No final da meiose o material impregnado pode ser observado até quase no final da telófase em *B. albinerva* (Figura 5e,f). O material nucleolar em *C. palmaris* é muito mais impregnado e maior, nas duas células em formação (Figura 5g).

No início da espermiogênese, as espermátides arredondadas possuem em um dos pólos, três marcações, sendo uma arredondada e encontrada sempre sozinha e as outras duas possuem forma mais alongada e podem ser encontradas lado a lado, ou uma sobre a outra (Figura 6a). Com o desenvolvimento das espermátides as marcações começam a se separar, sendo que uma permanece na mesma extremidade e a outra migra para o pólo oposto (Figura 6b-e). As espermátides de *C. palmaris* são em torno de quatro vezes maior que as de *H. platensis* e *B. albinerva*, mas possuem o mesmo padrão de impregnação pela prata. Em um estágio mais avançado do desenvolvimento, as espermátides tomam forma de bastão com as três marcações pela prata distribuídas nas duas extremidades e uma na região interna da mesma. A marcação da extremidade posterior é alongada e as outras duas arredondadas (Figuras 6f-h e 7a,b). À medida que elas alongam-se as marcações ainda continuam visíveis (Figura 7c,d). Quase no final do processo de espermiogênese as impregnações pela prata são visíveis somente na região da cabeça como uma marcação única.

Discussão

Os núcleos poliplóides das células nutritivas de *Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris* e *Halobatopsis platensis* são semelhantes e

apresentam várias regiões heteropicnóticas. O comportamento dessas células são bastante variáveis diferenciando mesmo dentro da própria família. As espécies de Coreidae, analisadas por Souza et al. (2007c), apresentaram, por exemplo, as células no estágio interfásico (com ou sem regiões heteropicnóticas) ou sem divisão (cromossomos extremamente condensados). Em *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae, Heteroptera) os núcleos poliplóides são formados de vários corpúsculos heteropicnóticos maiores e vários menores (SOUZA et al., 2007b), o mesmo ocorrendo em *Nysius californicus* (Lygaeidae, Heteroptera) (SOUZA et al., 2007a).

A presença de um corpúsculo heteropicnótico durante a prófase I meiótica, foi observado por vários pesquisadores e todos os referem como sendo os cromossomos sexuais condensados (SOUZA et al., 2007a,b,c). As três espécies de Gerridae, analisadas nesse trabalho, também, os apresentaram.

Durante a prófase I meiótica o processo de condensação dos cromossomos ocorre de uma maneira homogênea, podendo-se, sempre, observar os cromossomos com morfologia bem definida. Isto pode ser observado em *B. albinerva* e *H. platensis*. A morfologia dos cromossomos de *C. palmaris* é bastante variável assemelhando-se com *Athaumastus haematicus* (Coreidae) (SOUZA et al., 2007c), mas não há condições de concluirmos porque o padrão é diferente.

Com relação às demais características como presença de cromossomos holocêntricos, meiose quiasmática, sistema cromossômico do sexo XO, todas as espécies apresentaram, diferindo apenas com relação ao número de autossomos que foi de 24 (*B. albinerva* e *H. platensis*) ou 28 (*C. palmaris*) cromossomos, portanto diferem do número padrão da família que é de 20 ou 22 autossomos (UESHIMA, 1979).

Como os Heteroptera apresentam cromossomos holocêntricos, a manutenção de pedaços de cromossomos é possível, permitindo, assim, a ampliação no número de cromossomos ou se ocorrer fusão, a redução dos números desses cromossomos. Como o número padrão é de 20 ou 22 autossomos, é provável que tenha ocorrido quebras cromossômicas, mas para confirmação

precisamos, por exemplo, quantificar o conteúdo de DNA dessas espécies e comparar com as espécies de 20 ou 22 cromossomos.

Citogeneticamente, os Heteroptera são muito semelhantes, não havendo condições, nem mesmo de separar as espécies terrestres das aquáticas. Talvez isto só seja possível se observarmos as espermátides em alongamento, pois as aquáticas adquirem forma de bastão e as terrestres são elípticas, mas como poucas espécies foram avaliadas até o momento, talvez, nem mesmo essa característica possa ser utilizada.

Os cromossomos dos Heteroptera são pequenos e altamente condensados, dificultando a sua análise, principalmente, as relacionadas com bandamento cromossômico. As tentativas relacionadas com impregnação pelos íons prata ou hibridização *in situ* não foram satisfatórias devido a estas características. A única espécie na qual houve marcação pela prata da região organizadora nucleolar (RON) de uma maneira altamente satisfatória foi em *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae) na qual houve marcação em um autossomo (CASTANHOLE et al., 2008). Em *Asellus aquaticus* (Isopoda), os corpúsculos Ag-NOR foram visualizados durante todo o processo de espermatogênese (DI CASTRO et al., 1983). Em *Callicrania seoanei* (Orthoptera), as RONS foram observadas da intercinese até a pró-metáfase II (SANTOS et al., 1987) e em *Triatoma infestans* e *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), as marcações Ag-NOR estavam presentes até a metáfase I (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Finalmente em *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae) a semi-persistência nucleolar (presença de corpúsculos nucleolares durante as metáfases) foi observada até a metáfase II (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995), enquanto em *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) e *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae), os nucléolos foram detectados nas placas metafásicas de espermátocitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947).

Em Belostomatidae, as RONS foram descritas nos telômeros dos cromossomos sexuais X e Y, (*Belostoma oxyurum* e *B. micantulum*), ou na região telomérica de um autossomo (*Belostoma elegans*) (PAPESCHI; BRESSA, 2002).

Nos Coreidae, uma única RON está presente na região intersticial do maior autossomo de *Pachylis argentinus* (PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica de um autossomo em *Carlisi wahlbergi* (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995) e *Spartocera fusca* (CATTANI; PAPESCHI, 2004). Nos Pentatomidae, uma única RON foi detectada na região telomérica de um autossomo em *Edessa mediatubunda* (REBAGLIATI et al., 2003), na posição mediana do maior autossomo em *Nezara viridula* (CAMACHO et al., 1985; PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica do cromossomo X em *Graphosoma italicum* (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996).

As espécies analisadas no presente trabalho mostraram marcação na bainha pericromossômica e em algumas regiões específicas de alguns autossomos. A melhor alternativa talvez seja a de obtermos sequências específicas de rDNA de Heteroptera para podermos hibridizar com os materiais a serem estudados, mas devido ao tamanho reduzido e o nível de condensação, talvez esta técnica, não seja eficiente.

Uma das diferenças observadas durante a espermiogênese das espécies aquáticas é a presença de uma vesícula nas espermátides arredondadas e em processo de alongamento, não observada nas espécies terrestres (Pentatomidae, SOUZA et al., 2007b, 2008; Coreidae, SOUZA et al., 2007c). Talvez isto esteja relacionado com o fato deles serem aquáticos e necessitarem de uma quantidade (reserva) maior de energia, pois além desta característica, eles possuem grande quantidade de tecido adiposo na região abdominal.

Com relação ao método de impregnação pela prata há algumas dúvidas, durante a espermiogênese, se este material está relacionado com proteínas nucleolares ou se são estruturas celulares, como por exemplo, mitocôndrias ou complexo de Golgi, ou ainda, se são estruturas em processo de eliminação ou modificação. Por esse motivo, em uma próxima etapa, o processo de espermiogênese deverá ser analisado por outras técnicas, como por exemplo, microscopia eletrônica de transmissão.

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, FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo, Brasil: ed Edgard Blucher LTDA., 653 pp., 1988.

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

CASTANHOLE, M. M. U.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained NOR revealing chromosomal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p.1398-1407, 2008.

CATTANI, M.V.; PAPERESCHI, A.G. Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera). **Hereditas**, v. 140, p. 105-111, 2004.

COLOMBO, P.; BIDAU, C. Estudios cromosómicos en heterópteros argentinos. I. Los cromosomas meióticos de cinco espécies de Coreidae. **Physis Secc.**, v. 43, p. 29-40, 1985.

DI CASTRO, M.; PRANTERA, G.; CIPRIANI, L.; ROCCHI, A. Silver staining analysis of nucleolar-organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). **Genetica**, v. 60, p. 163-166, 1983.

FAIRBAIRN, D. J. Does alary dimorphism imply dispersal dimorphism in the waterstrider, *Gerris remigis*. **Ecological Entomology**, v. 11, p. 355-368, 1986.

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

GONZÁLEZ-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.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I step method. **Experientia**, v. 36, p. 104-105, 1980.

NUMMELIN, M.; LODENIUS, M.; TULISALO, E. Water striders (Heteroptera, Gerridae) as bioindicators of heavy metal pollution. **Entomologica Fennica**, v.8, p. 185-191, 1998.

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

SANTOS, J.; SENTIS, C.; FERNANDEZ-PIQUERAS, J. 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**, v. 29, p. 516-518, 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**, v. 104, p. 353-362, 2007b.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007c.

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

SPEHAR, R. L.; ANDERSON, R. L., FIANDT, J. T. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic evertbrates. **Environmental Pollution**, v. 15, p. 195-208, 1978.

STEINNES, E. Biomonitoring of air pollution by heavy metals. In: Ottar, B.; Pacyna, J. (eds.), **Control and Fate of Atmospheric Heavy Metals**, p.321-328. Kluwer, Dordrecht, 1989.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.J.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. **Animal cytogenetics**, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera. Gebruder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 117 pp., 1979.

YOSHIDA, T. Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. **Journal of the Faculty of Science- Hokkaido University**. (Zool.), v. 9, p. 243-249, 1947.

YOSHIDA, T. H. Remarkable behavior of the nucleolus in meiosis of *Acanthocoris sordidus* Thumb. (Heteroptera) (in Japanese). **La Kromosomo** v. 7, p. 273–282, 1950.

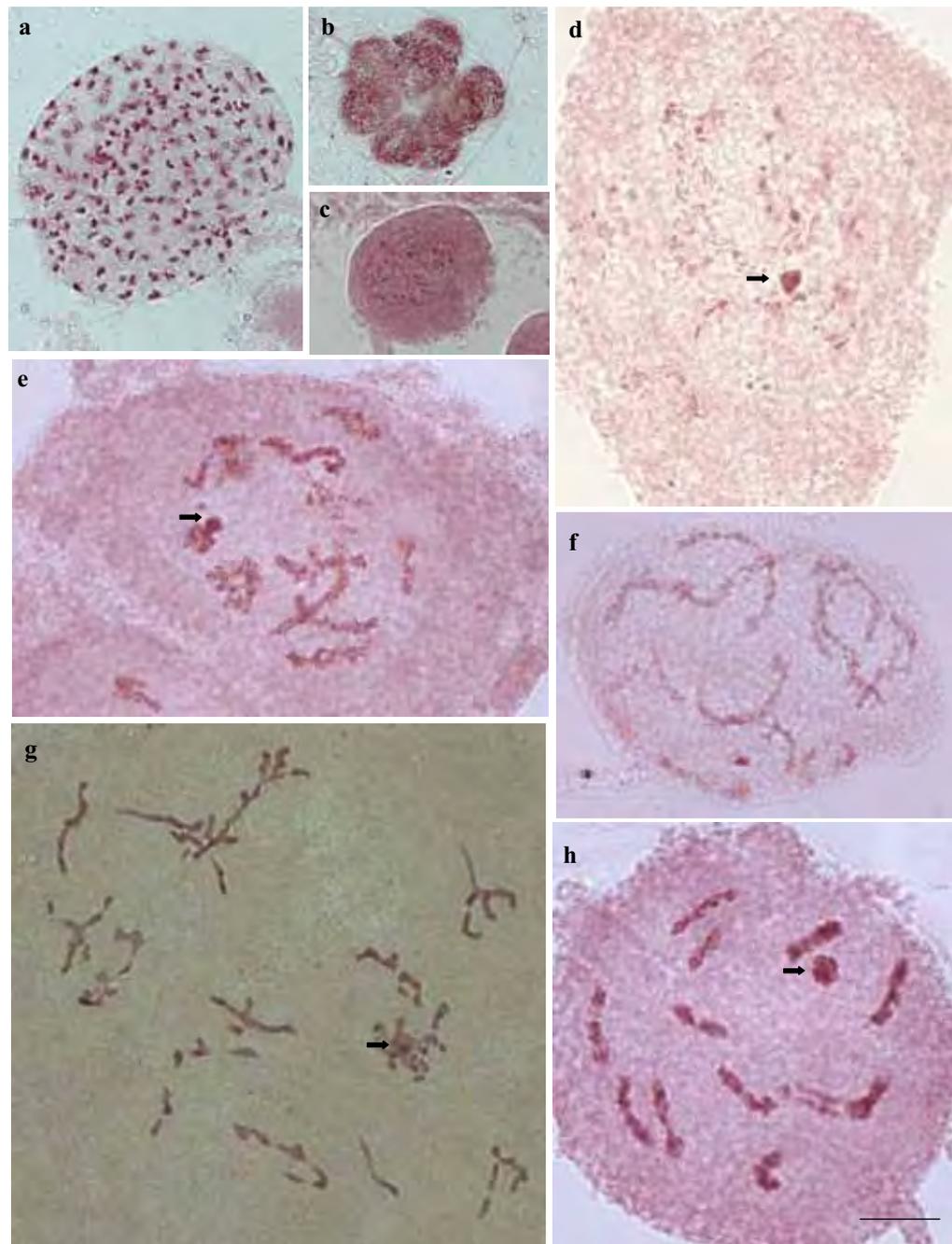


Figura 1. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (a,b,c,f), *Cylindrostethus palmaris* (g) e *Halobatopsis platensis* (d,e,h) coradas com orceína lacto-acética. a) Núcleo poliplóide com vários corpúsculos heteropicnóticos; b) cisto espermatogonial; c,d) Prófases em estágio inicial (leptóteno-zigóteno), sendo que a região mais heteropicnótica é, provavelmente, o cromossomo sexual (d, seta); e,f) Prófases em estágio intermediário (paquíteno) apresentando um corpúsculo mais heteropicnótico (e, seta); g,h) Prófases em estágio avançado (diplóteno-diacinese), presença de quiasmas e do corpúsculo mais heteropicnótico, setas. Barra: 10 μ m

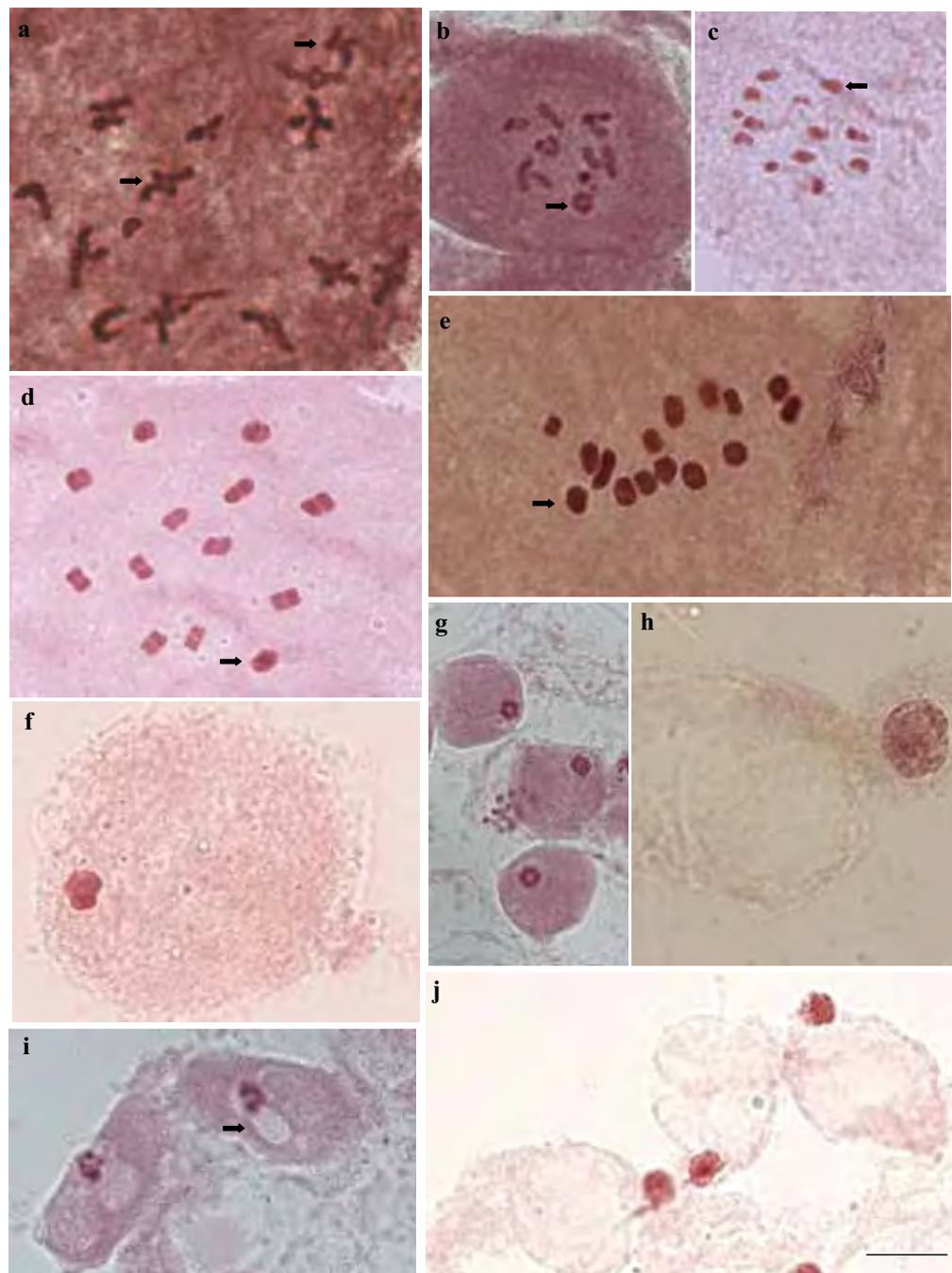


Figura 2. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (b,c,g,i), *Cylindrostethus palmaris* (a,e,h) e *Halobatopsis platensis* (d,f,j) coradas com orceína lactoacética. a,b) Diacineses mostrando quiasmas terminais, intersticiais (setas) e as associações cromossômicas; c,d) metáfases com 25 cromossomos (24A+ X0) (cromossomo sexual, X, setas); e) metáfase com 29 cromossomos (28A + X0) (cromossomo sexual, X, seta); f-h) espermatídes arredondadas, ampliando seu tamanho para o processo de alongamento; i,j) espermatídes em alongamento (seta). Barra: 10 μ m

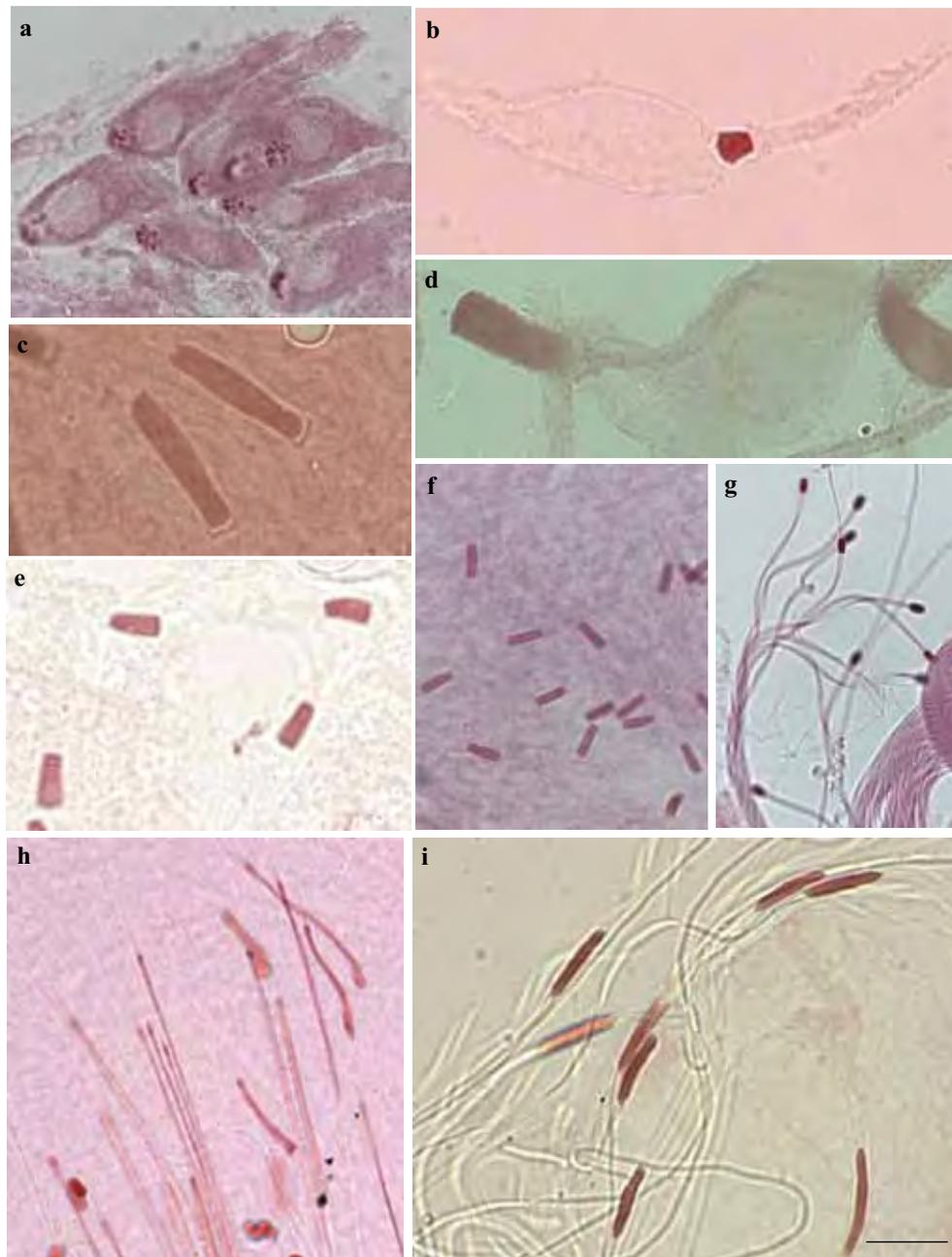


Figura 3. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (a,f,g), *Cyldrostethus palmaris* (c,d,i) e *Halobatopsis platensis* (b,e,h) coradas com orceína lacto-acética. a,b) Espermátides em alongamento; c-f) espermátides alongadas em forma de bastonetes e retangular (e); g-i) espermatozóides com cabeça pequena e cauda longa. Barra: 10 μ m

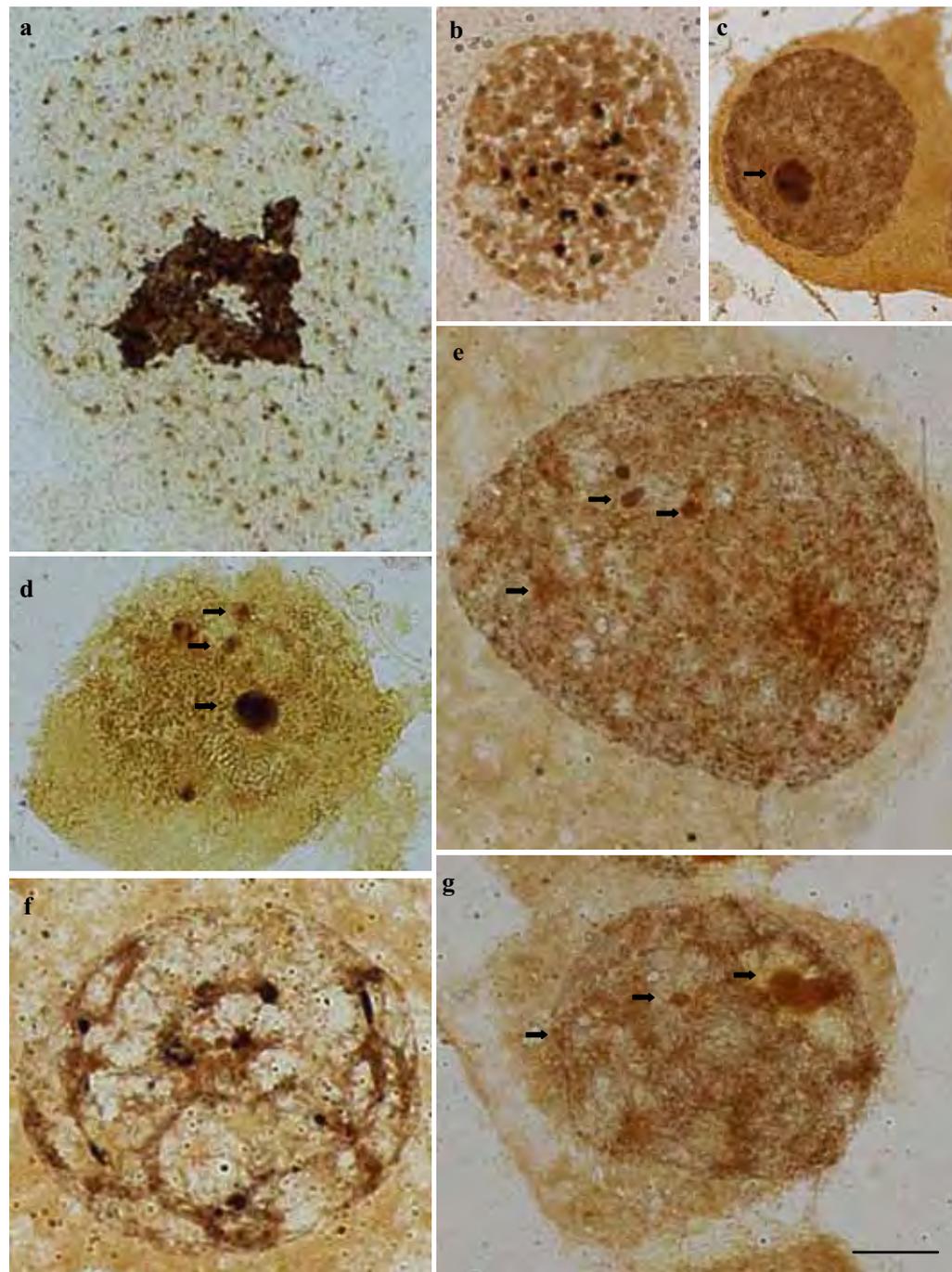


Figura 4. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (c), *Cylindrostethus palmaris* (b,e,g) e *Halobatopsis platensis* (a,d,f) impregnadas por íons prata. a) Núcleo poliplóide com formação de uma única massa sem morfologia definida e várias menores; b) núcleo poliplóide com a formação de vários corpúsculos; c-e) prófase em estágio inicial (leptóteno-zigóteno) contendo um único corpúsculo (c, seta) e com vários corpúsculos (d,e, setas); f,g) prófase em estágio mais avançado (paquíteno) com vários corpúsculos (setas). Barra: 10 μ m

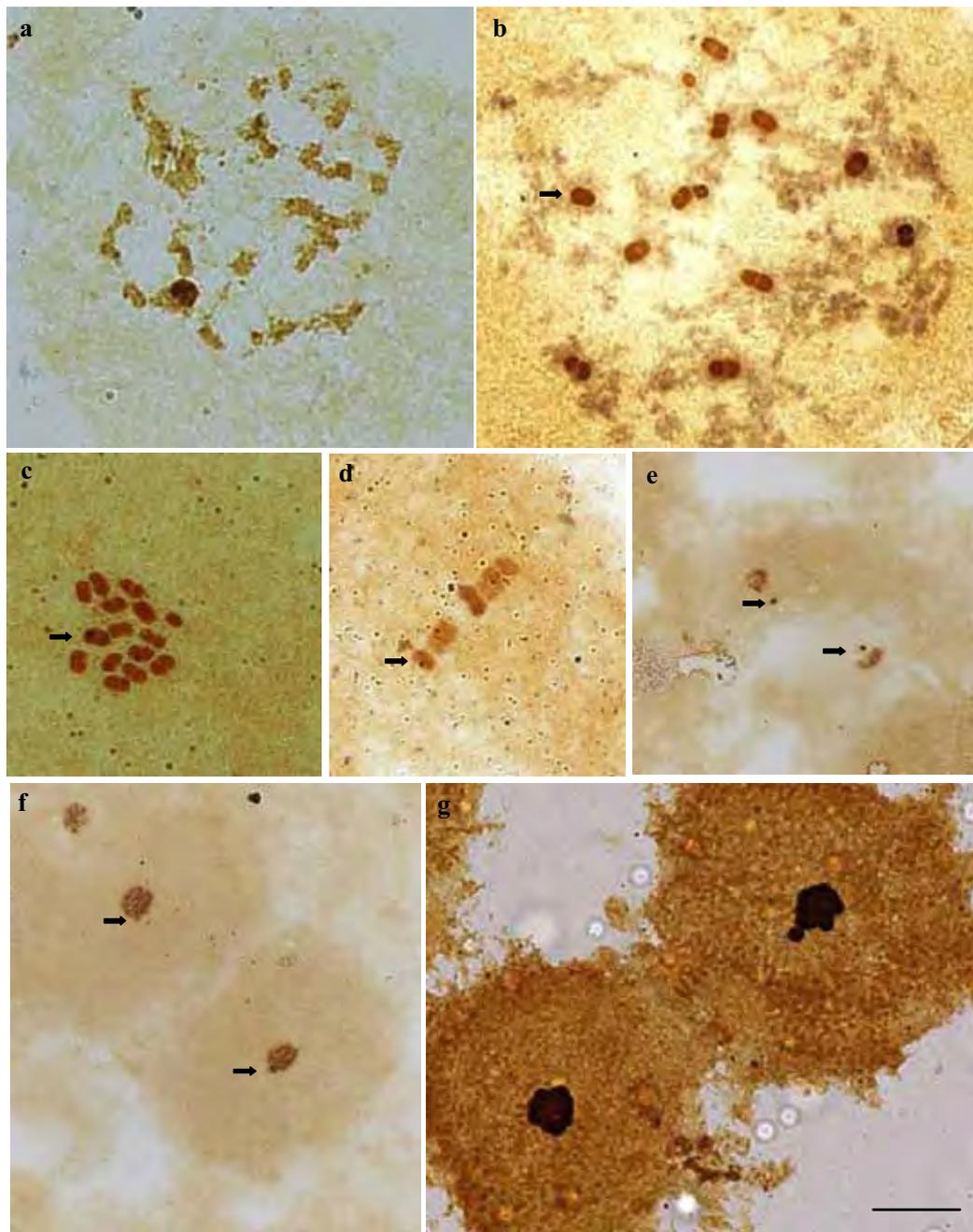


Figura 5. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (b,e,f), *Cylindrostethus palmaris* (c,g) e *Halobatopsis platensis* (a,d) impregnadas por íons prata. a) Prófase em estágio final (diplóteno-diacinese); b,c) metáfases com material impregnado pela prata localizado ao redor da bainha pericromossômica (setas); d) cromossomos na placa metafásica com possível marcação da RON (seta); e-g) telófases com presença de dois corpúsculos (e,f, setas) e de um corpúsculo apenas (g). Barra: 10 μ m

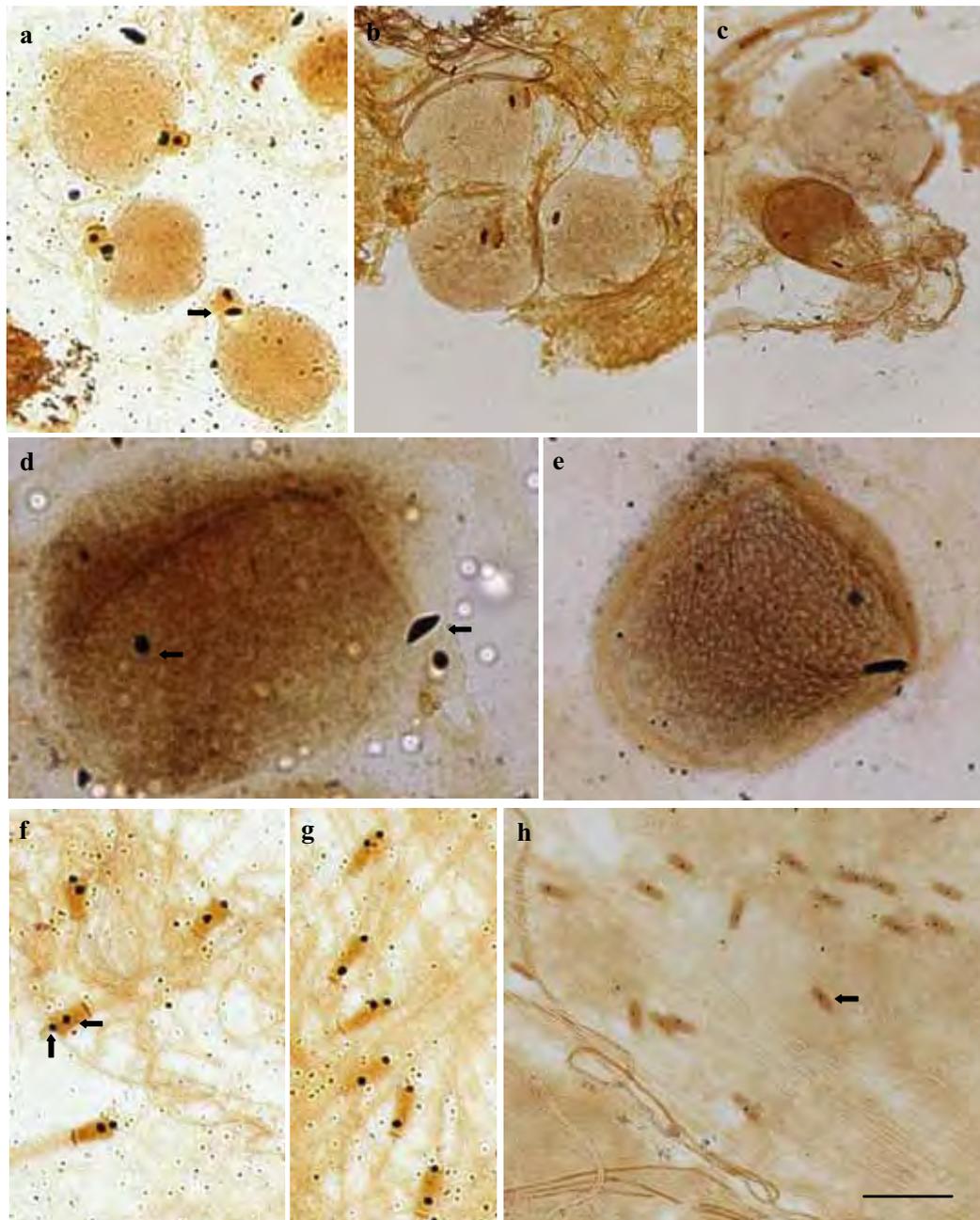


Figura 6. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (b,c,h), *Cylindrostethus palmaris* (d,e) e *Halobatopsis platensis* (a,f,g) impregnadas por íons prata. a-c) espermátides arredondadas com marcação na região anterior (seta); d,e) espermátides em alongamento, com aumento de tamanho e afastamento dos corpúsculos (seta); f-h) espermátides em forma de bastonetes, com marcações na região anterior e posterior da cabeça (f,g, setas) e na região mediana e anterior da cabeça (h, seta). Barra: 10 μm

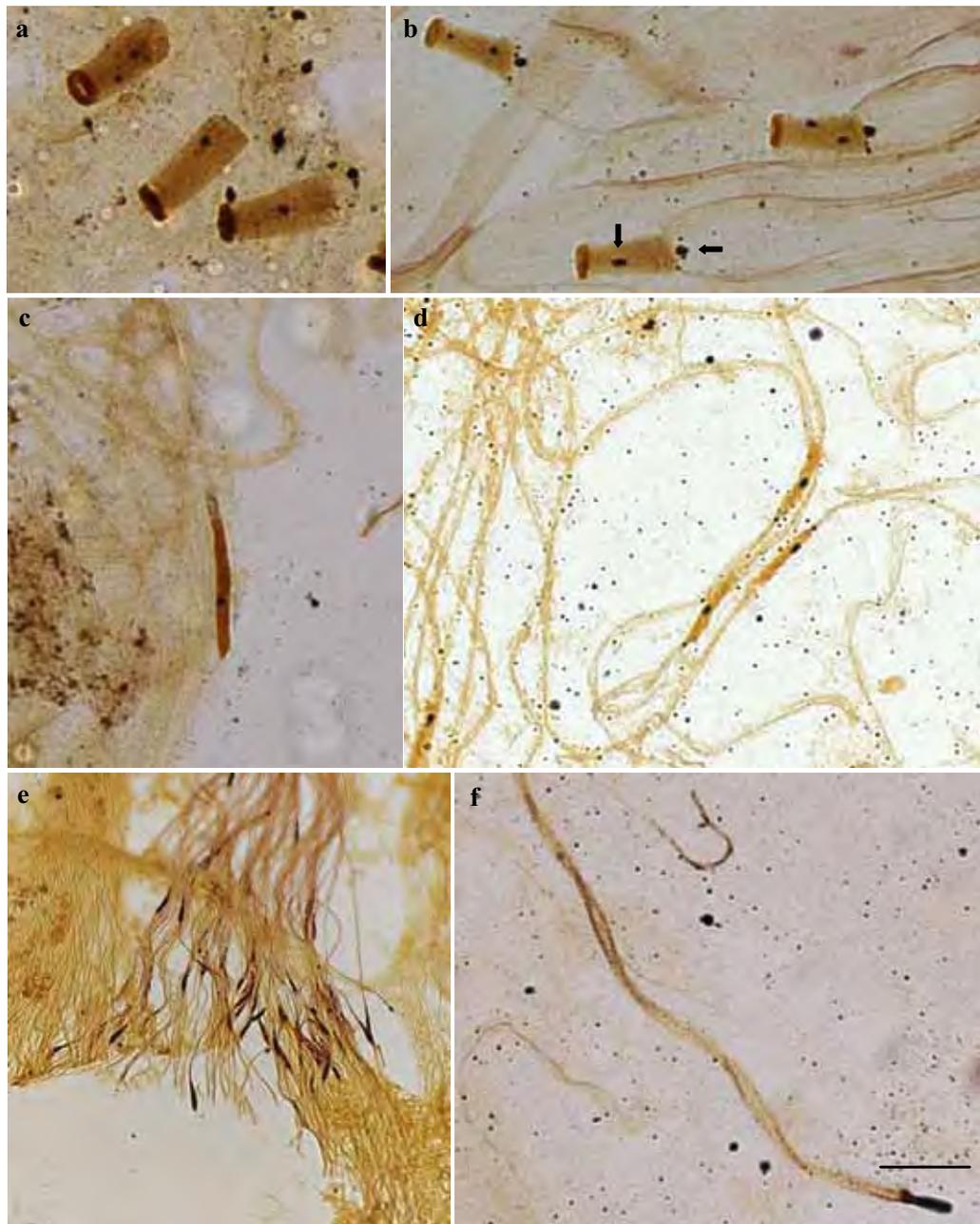


Figura 7. Células dos túbulos seminíferos de machos adultos de *Brachymetra albinerva* (c), *Cylindrostethus palmaris* (a,b,e,f) e *Halobatopsis platensis* (d) impregnadas por íons prata. a,b) Espermátides ainda em alongamento com duas marcações pela prata (setas); c-f) Espermátides alongadas. Observar que as marcações pela prata são visíveis, ainda, até nas fases finais da espermiogênese, principalmente, na região da cabeça. Barra: 10 μ m

Espermatogênese de espécies das famílias Veliidae e Notonectidae

Márcia Maria Urbanin Castanhole, Luís Lênin Vicente Pereira, Hederson Vinicius Souza, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, *Luis Antônio Alves da Costa, Mary Massumi Itoyama. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/IBILCE, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
*Museu Nacional do Rio de Janeiro, RJ.

Resumo: O complemento cromossômico das espécies de Veliidae é de $2n= 39$ ($38A + X0$) e $2n= 23$ ($22A + X0$), para *Rhagovelia whitei* e *Rhagovelia* sp., respectivamente, e da espécie de Notonectidae (*Martarega* sp.) é de $2n= 26$ ($22A + 2m + XY$). Uma característica que chamou bastante a atenção foi com relação ao tamanho das células de *Martarega* sp. que são seis vezes maiores que as de Pentatomidae e duas vezes maiores que as células de Heteroptera aquáticos (Gerridae). Com relação à espermatogênese, todas as espécies analisadas apresentaram o mesmo padrão: cromossomos holocêntricos, presença de corpúsculo heteropicnótico durante a Prófase I, presença de quiasmas intersticiais e/ou terminais, espermátides arredondadas com uma vesícula grande (somente nas espécies de Veliidae) e espermátides alongadas com a cromatina distribuída uniformemente ao longo da cabeça. O comportamento nucleolar dos núcleos poliplóides difere entre as famílias. A família Veliidae apresenta vários corpúsculos impregnados pela prata, enquanto a família Notonectidae apresenta um único, bastante evidente. As células em Prófase I de Notonectidae, também, apresentam um corpúsculo evidente e arredondado até o final da Prófase I enquanto as da família Veliidae os corpúsculos desorganizam-se, sendo visualizados somente na região que possivelmente é a da RON. Na metáfase a impregnação é ao redor da bainha pericromossômica, em Veliidae, e em Notonectidae observa-se em algumas regiões da bainha pericromossômica e em algumas regiões que, possivelmente, é a da RON. As espermátides de Veliidae apresentam uma vesícula bastante impregnada enquanto que Notonectidae

apresenta somente em uma parte do envoltório nuclear. Portanto, as famílias de Heteroptera apresentam algumas diferenças que poderão ser utilizadas para a caracterização das famílias.

Palavras-chave: Espermiogênese, RON, heteropteros aquáticos, meiose, vesícula.

Introdução

Os insetos da família Notonectidae, são comumente conhecidos como nadadores de costas, por nadarem ou saírem em disparada sobre suas costas. Além disso, eles são caracterizados por possuírem pernas posteriores adaptadas para a natação. Já as espécies da família Veliidae são pequenos, gregários e predadores (UESHIMA, 1979).

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

Os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e comportam-se como univalentes na meiose dos machos. Eles dividem-se equacionalmente na anáfase I e associam-se formando um pseudobivalente na meiose II. Entretanto, pré-redução dos cromossomos sexuais foi encontrada em poucas espécies da família Tingidae (UESHIMA, 1979; GROZEVA; NOKKALA, 2001). Finalmente os m-cromossomos, pequeno par de cromossomos, presentes em algumas

famílias, são também aquiasmáticos, mas associam-se na primeira divisão e segregam-se pré-reducionalmente (PAPESCHI et al., 2003).

O número de autossomos em Heteroptera varia de quatro (Belostomatidae) a 80 (Miridae), mas estes números não são típicos para a subordem (UESHIMA, 1979). Segundo Ueshima (1979) somente 12 espécies e 2 gêneros pertencentes à família Notonectidae, foram analisadas citogeneticamente. O gênero *Anisops* (Anisopinae) é caracterizado por sistema cromossômico do sexo X_1X_20 , presença de um par de m-cromossomos e número diplóide de cromossomos de 26 para machos e 28 para fêmeas. Espécies do gênero *Notonecta* (Notonectidae) analisadas possuem sistema cromossômico do sexo X0 ou XY e complemento cromossômico de $2n= 24$ ($20A + 2m + XY$) ou 26 ($22A + 2m + XY$) cromossomos.

As espécies da família Veliidae, *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata*, apresentam complemento cromossômico de $2n= 21$ ($20A + X0$) cromossomos (COBBEN, 1968), e as espécies *Velia currens* (POISSON, 1936) e *V.* sp. (UESHIMA, 1979) apresentam $2n= 25$ ($24A + X0$) cromossomos. Apesar de todas as espécies terem sido descritas como tendo sistema cromossômico do sexo X0, Takenouchi e Muramoto (1971) relataram o sistema XY para *Microvelia douglasi*, mas há necessidade de confirmação (UESHIMA, 1979).

Uma estrutura que vem sendo bastante estudada pelos citogeneticistas é o nucléolo. Sabe-se que o seu tamanho está relacionado com a atividade biossintética 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 (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; SOUZA et al., 2007a,b). A persistência do nucléolo e dos corpos pré-nucleolares observados através da meiose de *Dysdercus imitator* (Pyrrhocoridae, Heteroptera) pode então estar relacionado com a intensa atividade sintética a fim de produzir RNAr requerido para a espermatogênese. Entretanto, há a possibilidade de que a alta taxa de transcrição de RNAr possa estar relacionado a um outro fator (BRESSA et al., 2003).

O número e a localização das RONS são conhecidos em poucas espécies de Heteroptera, tendo sido determinados por diferentes técnicas citogenéticas. Todas as espécies descritas apresentaram uma única região organizadora nucleolar (RON) localizada na posição média ou subterminal de um autossomo ou de um cromossomo sexual (CAMACHO et al., 1985; FOSSEY; LIEBENBERG, 1995; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; PAPESCHI; BRESSA, 2002; PAPESCHI et al., 2003; CATTANI et al., 2004).

Os Heteroptera aquáticos são, ainda, muito importantes economicamente, pois podem ser utilizados para bio-monitorar a poluição do ar por metais pesados (STEINNES, 1989). Muitos invertebrados aquáticos podem acumular cádmio e outros metais pesados, pois eles são relativamente insensíveis a estas substâncias (SPEHAR et al., 1978). Apesar da importância destes organismos, eles são pouco utilizados como bioindicadores, pois não são coletados em grandes quantidades e há necessidade de taxonomistas bastante experientes (NUMMELIN et al., 1998). Mas há outras vantagens como, por exemplo, a de que apesar deles possuírem asas, eles não se dispersam por longas distâncias (FAIRBAIRN, 1986). Segundo Nummelin et al. (1998) parece que há uma tendência das fêmeas possuírem uma maior quantidade de metais pesados do que os machos, o que é justificado pela maior necessidade de energia pelas fêmeas para a produção de ovos.

Frente a variação citogenética apresentada pelo grupo, nosso objetivo foi o de analisar citogeneticamente (espermatogênese e o comportamento nucleolar) espécies das famílias Veliidae e Notonectidae.

Materiais e Métodos

Dez exemplares de cada uma das espécies de *Rhagovelia whitei* e *Martarega* sp. foram coletados na represa municipal de São José do Rio Preto, São Paulo e a espécie *Rhagovelia* sp. no rio Piedade, próximo à cidade de São José do Rio Preto (20°47'32"S, 49°21'37"W), com auxílio de puçá e transportados em potes, até o Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, onde foram

separados, por sexo, e fixados em metanol:ácido acético (3:1) e mantidos em geladeira até a confecção das lâminas por esmagamento em orceína lacto-acética e impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980). As imagens foram analisadas em microscópio Zeiss, AXIOSKOP 2, com lâmpada de 12V/100 watts, sendo as imagens capturadas pelo software Digital Image Processing AXIONVISION 3.1 (Zeiss) acoplado ao mesmo.

Na figura 4, utilizamos para compararmos o tamanho das células, imagens cedidas por Hederson Vinicius de Souza (*Thianta perditor*-Pentatomidae) e Márcia Maria Urbanin Castanhole (*Halobatopsis platensis*-Gerridae), do nosso grupo de estudos do Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos.

Resultados

As espécies da família Veliidae possuem testículos formados por um único lobo arredondado e recoberto por membrana transparente. Já a espécie da família Notonectidae possui testículos formados por dois lobos, em forma de espiral e, também, envoltos por membrana transparente.

Ao dissecarmos os insetos observamos uma grande quantidade de tecido adiposo na região abdominal, entre os órgãos.

Observações em lâminas coradas com orceína lacto-acética

Família Veliidae

A análise dos testículos de *Rhagovelia whitei* e *Rhagovelia* sp. (Veliidae) mostrou que os núcleos poliplóides das células nutritivas são grandes e possuem várias regiões heteropicnóticas de tamanhos similares e de forte coloração (Figura 1a).

As células em prófase I (leptóteno-paquítenu) (Figura 1b-d) possuem um único corpúsculo heteropicnótico arredondado e evidente. Ambas as

espécies possuem quiasmas intersticiais (Figuras 1e,f, 2a) que podem ser observados até o final da prófase I (Figura 1f). No final da prófase I os cromossomos de *R. whitei* se associam formando grupos com diferentes quantidades de cromossomos (Figura 2b). A análise das metáfases I mostraram que *R. whitei* possui $2n= 39$ (38A + X0) cromossomos e *Rhagovelia* sp. possui $2n= 23$ (22A + X0) cromossomos (Figuras 2c-g). As células em telófase são, proporcionalmente, do mesmo tamanho que a das outras fases da meiose (Figura 3a).

As espermatídes de *R. whitei* são arredondadas e possuem algumas regiões heteropicnóticas (Figura 3b-c) e as de *R. sp.* possuem além das regiões heteropicnóticas uma vesícula grande arredondada ao lado do núcleo (Figura 3d), que posteriormente desaparece (Figura 3e). Durante o alongamento, as espermatídes tomam forma de bastão, com a cromatina distribuída ao longo da cabeça (Figura 3f,g).

Família Notonectidae

A análise dos testículos de *Martarega* sp. (Notonectidae) mostrou que os núcleos poliplóides são alongados e formados por vários corpúsculos heteropicnóticos de tamanhos similares. Em comparação com as células meióticas os núcleos poliplóides são bem menores (Figura 4a).

Na Figura 4b observamos uma célula em prófase I inicial (leptóteno/zigóteno) com uma região heteropicnótica arredondada e várias de morfologia variável. Uma outra observação realizada nessa espécie é com relação ao tamanho das células meióticas. Em destaque há outras células, na mesma fase do desenvolvimento, no mesmo aumento, para podermos verificar diferenças nas proporções. Em “c” temos células de *Thyanta perditor* (Pentatomidae) e em “d” *Halobatopsis platensis* (Gerridae), que são, em diâmetro, 6x e 2x, respectivamente, menores que as células de *Martarega* sp.

Durante todo processo meiótico as células são de tamanhos semelhantes. Os cromossomos vão condensando-se (Figura 5a,b), podendo-se

observar alguns com a presença de quiasmas (Figura 5b). No final da prófase I observa-se os cromossomos associados telomericamente e com poucos cromossomos com quiasmas (Figura 6a). Na metáfase I, visão polar, os autossomos formam um anel com os m-cromossomos e os sexuais no seu interior. O complemento cromossômico é $2n= 26 (22A + 2m + XY)$ cromossomos (Figura 6b,c).

Os cromossomos separam-se normalmente na anáfase e formam durante a telófase duas células de tamanhos similares, e cada uma delas com tamanho similar às das outras células nas fases anteriores (Figura 7). No final da telófase observa-se uma associação telomérica entre quase todos os cromossomos, formando um anel e no seu interior um conjunto bem menor de cromossomos, e na parte externa do anel há um conjunto de cromossomos heteropicnóticos, que possivelmente são os sexuais, associado com um dos cromossomos do anel (Figura 8a).

As espermatídes recém formadas são arredondadas e possuem no seu interior regiões também arredondadas, que não foram coradas pela orceína (Figura 8b). Durante o alongamento, as espermatídes adquirem a morfologia quadrada (Figura 8c) e com o desenvolvimento alongam-se em forma de bastão com a cromatina distribuída uniformemente pela cabeça da mesma (Figura 8d,e).

Observações em lâminas impregnadas pelos íons prata

Família Veliidae

Os núcleos poliplóides de *Rhagovelia whitei* e *Rhagovelia* sp. impregnados pelos íons prata apresentaram várias marcações arredondadas fortemente coradas e outras menos coradas dispersas por todo o núcleo (Figura 9a). Durante a prófase I (zigóteno-paquítenu) há dois corpúsculos, que começam a se desorganizar permanecendo somente em algumas regiões dos cromossomos, mas sem morfologia definida (Figura 9c-d). No final da prófase I (diplóteno) podemos observar em *R. sp.* marcação pela prata na região telomérica de um dos

autossomos. A associação deste cromossomo ocorre pelas regiões teloméricas, como já definido para os Heteroptera, mas podemos verificar que esta associação não envolve a extremidade que possui a RON. Essas regiões nunca participam da associação (Figura 9e). Em *R. whitei* não foi observado marcação da região da RON em nenhum dos autossomos. Na metáfase, desta espécie, observou-se três autossomos com impregnação pela prata ao redor da bainha pericromossômica bem evidente (Figura 9f). A marcação em *R. sp.* também foi ao redor da bainha pericromossômica, envolvendo um maior número de autossomos, mas menos impregnado (Figura 9g). No final da telófase uma das células recentemente formadas de *R. whitei* possui impregnação pela prata (Figura 10a), enquanto *R. sp.* não possui marcação (Figura 10b). O processo de espermiogênese inicia-se com espermatídes arredondadas podendo apresentar (*R. whitei*) ou não (*R. sp.*) material impregnado pela prata. O material impregnado de *R. whitei* são arredondados e fortemente corados que localizam-se próximo à cromatina (Figura 10c-e). Com o alongamento ocorre a diminuição da impregnação pelos íons prata e estes ficam distribuídos uniformemente por toda a espermatíde (Figura 10 f-g). No final do processo as espermatídes de *R. whitei* possuem forte impregnação na região anterior da cabeça (Figura 10h).

Família Notonectidae

Os núcleos poliplóides de *Martarega sp.* são alongados e possuem um corpúsculo arredondado e grande (Figura 11a). No início da prófase I (leptóteno) há dois corpúsculos arredondados, sendo um maior que o outro (Figura 11b). Com o processo de condensação da cromatina há, ainda, a observação dos dois corpúsculos, mas há redução do tamanho, sendo que um deles é em torno de sete vezes maior e menos impregnado que o outro (Figura 11c). No leptóteno/paquítenu a redução dos corpúsculos continua, podendo, ainda, serem observados os dois corpúsculos (Figura 12a). No diplóteno um único corpúsculo grande e fortemente impregnado é observado (Figura 12b). Na metáfase I observa-se duas marcações, que possivelmente é a da RON localizadas

na região telomérica. Diferenciando apenas do fato de que, em um dos cromossomos a associação entre os homólogos não envolve a região da RON e no outro há o envolvimento. Em ambos os cromossomos apenas a RON de um dos homólogos está ativa (Figura 13a). Na metáfase, há ainda outros autossomos na qual há impregnação pela prata ao redor da bainha pericromossômica (Figura 13a). No início da espermiogênese, as espermatídes arredondadas apresentam impregnação pela prata em algumas regiões do envoltório nuclear (Figura 13b). Com o alongamento há impregnação em duas regiões distintas da espermatíde, uma maior na região anterior e uma bem menor na região posterior (Figura 13c). Na figura 13d a marcação pela prata encontra-se de maneira uniforme.

Discussão

Os testículos dos Heteroptera são formados por números variáveis de lobos e recobertos por membrana de diferentes colorações. Espécies de Coreidae analisadas por Souza et al. (2007c) apresentaram sete lobos recobertos por membrana avermelhada. *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae), também, possui testículo recoberto por membrana avermelhada, mas é constituído de seis lobos alongados, sendo o sexto interno ao quinto (SOUZA et al., 2007a), *Mormidae quinquelutuim*, *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus* (Pentatomidae) possuem, também, membrana avermelhada recobrindo o testículo, mas o número de lobos alongados encontrado foi de 3, 4, e 4, respectivamente (SOUZA et al., 2008), *Nysius californicus* (Lygaeidae) apresenta sete lobos alongados de tamanhos similares e recobertos com membrana avermelhada (SOUZA et al., 2007b). As espécies da família Veliidae (*Rhagovelia whitei* e *R. sp.*) analisadas no presente trabalho apresentaram testículos arredondados e constituídos de um único lobo e a espécie da família Notonectidae (*Martarega sp.*) apresentou testículos espiralados formados por dois lobos. Ambas as famílias apresentaram os testículos envoltos por membrana transparente, diferenciando-se das outras famílias de Heteroptera terrestres, com relação ao formato e membrana que os

reveste. Apesar destas diferenças, não há nenhum relato, na literatura, que confirme essa relação com alguma família em especial.

Outra característica encontrada nesses organismos foi a presença de grande quantidade de tecido adiposo no interior do abdome. Acreditamos que esta característica esteja relacionada com o grande gasto energético que estas espécies necessitam para a sobrevivência em ambientes aquáticos. Além disso, observamos que o tamanho das células meióticas testiculares das espécies terrestres são bem menores do que as dos aquáticos e quando comparamos as aquáticas observamos que as células das famílias Gerridae e Veliidae são menores do que as da família Notonectidae.

Este é mais um dado que reforça o habitat como um fator muito importante para, por exemplo, a definição do tamanho das células, pois indivíduos das famílias Gerridae e Veliidae vivem na tensão superficial das águas, enquanto da família Notonectidae são subaquáticos, portanto, esta última necessita de uma maior quantidade de energia para sua sobrevivência.

Com relação ao sistema cromossômico do sexo e o complemento cromossômico das espécies de Veliidae, analisadas no presente trabalho, elas apresentaram o mesmo sistema (X0), mas diferiram com relação ao complemento cromossômico (23 para *Rhagovelia* sp. e 39 cromossomos para *R. whitei*). Segundo os poucos trabalhos citogenéticos de espécies de Veliidae todos os descritos apresentaram sistema cromossômico do sexo X0, mas diferiram com relação ao complemento cromossômico: *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata*, $2n= 21 (20A + X0)$, *Velia currens* e *V. sp.* $2n= 25 (24A + X0)$ (COBBEN, 1968; POISSON, 1936; UESHIMA, 1979). Apesar das poucas espécies descritas na literatura e as analisadas no presente trabalho terem apresentado o mesmo sistema cromossômico do sexo, X0, Takenouchi e Muramoto (1971) relataram o sistema XY para *Microvelia douglasi*, mas segundo Ueshima (1979) e, também, nossa sugestão é a de que haja uma reanálise desta espécie e que outras espécies sejam analisadas para confirmar o sistema cromossômico do sexo nesta família.

Com relação às espécies da família Notonectidae todas as descritas na literatura apresentaram m-cromossomos, mas diferiram com relação

ao sistema cromossômico do sexo (X_1X_2 , *Anisops*; XY, *Notonecta*) e o complemento cromossômico de 24 ou 26 cromossomos (UESHIMA, 1979). A espécie *Martarega* sp. analisada no presente trabalho apresentou, também, m-cromossomos e 26 ($2n= 22A + 2m + XY$) cromossomos. Assim como a família Veliidae, esta, também, precisa ser mais amplamente estudada para chegarmos ao sistema cromossômico do sexo padrão da família.

Outras características da espermatogênese como a presença de cromossomos holocêntricos, quiasmas intersticiais e/ou terminais, uma única região heteropicnótica nas células meióticas, associação telomérica dos cromossomos, meiose reducional para os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais, configuração em anel dos autossomos nas metáfases são características que são padrões em todos os Heteroptera analisados, independentemente da família, do habitat ou do hábito alimentar (SOUZA et al., 2007a,b,c, 2008). Talvez uma das únicas diferenças encontradas durante a espermatogênese seja durante a espermiogênese. A morfologia das espermátides são bastante diferentes se compararmos os terrestres e os aquáticos, principalmente na fase de alongamento. Os terrestres apresentam espermátides, em alongamento, em forma de elipse, assim denominada, por nós, segundo a sua forma geométrica, enquanto todos os aquáticos apresentam-se em forma de bastão e, algumas, possuem uma vesícula grande, mais uma indicação de que eles possuem uma reserva maior de produtos da síntese metabólica, do que os demais Heteroptera terrestres.

Após impregnação por íons prata há como diferenciar as famílias aquáticas, pois os núcleos poliplóides das células nutritivas de Veliidae apresentam vários corpúsculos prata positivo, enquanto Notonectidae apresenta um único. Outra característica, já mencionada, é com relação à atividade sintética das células de Veliidae e, isto pode ser confirmado pelo tamanho e coloração das estruturas impregnadas pela prata, nucléolos que permanecem ao longo da prófase I e, comparativamente, as células da família Notonectidae são maiores, portanto, isto pode, realmente, estar relacionado com o meio em que eles vivem, pois sabe-se que o tamanho desta estrutura está relacionado com a atividade biossintética 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 (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Porém, são relações que ainda devem ser melhores estudadas.

Com relação ao comportamento nucleolar durante a meiose observa-se que as espécies de Heteroptera comportam-se de maneira semelhante aos processos descritos em plantas, ou seja, um grupo dessas proteínas permanece associado com às RONS; outro grupo localiza-se na periferia dos cromossomos, onde permanece desde a prófase tardia até a telófase inicial e um terceiro grupo de proteínas e também RNAs ficam uniformemente distribuídos no citoplasma entre a prófase e a telófase (OCHS et al., 1985; FAKAN; HERNANDEZ-VERDUN, 1986; FISCHER et al., 1991; WACHTLER; STAHL, 1993; SCHWARZACHER; WACHTLER, 1993; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1995; DUNDR et al., 1997).

As proteínas que foram localizadas na região da RON foram descritas em Belostomatidae nos telômeros dos cromossomos sexuais X e Y, (*Belostoma oxyurum* e *B. micantulum*), ou na região telomérica de um autossomo (*Belostoma elegans*) (PAPESCHI; BRESSA, 2002). Nos Coreidae, uma única RON está presente na região intersticial do maior autossomo de *Pachylis argentinus* (PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica de um autossomo em *Carlisi wahlbergi* (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995) e *Spartocera fusca* (CATTANI; PAPESCHI, 2004). Nos Pentatomidae e Gerridae, uma única RON foi detectada na região telomérica de um autossomo em *Edessa meditabunda* e *Limnogonus aduncus*, respectivamente (REBAGLIATI et al., 2003; CASTANHOLE et al., 2008), na posição mediana do maior autossomo em *Nezara viridula* (CAMACHO et al., 1985; PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica do cromossomo Y em *Graphosoma italicum* (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996).

Outra classe de proteínas foi encontrada na bainha pericromossômica nos cromossomos metafásicos e anafásicos em *Antitheucus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae) e *Nysius californicus* (Lygaeidae) (SOUZA et al., 2007a,b). Em *Triatoma brasiliensis* e *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae),

corpúsculos corados com Ag-Nor permaneceram observáveis até a metáfase I (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Em *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae) corpúsculos nucleolares foram observados até a metáfase II (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995), enquanto em *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) e *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae) os nucléolos foram detectados nas placas metafásicas de espermátocitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947).

Em *Rhagovelia* sp. e *Martarega* sp. observamos a presença de uma ou duas RONS nas regiões teloméricas dos autossomos e ao redor da bainha pericromossômica, respectivamente.

O processo de impregnação por íons prata, também, varia muito durante a espermiogênese. Segundo Tartarotti e Azeredo-Oliveira (1999) em espécies de *Panstrogylus* (Heteroptera) as marcações de prata foram visualizadas somente até a espermátide inicial (arredondada) desaparecendo durante sua alongação, corroborando a hipótese de reativação pós-meiótica dos genes para RNAr. Esse processo foi observado, também, em mamíferos e outros vertebrados (HOFGARTNER et al., 1979; SUMNER, 1990). O número e a localização dos corpúsculos prata positivo variam, também, entre as espécies de Heteroptera (SOUZA et al., 2007a,b, 2008). As espécies de Veliidae e Notonectidae também apresentaram comportamentos diferentes. Como pode ser observado a maioria das características são comuns para todas as espécies de Heteroptera, necessitando de maiores estudos citogenéticos e moleculares para um resultado mais conclusivo, já que a técnica de impregnação pela prata não é específica para evidenciar estruturas nucleolares, podendo, também, ser utilizada para visualização de mitocôndrias, complexo de Golgi, entre outros.

Agradecimentos

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

Referências

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; FUMAGALLI, E.; VAN DOESBURG, P.H.; LARRAMENDY, M.L. Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. **Folia Biologica** (Krakow), 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 *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed C-banding and silver impregnation. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 27, p. 490-497, 1985.

CASTANHOLE, M. M. U.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained NOR revealing chromosomal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p.1398-1407, 2008.

CATTANI, M. V.; PAPESCHI, A. G. Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera). **Hereditas**, v.140, n. 2 , p. 105-111, 2004.

COBBEN, R.H. Evolutionary trends in Heteroptera. Part I. Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. **Centre for Agricultural Publishing and documentation**, Wageningen, 475 p, 1968.

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.

DUNDR, M.; MEIER, U.T.; LEWIS, N.; REKOSH, D.; HAMMARSKJÖLD, M.L.; OLSON, M.O.J. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. **Chromosoma**, v. 105, p. 407-417, 1997.

FAIRBAIRN, D.J. Does alary dimorphism imply dispersal dimorphism in the waterstrider, *Gerris remigis*. **Ecological Entomology**, v.11, p. 355-368, 1986.

FAKKAN, S.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the Nucleolar organizer regions. **Biology of the Cell.**, v.56, p. 189-205, 1986.

FISCHER, E.H.; CHARBONNEAU, H.; TONKS, N.K. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. **Science**, v. 253, p. 401-406, 1991.

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

GONZÁLEZ-GARCÍA, J.M; RUFAS, J.S; ANTONIO, C.; SUJA, J.A. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. **Chromosoma**, v. 104, n. 4, p. 287-97, 1995.

GONZÁLEZ-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.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosome numbers, sex determining systems, and patterns of the C-heterochromatin distribution in 13 species de Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). **Folia Biologica** (Krakow), v. 49, n. 1-2, p. 29-41, 2001.

HOFGARTNER, F. J., SCHMID, M., KRONE, M., ZENZES, M. T. ENGEL, W. Pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in mammals as analyzed by silverstaining. **Chromosoma**, v. 71, p. 197-216, 1979.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I step method. **Experientia**, v. 36, p. 104-105, 1980.

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.

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.

NUMMELIN, M.; LODENIUS, M.; TULISALO, E. Water striders (Heteroptera, Gerridae) as bioindicators of heavy metal pollution. **Entomologica Fennica**, v.8, p. 185-191, 1998.

OCHS, R.L.; LISCHWE, M.A.; SHEN, E.; CARROLL, R.E.; BUSCH, H. Nucleologensis: Composition and fate of prenucleolar bodies. **Chromosoma**, v. 92, n. 5, p. 330-336, 1985.

PAPESCHI, A.G.; BRESSA, M.J. Cytogenetic studies in Belostomatidae from Argentina. **Abstracts of the second quadrennial meeting of the International Heteropterist Society**, v. 46, 2002.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; BRESSA, M.J.; GREIZERSTEIN, E.J.; LÍA, 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.

POISSON, R. Nouvelles observations sur le processus espermatogénétique dans les éléments sexuels d' Hemipteres aquatiques. **Archives the Zoologie Experimentale et Generale**, v.78, p. 133-194, 1936.

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

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 of Morphology**, v. 67, p. 123-141, 1940.

SCHWARZACHER, H.G; WACHTLER, F. The nucleolus. **Anatomy and Embryology**, v. 188, p. 515-536, 1993.

SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microscopia Electronica y Biología 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, 2007a.

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, 2007b.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007c.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of *Mormidea*

quinqueluteum, *Oebalus poecilus* and *Oebalus ypsilon* (Heteroptera, Pentatomidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n. 3, p. 686-691, 2008.

SPEHAR, R.L.; ANDERSON, R.L.; FIANDT, J.T. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic evertebrates. **Environmental Pollution**, v.15, p. 195-208, 1978.

STEINNES, E. Biomonitoring of air pollution by heavy metals. In: Ottar, B.; Pacyna, J. (eds.), **Control and Fate of Atmospheric Heavy Metals**, p.321-328. Kluwer, Dordrecht, 1989.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. Unwin Hyman, London, 1990.

TAKENOUCI, Y.; MURAMOTO, N. A study of the chromosomes in three species of heteropteran insects (Anthocoridae and Veliidae: Heteroptera). (In Japanese). **Journal of Hokkaido University of Education**, IIB, v. 22, p. 23-25, 1971.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. **Cytobios**, v. 99 (391), p. 113-122, 1999.

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. **Animal cytogenetics**, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera. Gebruder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 117 pp., 1979.

WACHTLER, F. STAHL, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation. **Micron**, v.24, p. 473-505, 1993.

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

YOSHIDA, T. Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. **Journal of the Faculty of Science- Hokkaido University. (Zool.)**, v. 9, p. 243-249, 1947.

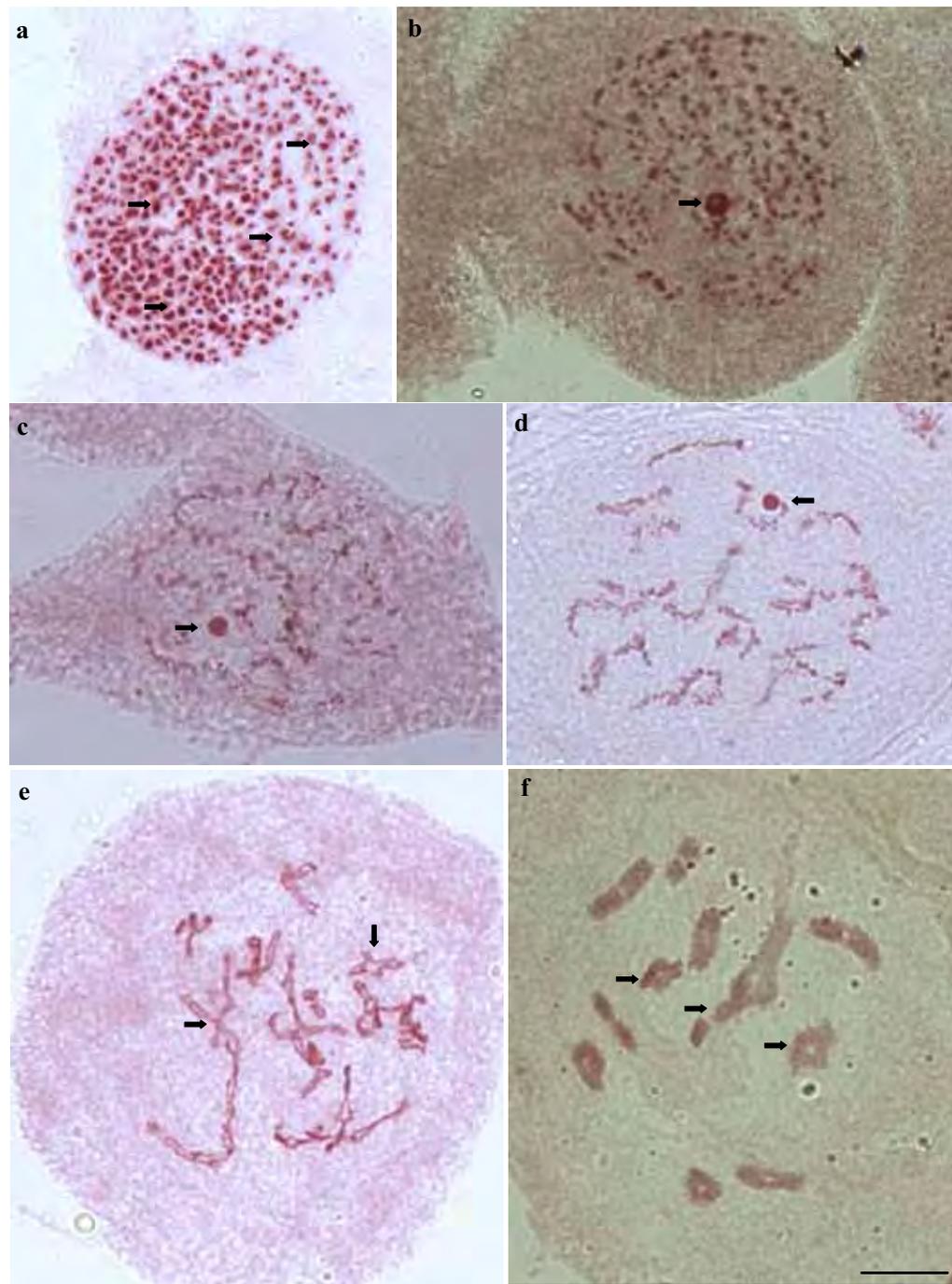


Figura 1. Células testiculares de machos adultos de *Rhagovelia whitei* (a, c, d, e) e *Rhagovelia* sp. (b, f) coradas com orceína lacto-acética. a) Núcleo poliplóide com várias regiões heteropicnóticas distribuídas por toda extensão da célula (setas); b,c) prófases I em estágio inicial do desenvolvimento (leptóteno), com uma região heteropicnótica (setas); d) paquíteno com região heteropicnótica (seta); e) célula em diplóteno, com a presença de quiasmas (setas); f) diacinese: notar a presença de quiasmas (setas). Barra: 10 µm

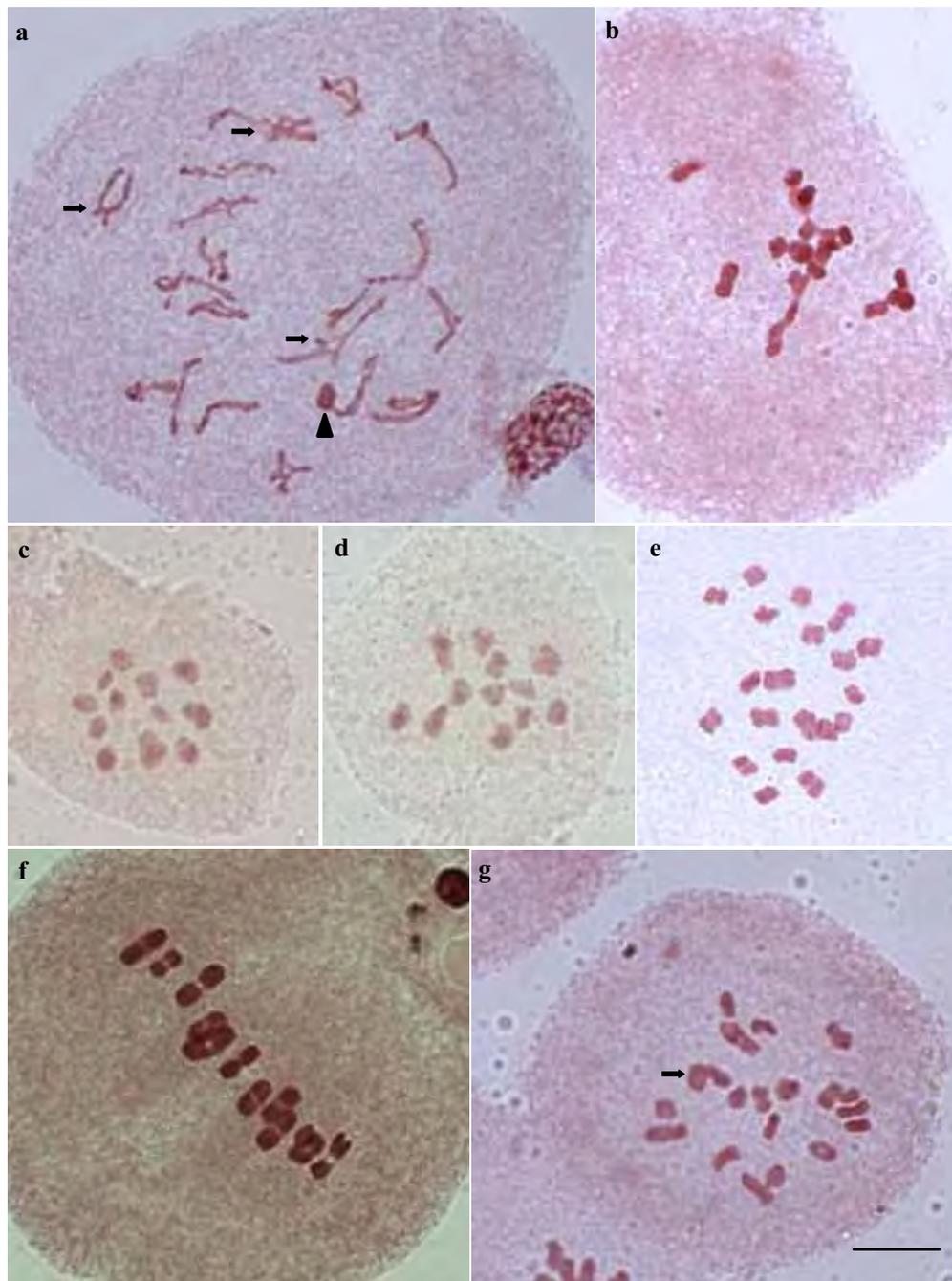


Figura 2. Células testiculares de machos adultos de *Rhagovelia whitei* (a, b, e, g) e *Rhagovelia* sp. (c, d, f) coradas com orceína lacto-acética. a) Célula no diplóteno/diacinese: observar a presença de quiasmas na maioria dos autossomos (setas) e a associação do material heteropicnótico com um cromossomo (cabeça de seta); b) observar que no final da prófase os cromossomos associam-se formando dois grupos, sendo um maior que o outro, podendo ainda, observar cromossomos isolados. c-e) metáfases em visão polar apresentando 23 cromossomos (22A + X0) (c,d) e 39 cromossomos (38A + X0) (e); f) metáfase I em visão lateral, podendo-se observar, claramente a associação telomérica entre os cromossomos; g) metáfase I em visão polar: observar que o cromossomo sexual está associado com um autossomo (seta). Barra: 10 µm

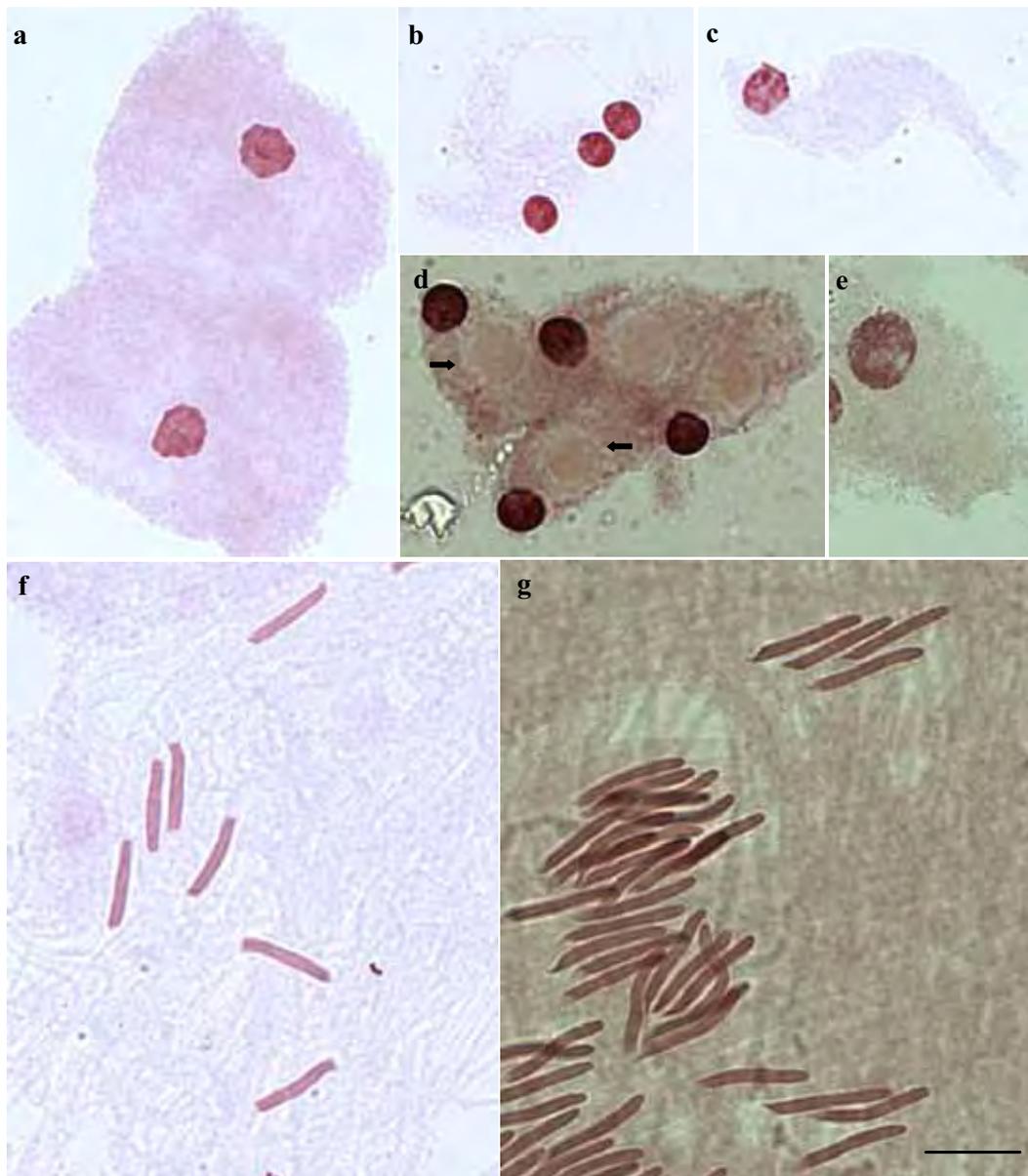


Figura 3. Células testiculares de machos adultos de *Rhagovelia whitei* (a, b, c, f) e *Rhagovelia* sp. (d, e, g) coradas com orceína lacto-acética. a) Telófase; b,c) espermátides com material cromatínico arredondado; d) espermátides com a presença de uma vesícula grande (setas); e) espermátide em alongamento; f,g) espermátides com a cabeça em forma de bastão intensamente corada pela orceína. Barra: 10 μ m

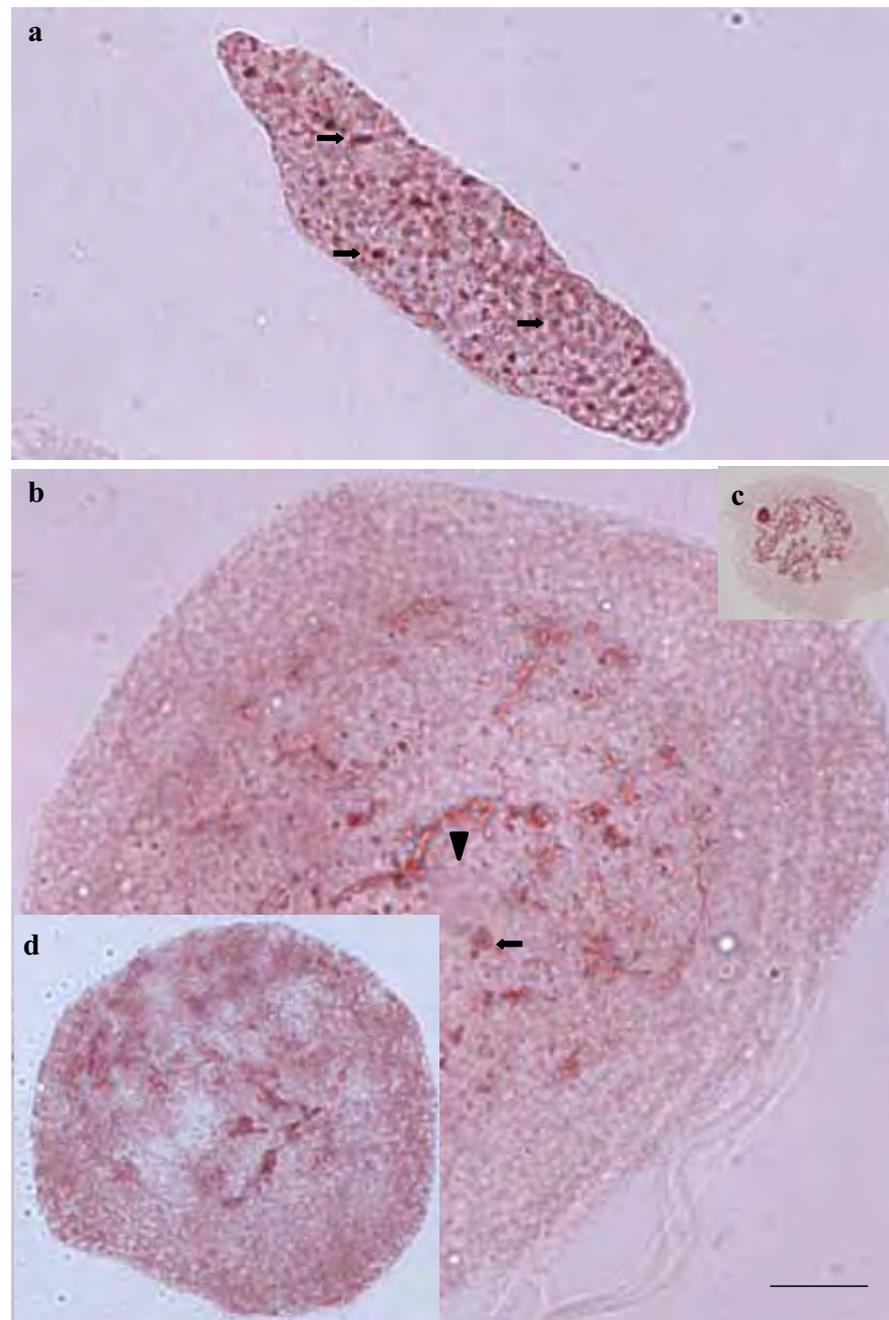


Figura 4. Células testiculares de machos adultos de *Martarega* sp. coradas com orceína lacto-acética. a) Núcleo poliplóide com várias regiões heteropicnóticas distribuídas por toda extensão da célula (setas); b) prófases iniciando-se o processo de condensação dos cromossomos, com a presença de um corpúsculo heteropicnótico (seta). Notar, ainda, a presença do nucléolo (cabeça de seta). Observar em destaque uma célula de *Thianta perditor* (Pentatomidae, c) e de *Halobatopsis platensis* (Gerridae, d). Notar que as células apresentam tamanhos muito diferentes, considerando-se que estão com a mesma ampliação. Barra: 10 μm

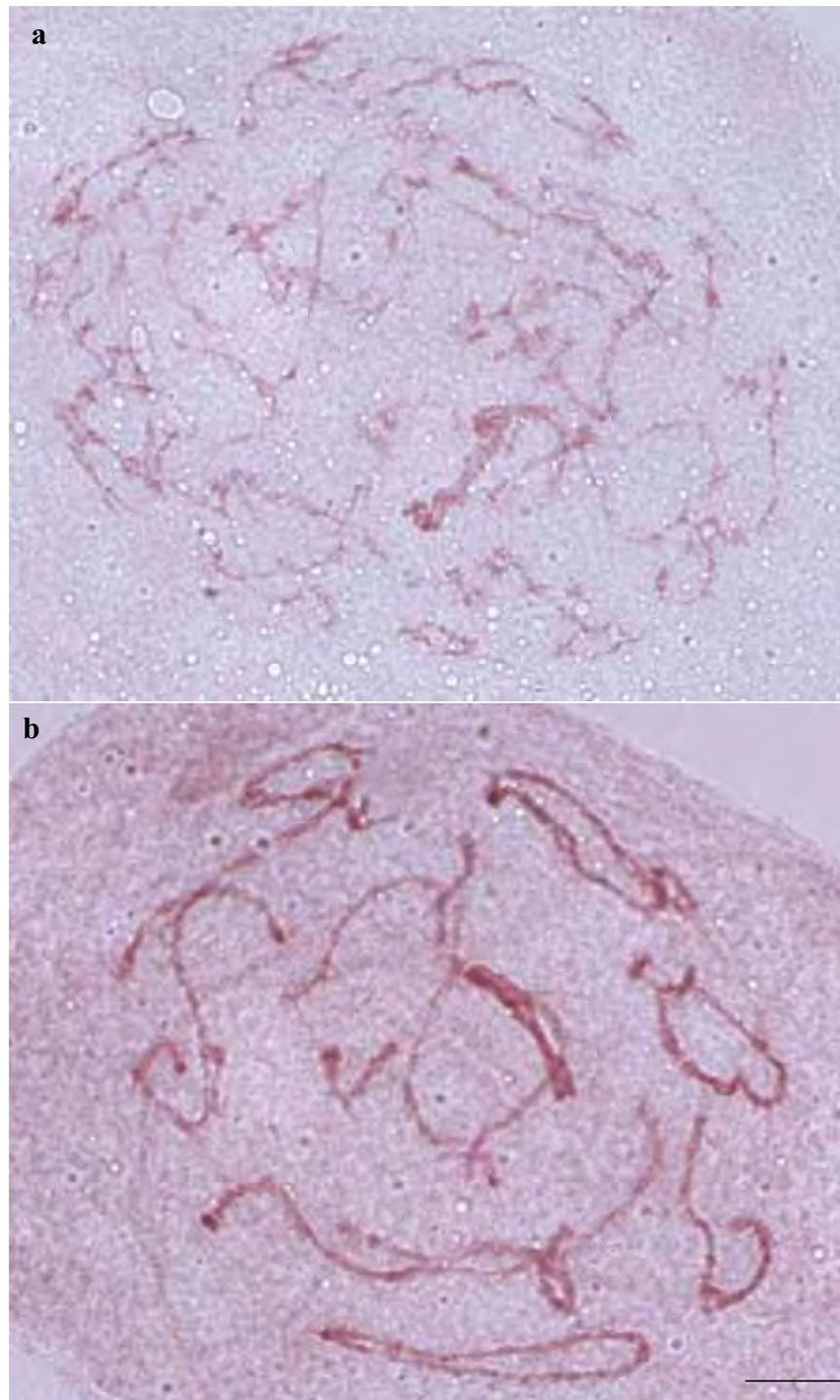


Figura 5. Células testiculares de machos adultos de *Martarega* sp. coradas com orceína lacto-acética. a,b) Células em prófase (Paquíteno). Observar o tamanho e a condensação dos cromossomos. Barra: 10 μ m

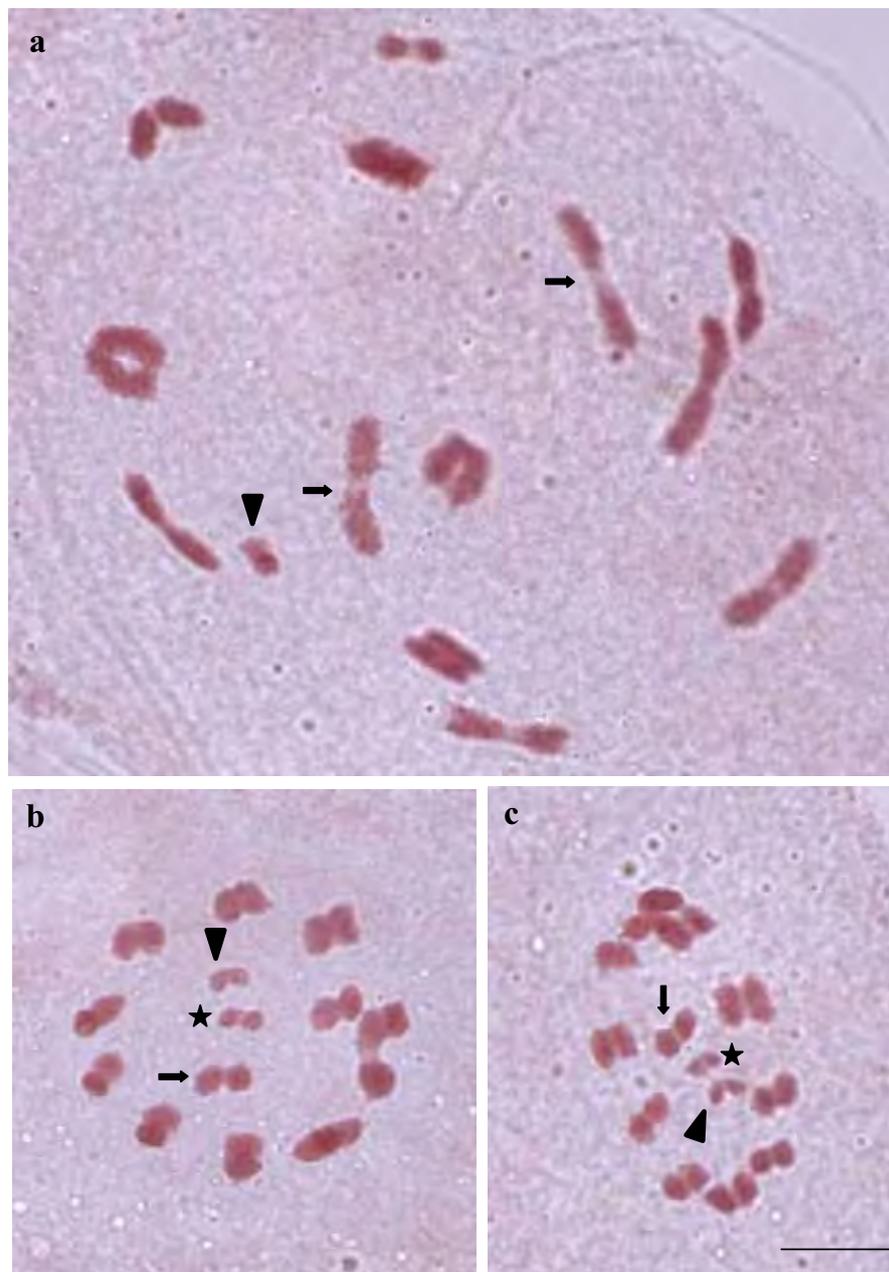


Figura 6. Células testiculares de machos adultos de *Martarega* sp. coradas com orceína lacto-acética. a) Célula em diplóteno/diacinese podendo-se observar a associação telomérica entre os cromossomos (setas). Observar, também os m-cromossomos (cabeça de seta); b,c) Metáfases I, em visão polar, com os autossomos formando um anel, com os cromossomos sexuais XY (X, setas; Y, asteriscos), e os m-cromossomos (cabeças de seta) no centro deste. Complemento cromossômico de *Martarega* sp. é de $2n= 26$ (22A + 2m+ XY). Barra: 10 μ m

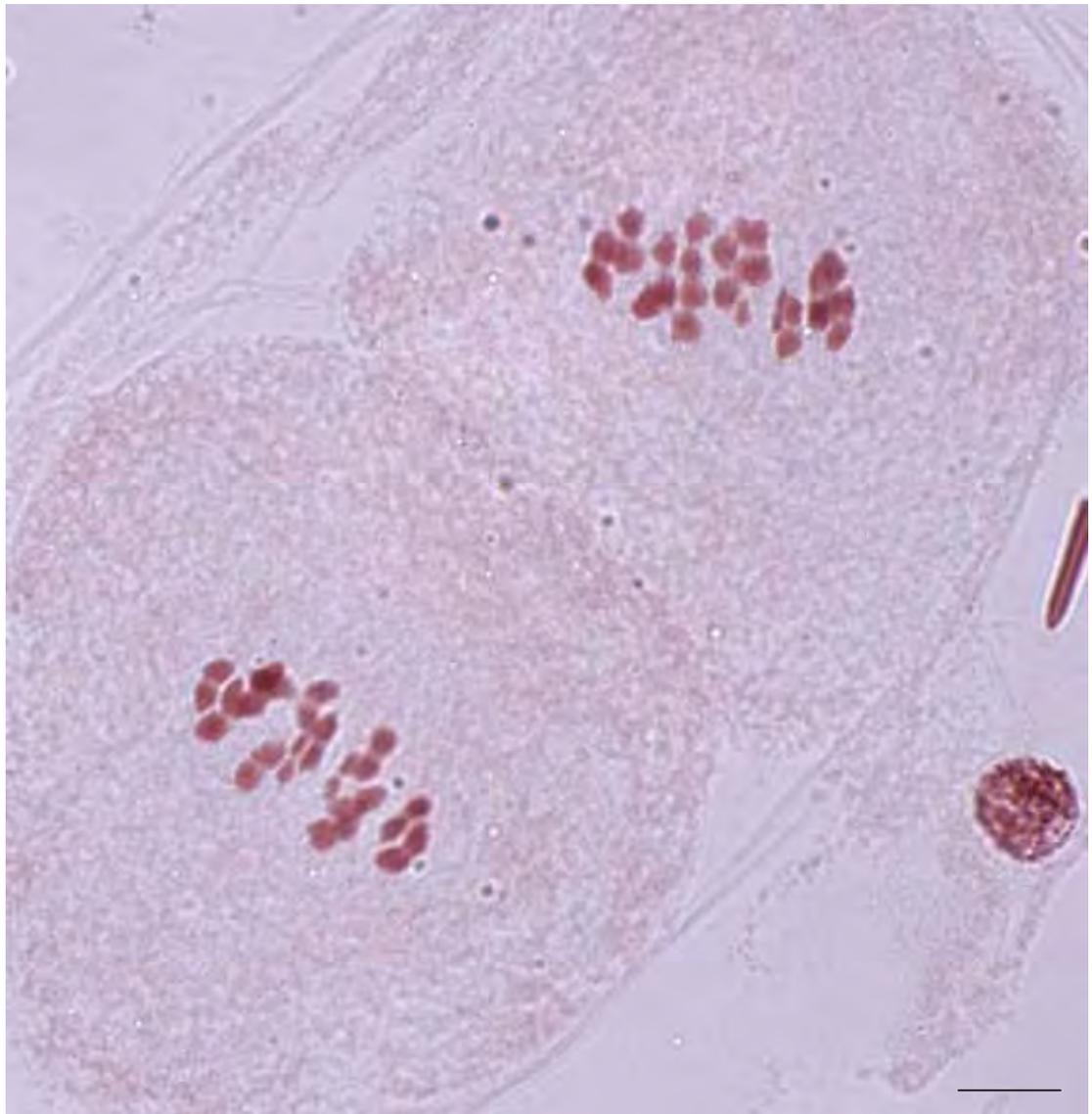


Figura 7. Célula testicular de machos adultos de *Martarega* sp. coradas com orceína lacto-acética em telófase, notar o tamanho das células em formação. Barra: 10 μ m

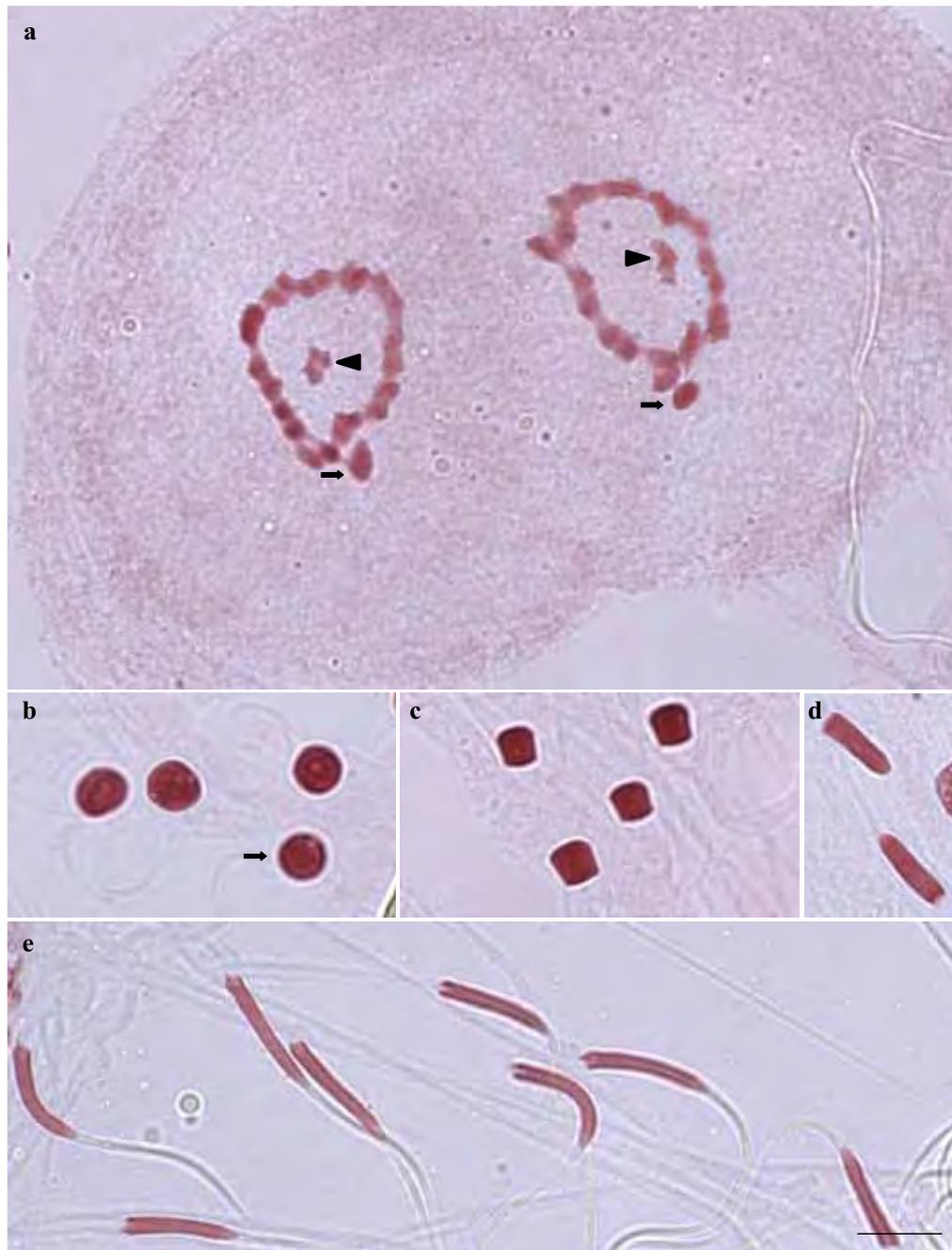


Figura 8. Células testiculares de machos adultos de *Martarega* sp. coradas com orceína lacto-acética. a) Célula em telófase com os autossomos associados pelas regiões teloméricas formando um círculo e no seu interior há cromatina, possivelmente, os microcromossomos (cabeças de seta), ligado ao círculo e localizado na região externa ao círculo há um material heteroploidico que possivelmente são os cromossomos sexuais (setas); b) espermátide arredondada com cromatina distribuída uniformemente; c) espermátide em início de alongamento, passando de arredondada para quadrada; d) posteriormente, elas tomam forma de bastão com material cromatínico distribuído uniformemente; e) observar a região da cabeça e da cauda da espermátide em formação. Barra: 10 μ m

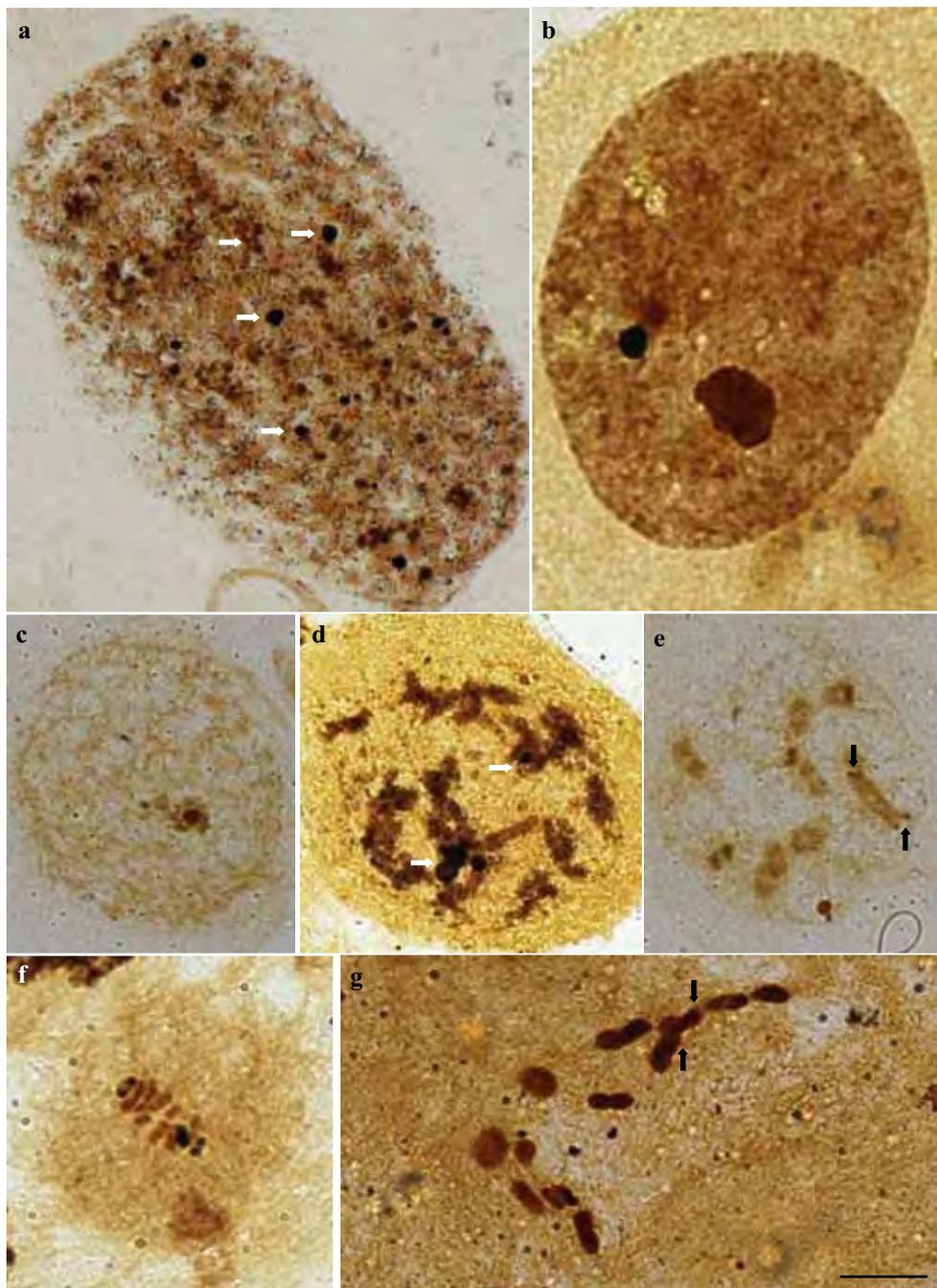


Figura 9. Células testiculares de machos adultos de *Rhagovelia whitei* (a, b, d, f) e *Rhagovelia* sp. (c, e, g) impregnadas com íons prata. a) Núcleo poliplóide com vários corpúsculos, fortemente impregnados pela prata e outros menos impregnados, espalhados pelo núcleo (setas); b) Prófase em estágio inicial (leptóteno), com dois corpúsculos, sendo um maior que o outro; c) Prófase inicial com dois corpúsculos sendo, ainda, um maior do que o outro; d) observar que os corpúsculos já se desorganizaram podendo-se observar este material somente em alguns cromossomos (setas); e) diplóteno/diacinese mostrando um cromossomo com marcação da NOR nas regiões teloméricas (setas); f, g) metáfases mostrando a presença de íons prata ao redor da bainha pericromossômica, sendo mais evidente em *R. whitei* (g, setas). Barra: 10 μ m

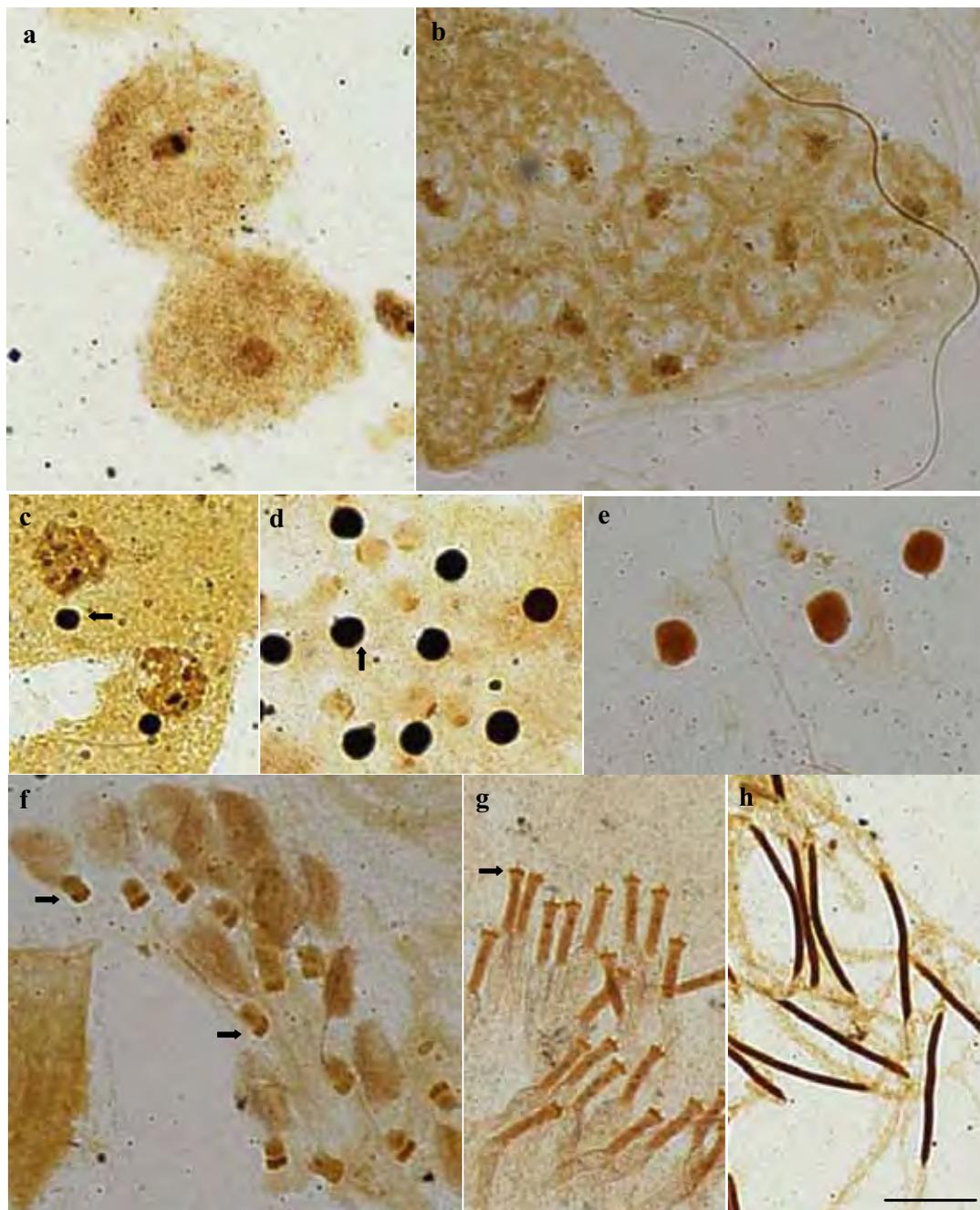


Figura 10. Células testiculares de machos adultos de *Rhagovelia whitei* (a, c, d, g, h) e *Rhagovelia* sp. (b, e, f) impregnadas com íons prata. a) Telófase com impregnação em somente uma das células recentemente formadas; b) células sem marcação; c,d) espermátides arredondadas com marcação prata positiva próxima ao material cromatínico (setas); e) espermátides sem marcação pela prata; f,g) espermátides alongando-se, apresentando maior impregnação pela prata na região anterior da cabeça (setas). h) espermátides alongadas com intensa marcação pela prata. Barra: 10 μ m

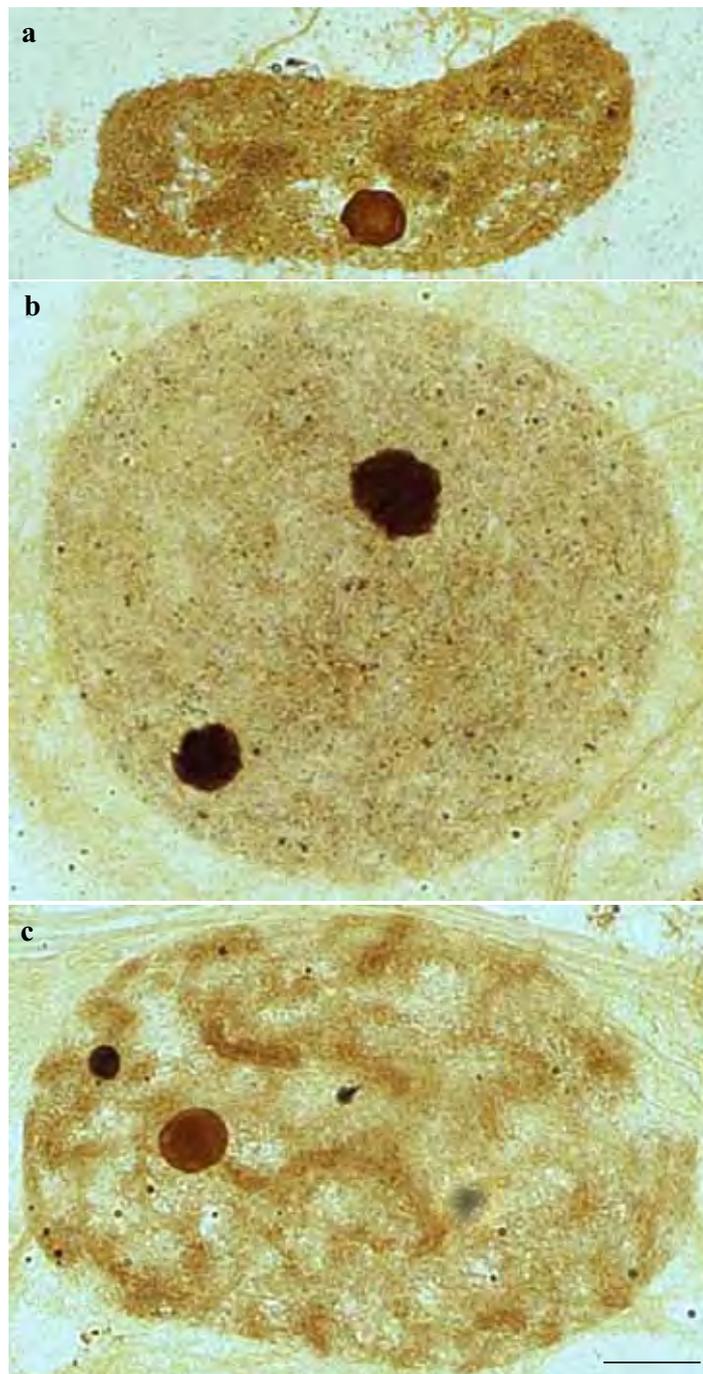


Figura 11. Células testiculares de machos adultos de *Martarega* sp. impregnadas com íons prata. a) Núcleo poliplóide com um grande corpúsculo impregnado pela prata; b) prófase inicial, apresentando dois corpúsculos, sendo um maior que o outro; c) prófase inicial (zigóteno), começando a condensação dos cromossomos e apresentando os dois corpúsculos, sendo um maior que o outro e impregnados diferentemente. Barra: 10 μ m

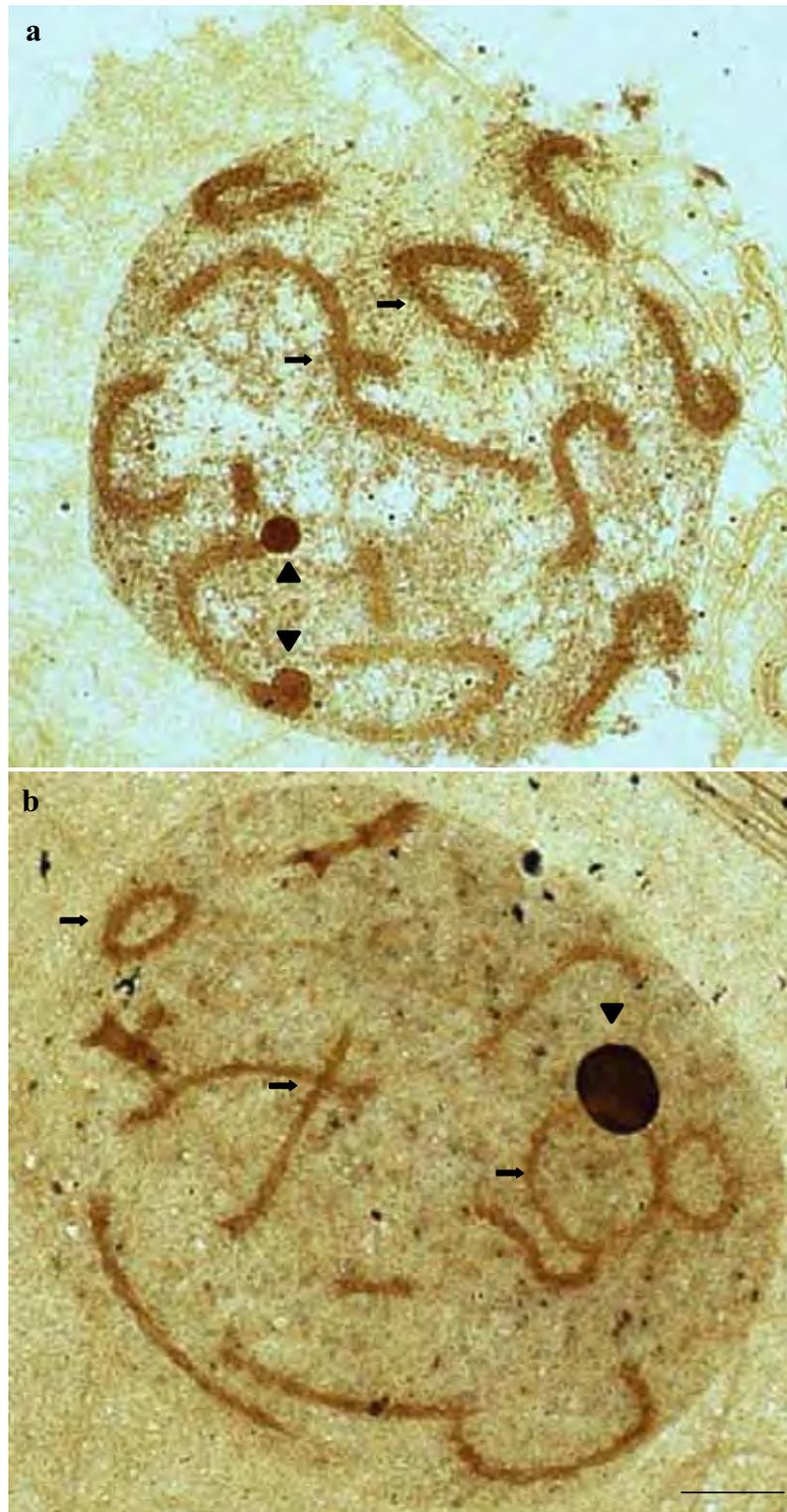


Figura 12. Células testiculares de machos adultos de *Martarega sp.* impregnadas com íons prata. a,b) Paquítenos/diplótenos apresentando quiasmas intersticiais e terminais (setas) e dois corpúsculos nucleolares grandes (cabeças de seta). Barra: 10 μ m

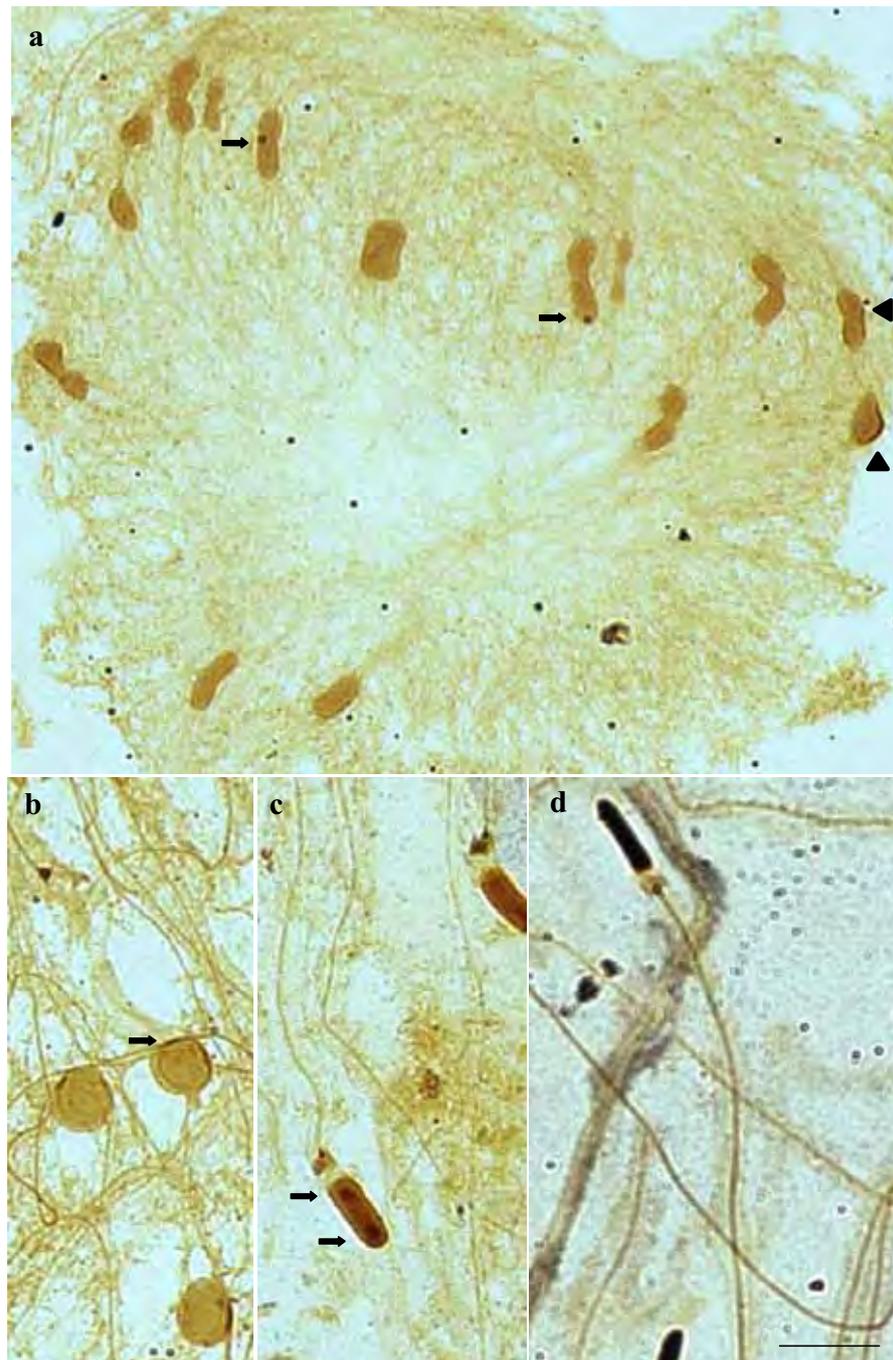


Figura 13. Células testiculares de machos adultos de *Martarega* sp. impregnadas com íons prata. a) Metáfase I apresentando possível marcação pela NOR em dois autossomos (setas) e na bainha pericromossômica em outros autossomos (cabeças de setas); b) espermatídes arredondadas, com marcação na região do envoltório nuclear (seta); c) espermatíde em forma de bastão, com duas marcações pela prata, sendo uma na parte anterior e a outra na posterior da cabeça (setas); d) espermatíde alongada impregnada uniformemente pela prata. Barra: 10 μ m

IV. DISCUSSÃO GERAL

IV. DISCUSSÃO GERAL

Os testículos dos Heteroptera são formados por números variáveis de lobos e recobertos por membrana de diferentes colorações. Espécies de Coreidae analisadas por Souza et al. (2007c) apresentaram sete lobos recobertos por membrana avermelhada. *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae), também, possui testículo recoberto por membrana avermelhada, mas é constituído de seis lobos alongados, sendo o sexto interno ao quinto (SOUZA et al., 2007a), *Mormidae quinquelutuim*, *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus* (Pentatomidae) possuem, também, membrana avermelhada recobrindo o testículo, mas o número de lobos alongados encontrado foi de 3, 4, e 4, respectivamente (SOUZA et al., 2008), *Nysius californicus* (Lygaeidae) apresenta sete lobos alongados de tamanhos similares e recobertos com membrana avermelhada (SOUZA et al., 2007b). *Limnogonus aduncus* (Gerridae) apresentou testículos alongados, constituídos de 2 lobos cada (CASTANHOLE et al., 2008). Assim como *L. aduncus*, *Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris* e *Halobatopsis platensis*, outros representantes da família Gerridae analisadas, no presente trabalho, também apresentaram testículos arredondados e constituídos de 2 lobos cada. As espécies *Rhagovelia whitei* e *R. sp.* da família Veliidae analisadas apresentaram testículos arredondados e constituídos de um único lobo e a espécie da família Notonectidae, *Martarega sp.*, também analisadas no presente trabalho, apresentou testículos espiralados formados por dois lobos. Todas as famílias aquáticas estudadas, neste trabalho, apresentaram os testículos envoltos por membrana transparente, diferenciando-se das outras famílias de Heteroptera terrestres, que apresentaram membrana avermelhada. Apesar destas diferenças, não há nenhum relato, na literatura, que confirme se há alguma relação destas características com alguma família em especial.

Outra característica encontrada nesses organismos foi a presença de grande quantidade de tecido adiposo no interior do abdome. Acreditamos que esta característica esteja relacionada com o grande gasto energético que estas espécies necessitam para a sobrevivência em ambientes aquáticos. Além disso,

observamos que o tamanho das células meióticas testiculares das espécies terrestres são bem menores do que as dos aquáticos e quando comparamos as aquáticas observamos que as células das famílias Gerridae e Veliidae são menores do que as da família Notonectidae. Este é mais um dado que reforça o habitat como um fator muito importante para, por exemplo, a definição do tamanho das células, pois indivíduos das famílias Gerridae e Veliidae vivem na tensão superficial das águas, enquanto da família Notonectidae são subaquáticos, portanto, esta última necessita de uma maior quantidade de energia para sua sobrevivência.

Com relação ao sistema cromossômico do sexo e complemento cromossômico das espécies de Veliidae e Gerridae, analisadas no presente trabalho, elas apresentaram o mesmo sistema (X0), mas diferiram com relação ao complemento cromossômico (23 para *Rhagovelia* sp. e *L. aduncus*, 25 para *B. albinerva* e *H. platensis*, 29 para *C. palmaris* e 39 cromossomos para *R. whitei*). Segundo os poucos trabalhos citogenéticos, descritos na literatura de espécies de Veliidae, todos apresentaram sistema cromossômico do sexo X0, mas diferiram com relação ao complemento cromossômico: *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata* $2n= 21$ (20A + X0), *Velia currens* e *V.* sp. $2n= 25$ (24A +X0) (COBBEN, 1968; POISSON, 1936; UESHIMA, 1979). Apesar das poucas espécies descritas na literatura e as analisadas no presente trabalho terem, também, apresentado o mesmo sistema cromossômico do sexo, X0, Takenouchi e Muramoto (1971) relataram o sistema XY para *Microvelia douglasi*, mas segundo Ueshima (1979) e, também, nossa sugestão é a de que haja uma reanálise desta espécie e que outras espécies sejam analisadas para confirmar o sistema cromossômico do sexo nesta família. Com relação as espécies da família Gerridae o número cromossômico modal é de $2n= 21$ (20A + X0) ou $2n= 23$ (22A + X0), caracterizada por possuir sistema cromossômico do sexo X0, disposição cromossômica metafásica em anel e ausência de m-cromossomos (UESHIMA, 1979).

Com relação às espécies da família Notonectidae todas as descritas na literatura apresentaram m-cromossomos, mas diferiram com relação

ao sistema cromossômico do sexo (X_1X_2 , *Anisops*; XY, *Notonecta*) e o complemento cromossômico de 24 ou 26 cromossomos (UESHIMA, 1979). A espécie *Martarega* sp. analisada no presente trabalho apresentou, também, m-cromossomos e 26 ($2n= 22A + 2m + XY$) cromossomos.

Outras características da espermatogênese como a presença de cromossomos holocêntricos, quiasmas intersticiais e/ou terminais, uma única região heteropicnótica nas células meióticas, associação telomérica dos cromossomos, meiose reducional para os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais, configuração em anel dos autossomos nas metáfases são características que são padrões em todos os Heteroptera analisados, independentemente da família, do habitat ou do hábito alimentar (SOUZA et al., 2007a,b,c, 2008). Talvez uma das únicas diferenças encontradas durante a espermatogênese seja durante a espermiogênese. A morfologia das espermátides são bastante diferentes se compararmos os terrestres e os aquáticos, principalmente na fase de alongamento. Os terrestres apresentam espermátides, em alongamento, em forma de elipse, assim denominada, por nós, segundo a sua forma geométrica, enquanto todos os aquáticos apresentam-se em forma de bastão e, algumas, possuem uma vesícula grande, mais uma indicação de que eles possuem uma reserva maior de produtos da síntese metabólica, do que os demais Heteroptera terrestres.

Com relação ao comportamento nucleolar durante a meiose observa-se que as espécies de Heteroptera comportam-se de maneira semelhante aos processos descritos em plantas, ou seja, um grupo dessas proteínas permanece associado com as RONS; outro grupo se localiza na periferia dos cromossomos, onde permanece desde a prófase tardia até a telófase inicial e um terceiro grupo de proteínas e também RNAs ficam uniformemente distribuídos no citoplasma entre a prófase e a telófase (OCHS et al., 1985; FAKAN; HERNANDEZ-VERDUN, 1986; FISCHER et al., 1991; WACHTLER; STAHL, 1993; SCHWARZACHER; WACHTLER, 1993; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1995; DUNDR et al., 1997).

As proteínas que foram localizadas na região da RON foram descritas em Belostomatidae nos telômeros dos cromossomos sexuais X e Y,

(*Belostoma oxyurum* e *B. micantulum*), ou na região telomérica de um autossomo (*Belostoma elegans*) (PAPESCHI; BRESSA, 2002). Nos Coreidae, uma única RON está presente na região intersticial do maior autossomo de *Pachylis argentinus* (PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica de um autossomo em *Carlisi wahlbergi* (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995) e *Spartocera fusca* (CATTANI; PAPESCHI, 2004). Nos Pentatomidae e Gerridae, uma única região organizadora do nucléolo foi detectada na região telomérica de um autossomo em *Edessa meditabunda* e *Limnogonus aduncus*, respectivamente (REBAGLIATI et al., 2003; CASTANHOLE et al., 2008), na posição mediana do maior autossomo em *Nezara viridula* (CAMACHO et al., 1985; PAPESCHI et al., 2003) ou na região telomérica do cromossomo Y em *Graphosoma italicum* (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996).

Outra classe de proteínas foi encontrada na bainha pericromossômica nos cromossomos metafásicos e anafásicos em *Antitheucus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae) e *Nysius californicus* (Lygaeidae) (SOUZA et al., 2007a,b). Em *Triatoma brasiliensis* e *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), corpúsculos corados com Ag-Nor permaneceram observáveis até a metáfase I (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Em *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae) corpúsculos nucleolares foram observados até a metáfase II (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995), enquanto em *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) e *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae) os nucléolos foram detectados nas placas metafásicas de espermátocitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947).

Em *Rhagovelia* sp. e *Martarega* sp., espécies analisadas no presente trabalho, observamos a presença de uma ou duas RONS nas regiões teloméricas dos autossomos e ao redor da bainha pericromossômica, respectivamente.

O processo de impregnação por íons prata, também, varia muito durante a espermiogênese. Segundo Tartarotti e Azeredo-Oliveira (1999) em espécies de *Panstrogyllus* (Heteroptera) as marcações de prata foram visualizadas somente até a espermátide inicial (arredondada) desaparecendo durante sua

elongação, corroborando a hipótese de reativação pós-meiótica dos genes para RNAr. Esse processo foi observado, também, em mamíferos e outros vertebrados (HOFGARTNER et al., 1979; SUMNER, 1990). O número e a localização dos corpúsculos prata positivo variam, também, entre as espécies de Heteroptera (SOUZA et al., 2007a,b, 2008). As espécies de Veliidae e Notonectidae também apresentaram comportamentos diferentes. Como pode ser observado, a maioria das características são comuns para todas as espécies de Heteroptera, necessitando de maiores estudos citogenéticos e moleculares para um resultado mais conclusivo, já que a técnica de impregnação pela prata não é específica para evidenciar estruturas nucleolares, podendo, também, ser utilizada para visualização de mitocôndrias, complexo de Golgi, entre outros.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

Os trabalhos realizados com as espécies das famílias Gerridae (*Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris*, *Halobatopsis platensis*; *Limnogonus aduncus*), Notonectidae (*Martarega* sp.) e Veliidae (*Rhagovelia whitei* e *Rhagovelia* sp.) mostraram- nos:

- Que os testículos dessas espécies são arredondados (família Veliidae), alongados (Família Gerridae) ou espiralados (Família Notonectidae) e recobertos por membrana transparente;
- As espécies analisadas apresentaram grande quantidade de tecido adiposo ao dissecarmos-os, diferentemente de espécies terrestres, dessa maneira, pode estar relacionado ao gasto energético desses indivíduos;
- As células testiculares da família Notonectidae são bem maiores do que as das famílias Veliidae e Gerridae;
- Todas as espécies apresentaram sistema cromossômico do sexo X0, com exceção da espécie *Martarega* sp. (Notonectidae), que apresentou XY; o complemento cromossômico encontrado foi de $2n = 23$ ($22A + X0$, *L. aduncus* e *R.* sp.); 25 ($24A + X0$, *B. albinerva* e *H. platensis*); 26 ($22A + 2m + XY$, *Martarega* sp.); 29 ($28A + X0$, *C. palmaris*) e 39 ($38A + X0$, *R. whitei*) cromossomos;
- Todas as espécies analisadas apresentaram quiasmas intersticiais e/ou terminais;
- Todas as espécies de Gerridae apresentaram espermátides arredondadas do mesmo tamanho e com uma região heteropicnótica deslocada para a periferia do núcleo, excetuando *H. platensis* em que, as espermátides são oito vezes maiores do que das outras espécies;
- Todas as espécies analisadas apresentaram espermátides arredondadas adquirindo a forma de bastão;
- Algumas espécies apresentaram espermátides arredondadas com presença de vesícula, diferentemente dos indivíduos terrestres;
- A espécie *C. palmaris* (Gerridae) apresenta vários corpúsculos impregnados pela prata pequenos, arredondados e distribuídos pela prófase, já as espécies *B.*

albinerva e *H. platensis* apresentam uma massa sem morfologia definida e várias regiões impregnadas;

- A espécie *L. aduncus* (Gerridae), possui RON localizada na região telomérica de um autossomo; e a atividade telocinética não ocorre onde se localiza a RON ativa;
- Em *Martarega* sp. (Notonectidae) observou-se, na metáfase I, duas marcações que possivelmente são a da RON, localizadas na região telomérica;
- Em *R. whitei* e *R. sp.* (Veliidae) encontramos marcações pela prata ao redor da bainha pericromossômica e, possivelmente, marcação da RON em *R. sp.*;

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo, Brasil: Ed. Edgard Blucher LTDA., 653 pp., 1988.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; LARRAMENDY, M.L. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). I. Neo-XY in *Dysdercus albofasciatus* Berg 1878, a new sex chromosome determining system in Heteroptera. **Chromosome Research**, v. 7, p. 503-508, 1999.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G., MOLA, L.; LARRAMENDY, M.L. Autossomal univalents as a common meiotic feature in *Jadera haematoloma* and *Jadera sanguinolenta* (Heteroptera: Rhopalidae: Serinethinae). **European Journal of Entomology**, v. 98, p. 151-157, 2001.

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, M.L. Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. **Folia Biologica** (Krakow), v. 51, p. 135-141, 2003.

BROWN, D.D.; GURDON, J.B. Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.51, p. 139-146, 1964.

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 *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed C-

banding and silver impregnation. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 27, p. 490-497, 1985.

CASTANHOLE, M. M. U. C.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a marked RON revealing aspect of the chromosomal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p.1398-1407, 2008.

CATTANI, M.V.; GREIZERSTEIN, E.J.; PAPESCHI, A.G. Male meiotic behaviour and nucleolus organizer regions in *Camptischium clavipes* (Fabr.) (Coreidae, Heteroptera) analyzed by florescent banding and *in situ* hybridization. **Caryologia**, v. 57, n. 3, p. 267-273, 2004.

CATTANI, M.V.; PAPESCHI, A.G. Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera). **Hereditas**, v. 140, p. 105-111, 2004.

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.

COBBEN, R.H. Evolutionary trends in Heteroptera. Part I. Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. **Centre for Agricultural Publishing and documentation**, Wageningen, 475 p, 1968.

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.

DI CASTRO, M.; PRANTERA, G.; CIPRIANI, L.; ROCCHI, A. Silver staining analysis of nucleolar-organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). **Genetica**, v. 60, p. 163-166, 1983.

DUNDR, M.; MEIER, U.T.; LEWIS, N.; REKOSH, D.; HAMMARSKJÖLD, M.L.; OLSON, M.O.J. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. **Chromosoma**, v. 105, p. 407-417, 1997.

FAIRBAIRN, D.J. Does alary dimorphism imply dispersal dimorphism in the waterstrider, *Gerris remigis*. **Ecological Entomology**, v.11, p. 355-368, 1986.

FAKAN, S.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the Nucleolar organizer regions. **Biology of the Cell.**, v.56, p. 189-205, 1986.

FISCHER, E.H.; CHARBONNEAU, H.; TONKS, N.K. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. **Science**, v. 253, p. 401-406, 1991.

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

GONZÁLEZ-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.

GONZÁLEZ-GARCÍA, J.M; RUFAS, J.S; ANTONIO, C.; SUJA, J.A. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. **Chromosoma**, v. 104, n. 4, p. 287-97, 1995.

GROZEVA, S.M.; KUZNETSOVA, V.G. Karyotypes and some structural properties of the reproductive system of bugs of the subfamily Artheneinae (Heteroptera, Pentatomorpha, Lygaeidae). **Entomologicheskoye Obozreniye**, n. 4, p. 700-709, 1989.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosomes and their behaviour in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). **Hereditas**, v. 125, p. 31-36, 1996.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosome numbers, sex determining systems, and patterns of the C-heterochromatin distribution in 13 species de Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). **Folia Biologica** (Krakow), v. 49, n. 1-2, p. 29-41, 2001.

- HALKKA, O. Chromosome studies on the Hemiptera Homoptera Auchenorrhyncha. **Annales Academiae Scientiarum Fennicae.**, v. 43, p. 1-71, 1959.
- HOFGARTNER, F. J., SCHMID, M., KRONE, M., ZENZES, M. T. ENGEL, W. Pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in mammals as analyzed by silverstaining. **Chromosoma**, v. 71, p. 197–216, 1979.
- HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The Kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v. 12, p. 327-350, 1961.
- JACOBS, D.H. The evolution of a neo-XY1Y2 sex chromosome system by autosome sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarius* Jacobs (Heteroptera: Aradidae: Carventinae). **Chromosome Research**, v. 12, p. 175-191, 2004.
- JANDE, S.S. An analysis of the chromosomes in four species of the family Belostomatidae (Heteroptera, Cryptocerata). **Research Bulletin (NS) Panjab University**, v. 10, p. 25-34, 1959.
- JOHN, B.; KING, M. Pseudoterminalization, terminalization and non-chiasmata 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.
- KIRILLOVA, V.I. Chromosome numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Superfamilies Fulgoroidea, Cercopoidea, Cicadoidea. **Entomologicheskoe obozrenie**, v. 65, p. 115-125, 1986.
- KIRILLOVA, V.I. Chromosomes numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Karyotype peculiarities of the leafhoppers of the superfamilies Fulgoroidea, Cercopoidea, Cicadoidea . **Entomologicheskoe obozrenie**, v. 66, p. 321-337, 1987.

MANNA, G.K. **Chromosomes in evolution in Heteroptera**. In: SHARMA, A.K., ed. *Chromosomes in evolution of Eukaryotic groups*. Boca Raton Florida USA: CRC Press, p. 189-225, 1984.

McCLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Cell and Tissue Research**, 1934.

MOLA, L.M.; PAPESCHI, A.G. Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalents and B-chromosomes. **Heredity**, v. 71, p. 33-40, 1993.

MOTZKO, D.; RUTHMAN, 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.

NOKKALA, S.; GROZEVA, S. Aquiasmatic male meiosis in *Myrmedobia coleopratal* (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae). **Caryologia**, v. 53, n. 1, p. 5-8, 2000.

NOKKALA, S., GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 119, p. 327-332, 2003.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in two species of *Saldula* (Saldidae, Hemiptera). **Hereditas**, v. 99, n. 1, p. 131-134, 1983.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in the Heteropteran genus *Nabis* (Nabidae, Heteroptera), **Hereditas**, v. 101, p. 31-35, 1984a.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. The occurrence of the XO sex chromosome system in *Dictyonota tricornis* (Schr.) (Tingidae, Hemiptera) and its significance for concepts of sex chromosome system evolution in Heteroptera. **Hereditas**, v. 100, p. 299-301, 1984b.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis of collochore type in the heteropteran family Miridae. **Hereditas**, v. 105, p. 193-297, 1986a.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in *Anthocoris nemorum* (Hemiptera, Anthocoridae). **Hereditas**, v. 105, p. 287-289, 1986b.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Interaction of B chromosomes with A or B chromosomes in segregation in insects. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 394-397, 2004.

NUMMELIN, M.; LODENIUS, M.; TULISALO, E. Water striders (Heteroptera, Gerridae) as bioindicators of heavy metal pollution. **Entomologica Fennica**, v.8, p. 185-191, 1998.

OCHS, R.L.; LISCHWE, M.A.; SHEN, E.; CARROLL, R.E.; BUSCH, H. Nucleogenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. **Chromosoma**, v. 92, n. 5, p. 330-336 1985.

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. Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Coreidae, Heteroptera). I. Behaviour of univalents in desynaptic individuals. **Genetica**, v. 80, p. 31-38, 1990.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; BRESSA, M.J.; GREIZERSTEIN, E.J.; LÍA, 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.

PAULMIER, F.C. The spermatogenesis of *Anasa tristis*. **Journal of Morphology**, v. 15 suppl., p. 224-272, 1899.

PERRY, R. P. The nucleolus and the synthesis of ribosomes. **National Cancer Institute Monograph**, v. 18, p. 325-340, 1965.

POISSON, R. Nouvelles observations sur le processus spermatogénétique dans les éléments sexuels d' Hémiptères aquatiques. **Archives the Zoologie Experimentale et Generale**, v.78, p. 133-194, 1936.

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

RILEY, R.; LAW, C.N. Genetic variation in chromosome pairing. **Advances in Genetic**, v. 13, p. 57-114, 1965.

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

SANTOS, J.; SENTIS, C.; FERNANDEZ-PIQUERAS, J. 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**, v. 29, p. 516-518, 1987.

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 of Morphology**, v. 67, p. 123-141, 1940.

SCHUH, T. T.; SLATER, J.A. **True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history**, Cornell UNIVERSITY press, Ithaca, New York, xii, 338 pp., 1995.

SCHWARZACHER, H.G; WACHTLER, F. The nucleolus. **Anatomy an Embryology**, v. 188, p. 515-536, 1993.

- SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microscopia Electronica y Biología 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, 2007a.
- 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, 2007b.
- SOUZA, H.V.; ARAKAKI, R.L.M.; DIAS, L.; MURAKAMI, A.S.; COSTA, L.A.A.; BICUDO, H.E.M.C.; ITOYAMA, M.M. Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007c.
- SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus poecilus* and *Oebalus ypsilongriseus* (Heteroptera, Pentatomidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n. 3, p. 686-691, 2008.
- SPEHAR, R.L.; ANDERSON, R.L.; FIANDT, J.T. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic evertbrates. **Environmental Pollution**, v.15, p. 195-208, 1978.
- STEINNES, E. Biomonitoring of air pollution by heavy metals. In: Ottar, B.; Pacyna, J. (eds.), **Control and Fate of Atmospheric Heavy Metals**, p.321-328. Kluwer, Dordrecht, 1989.
- SUJA, J.A.; DEL CERRO, A.L.; PAGE, J.; RUFAS, J.S.; SANTOS, J.L. Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. **Chromosoma**, v. 109, p. 35-43, 2000.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. Unwin Hyman, London, 1990.

TAKENOUCHI, Y.; MURAMOTO, N. A study of the chromosomes in three species of heteropteran insects (Anthocoridae and Veliidae: Heteroptera). (In Japanese). **Journal of Hokkaido University of Education**, IIB, v. 22, p. 23-25, 1971.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. **Cytobios**, v. 99 (391), p. 113-122, 1999.

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

UESHIMA, N. **Animal cytogenetics**, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera. Gebruder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 117 pp., 1979.

WACHTLER, F. STAHL, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation. **Micron**, v.24, p. 473-505, 1993.

WHITE, M.J.D., **Animal Cytology and Evolution**. 3rd ed. Cambridge University Press, London, 961 pp., 1973.

WILSON, E.B. Studies of chromosomes II. The paired microchromosomes, idiochromosomes and heterotrophic chromosomes in Hemiptera. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 2, p. 507-545, 1905.

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

YOSHIDA, T. Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. **Journal of the Faculty of Science- Hokkaido University**. (Zool.), v. 9, p. 243-249, 1947.

REFERÊNCIAS ADICIONAIS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I step method. **Experientia**, v. 36, p. 104-105, 1980.

VII. ANEXOS

VII. ANEXOS

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Obtenção e Armazenamento dos Insetos

Para a análise citogenética, foram coletados em torno de 20 indivíduos machos adultos de cada espécie das famílias Gerridae (*Brachymetra albinerva*, *Limnogonus aduncus*, *Halobatopsis platensis* e *Cylindrostethus palmaris*), Notonectidae (*Martarega* sp.) e Veliidae (*Rhagovelia whitei*, *Rhagovelia* sp.), na represa municipal da cidade 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 e Molecular de Insetos do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, montados para encaminharmos para a identificação ou para a nossa coleção 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 o inseto foi fixado com um alfinete na região posterior do cefalotórax em uma placa de Petri contendo parafina sólida e teve suas patas, asas, escutelo e laterais do abdome seccionados com uma tesoura pequena e pontiaguda. Foi gotejado uma gota de solução fisiológica de Demerec sobre os órgãos expostos, estes foram removidos com auxílio de um estilete, deixando evidente os testículos. Os testículos, localizados latero-ventralmente, foram 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 a esmagamento para o estudo citogenético da meiose e espermiogênese.

A imagem da prófase meiótica de *Thianta perditor* utilizada, a título de comparação, neste trabalho, foi gentilmente cedida por Hederson Vinicius de Souza.

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 2%); 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.

1.4. Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas no microscópio de luz, Olympus modelo BX40, do Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos. As imagens foram analisadas em microscópio Zeiss, AXIOSKOP 2, com lâmpada de 12V/100 watts, sendo as imagens capturadas pelo software Digital Image Processing AXIONVISION 3.1 (Zeiss) acoplado ao mesmo, do Laboratório de Morfologia, do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP, Campus de São José do Rio Preto, SP.

Resumo

Os aspectos da espermatogênese e do comportamento nucleolar foram analisados em *Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris*, *Halobatopsis platensis*, *Limnogonus aduncus* (Gerridae), *Martarega* sp. (Notonectidae), *Rhagovelia whitei* e *Rhagovelia* sp. (Veliidae). Os testículos são arredondados (Veliidae), alongados (Gerridae) ou espiralados (Notonectidae) e apresentam membrana transparente recobrimo-os. O complemento cromossômico encontrado foi de $2n = 23$ ($22A + X0$, *L. aduncus* e *R.* sp.); 25 ($24A + X0$, *B. albinerva* e *H. platensis*); 26 ($22A + 2m + XY$, *Martarega* sp.); 29 ($28A + X0$, *C. palmaris*) ou 39 ($38A + X0$, *R. whitei*) cromossomos, sendo que a única espécie com sistema cromossômico do sexo diferente foi *M.* sp., que apresentou sistema XY, além de ser, também, a única espécie com m-cromossomos. O comportamento meiótico de todas as espécies foi semelhante, isto é, apresentaram: cromossomos holocêntricos, material heteropicnótico na prófase; quiasmas intersticiais e/ou terminais; primeira divisão reducional para os autossomos e o inverso para os cromossomos sexuais. A única diferença observada foi com relação ao tamanho extremamente maior das células de *M.* sp., em todas as fases da espermatogênese. Com relação ao comportamento nucleolar as espécies não apresentaram diferenças, somente *M.* sp. que possui nucléolos maiores que as demais espécies. A única espécie na qual foi possível identificar com clareza a região da RON foi *L. aduncus*, na região terminal de um autossomo. Confirmou-se, também, através da espécie *L. aduncus*, que as associações teloméricas não ocorrem ao acaso. Nas demais espécies a marcação da RON foi bastante discreta, não sendo possível afirmar com clareza onde ela está localizada.

Palavras-chave: Heteroptera aquáticos; Gerridae; Notonectidae; Veliidae; meiose; comportamento nucleolar.

Abstract

The aspects of spermatogenesis and nucleolar behaviour were analyzed in *Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris*, *Halobatopsis platensis*, *Limnogonus aduncus* (Gerridae), *Martarega* sp. (Notonectidae), *Rhagovelia whitei* and *Rhagovelia* sp. (Veliidae). The testicles are rounded (Veliidae), elongated (Gerridae) or spiral (Notonectidae) and have a transparent membrane covering them. The complement chromosome was $2n = 23$ ($22A + X0$, *L. aduncus* and *R.* sp.), 25 ($24A + X0$, *B. albinerva* and *H. platensis*), 26 ($22A + 2m + XY$, *Martarega* sp.), 29 ($28A + X0$, *C. palmaris*) or 39 ($38A + X0$, *R. whitei*) chromosomes, and the only specie with different sex chromosome system was *M.* sp., which presented XY system and m-chromosomes. The meiotic behavior of all species was similar: holocentric chromosomes, heteropicnotic material at prophase; chiasmata interstitial and/or terminal; first reductional division for the autosomes and the reverse for the sex chromosomes. The only difference observed was related to the very largest size of the cells *M.* sp. in all stages of spermatogenesis. With regard to the nucleolar behavior, the species did not show differences, only *M.* sp. which has nucleoli larger than the other species. The only species in which it was clearly possible to identify the region of NOR was *L. aduncus*, in the region of a terminal autosome. It was also confirmed that the telomeric associations do not occur at random. In other species the marking was very discreet, no one can clearly say where NOR is located.

Keywords: aquatic Heteroptera; Gerridae; Notonectidae; Veliidae; meiosis; nucleolar behaviour.