

**MARCELO SILVA BARCELLOS**

**ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE  
*Diaphorina citri* (HEMIPTERA, STERNORRYNCHA, LIVIIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014**

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

T

B242e  
2014

Barcellos, Marcelo Silva, 1980-  
Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de  
Diaphorina citri (Hemiptera, Sternorrhyncha, Liviidae) / Marcelo  
Silva Barcellos. – Viçosa, MG, 2014.  
viii, 19f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.15-19.

1. Diaphorina citri. 2. Cigarra - Espermatozoides.  
3. Cigarra - Doenças e pragas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.752

MARCELO SILVA BARCELLOS

**ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE  
Diaphorina citri (HEMIPTERA, STERNORRYNCHA, LIVIIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2014

---

Vinicius Albano Araújo

---

Cláudia Vânia Miranda de Oliveira

---

José Lino-Neto  
(Orientador)

“Não é o nascimento, o casamento ou a morte, mas é a gastrulação que é verdadeiramente a parte mais importante de nossa vida.”

LEWIS WOLKPert (1986)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural pelo ensino de qualidade.

Agradeço à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais), pela bolsa concedida.

Ao Prof. Lino que além de orientador, é meu grande amigo, pela oportunidade de crescimento. Agradeço pelas horas dedicadas à minha formação acadêmica, pelos conselhos, pelos “puxões de orelha”, pela orientação e por ter acreditado em mim. Não há palavras que demonstre toda a minha imensa gratificação.

A minha orientadora na graduação Marla Piumbini Rocha por me colocar no caminho da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e pelos ensinamentos ao longo da minha vida acadêmica, a essa pessoa eu sou imensamente grato!

Ao prof. Serrão pelos vários conselhos durante o tempo de mestrado além da grande amizade.

Ao meu amigo Rômulo por todo apoio na minha chegada aqui em Viçosa. A prof. Reggiane Vilela pela ajuda a me encaminhar para UFV. Aos colegas de laboratório: Jamile (companheira de jornada no laboratório), Aline, André, Helen, Deia, Glenda, Edson, Wagner, Dihego, Kenner, Débora, Dodora, Patrícia, Luiza, Mari. Muito obrigado!

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV. À Elizabeth Alves Pena (Beth), pelo profissionalismo e competência.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, em especial Karla Ribeiro, Gilmar Valente, pela atenção e ajuda sempre que solicitadas.

Ao Prof. Dr. Vinicius Albano Araújo, à Dra. Cláudia Vânia M. de Oliveira por aceitar participar da banca. Muito obrigado!

No âmbito familiar, agradeço aos meus irmãos Márcio, Paula e Fernanda que de uma forma ou de outra, sempre estiveram presentes na minha vida e muito me estimularam, mesmo sem saber ao certo do que se tratava a minha pesquisa.

Agradeço à minha mãe Tereza que foi mãe e pai ao mesmo tempo e nunca deixou faltar nada, além da educação que passou para nós ‘minha mãe é uma guerreira’.

Agradeço a minha esposa Chaiane por estar sempre do meu lado me apoiando em tudo, essa vitória também é sua, meu amor!

Aos meus filhos Patrick e Gabriel que são em grande parte a inspiração de tudo na minha vida.

Agradeço meus sogros Luiz e Sônia por todo apoio na minha caminhada!

Aos meus amigos de Pelotas-RS, meu amigo e cunhado Elton, ao Gustavo pelos inúmeros churrascos que fizemos ao meu grande amigo José Henrique (patrão) por sempre estar disposto em me apoiar e todos os colegas da Biologia UFPEL.

## **BIOGRAFIA**

Marcelo Silva Barcellos, filho de Tereza de Jesus Silva Barcellos e João Damacir Martins de Martins, nasceu em Pelotas, Rio Grande do Sul, em 09 de novembro de 1980.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2004 em colégio público. Em abril de 2007 iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas RS, concluindo em 20 de janeiro de 2012. Durante a graduação foi bolsista dos programas PIBID pelo MEC e Novos Talentos pela CAPES, além de monitor voluntário das disciplinas de Biologia Celular e Histologia. Em março de 2012 ingressou no curso de mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo a dissertação em fevereiro de 2014. Já em dezembro de 2013 foi aprovado no curso de Doutorado também em Biologia Celular e Estrutural – UFRV.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. A ordem Hemiptera: .....	1
1.2. Subordem Sternorrhyncha: Diaphorina citri Kuwayama .....	1
1.3. Morfologia Geral dos Espermatozoides em Insetos .....	3
<b>2. Objetivo</b> .....	4
<b>3. Material e Métodos</b> .....	4
3.1. Insetos .....	4
3.2. Suspensão de espermatozoides para microscopia de luz .....	4
3.3. Microscopia eletrônica de varredura .....	5
3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	5
<b>4. Resultados</b> .....	5
<b>5. Discussão</b> .....	12
<b>6. Conclusão</b> .....	14
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	15



## RESUMO

BARCELLOS, Marcelo Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de *Diaphorina citri* (Hemiptera, Sternorrhyncha, Liviidae)**. Orientador: José Lino-Neto

A ordem Hemiptera compreende um grupo diversificado de insetos com cerca de 89.000 espécies descritas e distribuídas por todo o mundo. Atualmente quatro subordens de Hemiptera são reconhecidas: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha. A subordem Sternorrhyncha forma um grupo monofilético com aproximadamente 16 mil espécies descritas e distribuídas em quatro superfamílias: Aleyrodoidea, Aphidoidea, Coccoidea e Psylloidea. Algumas espécies dessa subordem estão entre as principais pragas da agricultura mundial. Um exemplo é a *Diaphorina citri* Kuwayama (Liviidae), popularmente conhecida como cigarrinha-do-limão, que hoje é uma das mais importantes e devastadoras pragas da citricultura mundial. Considerando que conhecer a biologia reprodutiva, bem como a sistemática, pode contribuir para o manejo de espécies-praga, neste trabalho descrevemos a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de *D. citri*. Para isso foram utilizadas microscopias de luz e eletrônicas de transmissão e varredura. Nesta espécie observamos que os espermatozoides medem cerca de 525  $\mu\text{m}$  de comprimento, estão livres na vesícula seminal e não apresentam polimorfismo. Como observado em outros Psylloidea, o espermatozoide, quando manipulado, se abre em dois filamentos, onde um deles em sua extremidade anterior está preso ao núcleo e o outro livre. Ao longo de todo o flagelo existem projeções laterais com cerca de 2  $\mu\text{m}$  de comprimento, característica descrita para outros Psylloidea e, também, Aleyrodoidea. Ainda, na extremidade final da cauda são observadas três apêndices de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ , os quais foram observados até o momento apenas em *D. citri*. A região da cabeça é formada pelo núcleo com cromatina bastante compacta e por uma estrutura composta de material de densidade eletrônica mediana que se estende cerca de 25  $\mu\text{m}$  de comprimento à frente do núcleo. O flagelo é constituído pelo axonema (9 + 9 + 2), dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. A presença de projeções laterais é uma característica compartilhada por Psylloidea e Aleirodoidea, já os espermatozoides se abrindo em dois filamentos quando manipulados ocorre apenas em Psylloidea e, a presença dos três apêndices no final do flagelo, distingue *D. citri* das demais espécies de Psylloidea estudadas.

## ABSTRACT

BARCELLOS, Marcelo Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Structure and ultrastructure of *Diaphorina citri* spermatozoa (Hemiptera, Sternorrhyncha, Liviidae)**. Adviser: Jose Lino Neto.

The Hemiptera comprises a diverse group of insects with approximately 89,000 described species and distributed throughout the world. Currently, four suborders of Hemiptera are recognized: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha and Auchenorrhyncha. The suborder Sternorrhyncha form a monophyletic group with approximately 16,000 described species, distributed in four superfamilies: Aleyrodoidea, Aphidoidea, Coccoidea and Psylloidea. Some species of this suborder are among the major pests of agriculture worldwide. One example is *Diaphorina citri* Kuwayama (Liviidae), popularly known as the leafhopper, which today is one of the most important and devastating citrus pest worldwide. Considering knowledge about the reproductive biology as well as systematic may contribute to the management of pest, in this paper we describe the structure and ultrastructure of spermatozoa of *D. citri*. For this, were used light, transmission and scanning electronic microscopy. In this species we observed that the sperm measure about 525  $\mu\text{m}$  in length, are free in the seminal vesicle and do not show polymorphism. As observed in other Psylloidea, the sperm when manipulated opens into two filaments, one in which its anterior end is attached to the nuclei and the other free. Through the flagellum there are lateral projections with about 2  $\mu\text{m}$  in length, this characteristic is reported for another Psylloidea and Aleyrodoidea. Furthermore, at the end of the flagellum three appendages are observed with approximately 7  $\mu\text{m}$ , which were observed so far only in *D. citri*. The head region is formed by nuclei with compact chromatin and a structure comprising by a material with median electron density and it extends extends about 25  $\mu\text{m}$  in length in front of the nuclei. The flagellum consists of an axoneme (9 + 9 + 2), two mitochondrial derivatives and two accessory bodies. The presence of lateral projections is a characteristic shared by Psylloidea and Aleirodoidea, already the sperm opening in two filaments when manipulated occurs only in Psylloidea, and the presence of the three appendices at the end of the flagellum distinguishes *D. citri* from the other Psylloidea species studied.

## **1. Introdução**

### **1.1. A ordem Hemiptera:**

A ordem Hemiptera compreende um grupo diversificado de insetos que variam consideravelmente em tamanho, nas formas do corpo, das asas e das antenas, no ciclo de vida e no hábito alimentar. Atualmente são conhecidas cerca de 89.000 espécies distribuídas por todo o mundo (Rafael et al., 2012). Os Hemiptera são um grupo monofilético que se distingue dos outros insetos por possuírem peças bucais adaptadas à perfuração e sucção, alojadas em uma longa tromba ou bico, tanto na fase adulta como nas ninfas (Schuh & Slater, 1995).

Atualmente são reconhecidas quatro subordens de Hemiptera: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha, sendo as três primeiras consideradas monofiléticas e a última parafilética (Bourgoin et al., 1997). A diversidade da ordem está relacionada à radiação das angiospermas, e a eficiência na alimentação em plantas se dá graças a estruturas das peças bucais, que também possuem algumas pré-adaptações para a predação. A maioria das espécies alimenta-se de seiva ou outros fluidos produzidos pelas plantas (fitófagas). Entretanto existem outras espécies que se alimentam de sangue (hematófagas) ou que são predadoras de outros insetos (entomófagas) (Triplehorn & Johnson, 2005), caracterizando essa ordem como de importância econômica e de saúde pública para o homem.

### **1.2. Subordem Sternorrhyncha: Diaphorina citri Kuwayama**

Etimologicamente a palavra “Sternorrhyncha” vem do grego, onde sternon significa esterno, peito; e rynchos significa tromba, rostro, o qual emerge aparentemente do esterno entre as coxas do par de pernas anteriores. Os insetos dessa subordem são terrestres e pequenos, variando de menos de 1 mm até cerca de 5 mm de comprimento. Eles tem distribuição cosmopolita, com aproximadamente 16 mil espécies descritas em todo mundo (Rafael et al., 2012), com apenas algumas delas popularmente conhecidas, como moscas-brancas (aleirodoideos), pulgões (afidoideos) e cochonilhas (cocoideos).

A subordem Sternorrhyncha forma um grupo monofilético e está dividida em quatro superfamílias: Aleyrodoidea, Aphidoidea, Coccoidea e Psylloidea (Carver et al., 1991). Os esternorrincos fitófagos apresentam importância econômica em nível agrônomo, pois geralmente transmitem, a partir da saliva, substâncias tóxicas ou fitovírus patogênicos que causam danos às plantas hospedeiras (Costa Lima, 1942). É a esse grupo de insetos que pertencem algumas das maiores pragas da agricultura mundial.

A cigarrinha-do-limão *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Sternorrhyncha: Liviidae) (Burckhardt & Ouvrard 2012) é hoje uma das mais importantes e devastadoras pragas da citricultura mundial. Sua ocorrência foi primeiramente relatada em Taiwan no ano de 1907, e hoje se encontra espalhada no sul da Ásia, em regiões do Oriente Médio e do sul dos Estados Unidos, América Central, Caribe e América do Sul (Halbert & Manjunath, 2004). No Brasil, *D. citri* foi descrita pela primeira vez por Costa Lima (1942).

Estes insetos são sugadores de plantas cítricas e possuem pernas metatorácicas modificadas para saltar. As ninfas possuem cor amarelada, medem de 0,25 a 1,7 mm de comprimento e passam por cinco estágios ninfais no período de 11 a 15 dias (Catling, 1970; Gravena, 2005; Nava et al., 2007). Os adultos medem de 2 a 4 mm e tem o corpo manchado de marrom, cabeça marrom claro, asa dianteira alargada da metade até o ápice, antena com ápice preto e com duas pequenas manchas marrons claras no meio dos segmentos, além de apresentarem secreção cerosa na forma de um pó (Aubert, 1987; Gallo et al., 2002). São muito ágeis e quando perturbados saltam a curtas distâncias, mas quando se encontram em repouso, flexionam o primeiro par de pernas formando um ângulo de 30° em relação à superfície que se encontram (Costa Lima, 1942; Tsai & Liu, 2000; Fernández, 2003). O tempo de vida do adulto pode chegar a seis meses, mas em média é de dois a três meses (Aubert, 1987; Gravena, 2005).

A cigarrinha-do-limão *D. citri* assume grande importância econômica, pois ao sugar os fluidos da planta hospedeira, pode transmitir a bactéria restrita ao floema *Candidatus Liberibacter spp.*, causadora da doença Huanglongbing (HLB) ou greening (Garnier et al., 1984). A HLB é uma doença destrutiva para as plantas cítricas que provoca sintomas generalizados de deficiência nutricional causando o amarelecimento dos ramos, seca e morte dos ponteiros, redução no tamanho, deformação e queda dos frutos (Bové, 2006).

Apesar de ter sido descrita pela primeira vez no Brasil em 1942, *D. citri* (Costa Lima, 1942) vinha ocorrendo sem causar danos severos à citricultura. Entretanto, em março de 2004 foi constatada pela primeira vez a ocorrência da HLB nos pomares da região central do estado de São Paulo, sendo diagnosticada a forma americana da doença (*Candidatus Liberibacter Americanus*) não vista antes, além da forma asiática (*Candidatus Liberibacter Asiaticus*) e a forma africana (*Candidatus Liberibacter Africanus*) (Coletta Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005).

*Diaphorina citri* apresenta maior ocorrência de ovos e ninfas quando há abundância de brotações nas plantas, o que acontece em condições de altas temperaturas e precipitação, no entanto, tem-se observado adultos de *D. citri* durante praticamente todo o ano, mesmo em períodos secos e frios. Como a coloração amarelada das folhas sintomáticas atrai este inseto,

estes podem migrar para estas folhas para se alimentar, crescendo a chance de adquirir a bactéria e a disseminação da doença (Yamamoto, 2008).

De acordo com a FUNDECITROS (2012), de 2004 a 2012 a disseminação do HLB foi bastante rápida e atingiu todas as regiões, passando de 3,4% para 64,1% dos talhões de laranjeiras contaminados no estado de São Paulo. A incidência de plantas com sintomas saltou de 0,58%, em 2008, para 6,91%, em 2012. Originando, assim, prejuízos significativos para o setor da citricultura brasileira o qual é responsável por muitos empregos no setor de insumos que movimentam anualmente mais de nove bilhões de reais e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos (Belasque Junior et al., 2009).

### **1.3. Morfologia Geral dos Espermatozoides em Insetos**

Os espermatozoides de insetos são, em geral, muito longos e finos, que podem variar de 1,7  $\mu\text{m}$  de comprimento, como no térmita *Reticulitermes lucifugus* (Baccetti et al., 1981), a 58.000  $\mu\text{m}$ , como em *Drosophila bifurca* (Pitnick et al., 1995). Geralmente é possível distinguir a região da cabeça e a do flagelo, as quais exibem aproximadamente o mesmo diâmetro. A região de cabeça compreende, na maioria das vezes, o acrossomo e o núcleo. Enquanto a região de flagelo é constituída pelo axonema e comumente dois derivados mitocondriais, um adjunto do centríolo e dois corpos acessórios.

Segundo Jamieson et al. (1999), levando em consideração a diversidade celular presente nos insetos, o espermatozoide é, certamente, o mais diversificado. Por isso, características estruturais e ultraestruturais dessas células vem sendo amplamente utilizadas em diversos trabalhos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Dallai e Afzelius, 1990 e 1995; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto e Dolder, 2001; Dallai et al., 2002 e 2004; Alves et al., 2006; Mancini et al., 2006 e 2009), pois os espermatozoides oferecem um conjunto de dados não tradicionais, tendo seus caracteres, dentro de uma determinada espécie, uma natureza mais conservada que os demais caracteres morfológicos tradicionalmente usados (Baccetti, 1970; Jamieson, 1987).

Na ordem Hemiptera, tem-se alguns estudos envolvendo a ultraestrutura dos espermatozoides nas subordens: Heteroptera (Philips, 1970; Trandaburu, 1973; Afzelius et al., 1976 e 1985; Dallai & Afzelius, 1980; Lee, 1991; Lee & Lee, 1992; Bão & DeSouza, 1994; Dolder, 1998; Fernandes & Bão, 1998; Marceti et al., 2009; Araújo et al., 2011 e 2012), Auchenorrhyncha (Folliot e Maillet, 1970; Cruz-Landim e Kitajima, 1972; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005 e 2006; Araújo et al., 2010; Zhang & Dai, 2012).

Em Sternorrhyncha, os trabalhos descrevendo a ultraestrutura de espermatozoides estão distribuídos em algumas espécies nas superfamílias: Aleyrodoidea (Bacceti e Dallai, 1977; Bão et al., 1997), Aphidoidea (Mazzini, 1970), Coccoidea (Robinson, 1966; Ross e Robinson, 1969; Robinson, 1972 ) e Psylloidea (Le Menn, 1966), a superfamília a qual pertence a espécie aqui estudada,. Estes trabalhos tem demonstrado que nestas células ocorre uma série de modificações morfológicas entre os diferentes grupos de Sternorrhyncha. Dessa forma, o estudo da estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *D. citri* poderá fornecer dados importantes que, juntamente com dados ‘morfológicos tradicionais’ e moleculares, poderão contribuir para uma melhor compreensão da taxonomia e da filogenia de Psylloidea, bem como da subordem Sternorrhyncha como um todo.

## **2. Objetivo**

Descrever a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Diaphorina citri*.

## **3. Material e Métodos**

### **3.1. Insetos**

Machos adultos da espécie *Diaphorina citri* foram coletados na casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Interações Inseto-Microrganismo, Departamento de Entomologia na Universidade Federal de Viçosa.

### **3.2. Suspensão de espermatozoides para microscopia de luz**

Espermatozoides extraídos da vesícula seminal de dez indivíduos, foram espalhados sobre lâminas histológicas em presença de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fixadas com paraformaldeído a 4% por 15-20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e secas à temperatura ambiente. Para medir o tamanho total dos espermatozoides, algumas lâminas foram coradas com Giemsa por 15 min, em seguida lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em um fotomicroscópio (Olympus BX-60). Para medir o comprimento dos núcleos, algumas preparações foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão PBS, por 20 minutos, em seguida lavadas em água corrente e montadas com sacarose 50%. Estas lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60), equipado com filtro BP360-370 nm. Todas as medidas

foram feitas utilizando o programa de análise de imagem Image Pro-Plus, totalizando 50 flagelos e 50 núcleos medidos.

### **3.3. Microscopia eletrônica de varredura**

Gotas de suspensão de espermatozoides, extraídos da vesícula seminal de cinco indivíduos, foram colocadas sobre lamínulas em presença de tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e fixadas por 24 h em glutaraldeído a 2,5%, lavados em solução salina tamponada (PBS = phosphate buffered saline), pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 1 h, em seguida em ácido tânico a 1% por 1 h e, novamente, tetróxido de ósmio a 1% por 1 h. Após cada fixação as amostras foram lavadas em PBS e, após a última, submetidas à desidratação em série crescente de etanol (30-100%). Em seguida, as amostras foram secas no aparelho de ponto crítico (BAL-TEC – CPD030), utilizando CO<sub>2</sub> líquido. Finalmente, as lamínulas foram afixadas em suportes de cobre com fita adesiva, metalizadas com uma fina camada de ouro e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss LEO VP1430).

### **3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para a descrição ultraestrutural dos espermatozoides, vesículas seminais de cinco machos adultos de *D. citri* foram dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM no tampão cacodilato de sódio. Após 24 horas, o material foi lavado com o mesmo tampão, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 h, desidratado em série crescente de acetona, infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo a 2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## **4. Resultados**

Tanto nos ductos quanto nas vesículas seminais foram observados apenas espermatozoides individualizados, não agrupados em feixes. Eles são longos e filiformes, medindo em torno de 525 µm de comprimento (Fig. 1A). Quando manipulados, os espermatozoides se abrem em dois filamentos onde um deles fica preso à base do núcleo e o

outro fica livre, possivelmente ao lado da região nuclear, (Fig. 1B), já na extremidade posterior do flagelo os dois filamentos apresentam-se unidos entre si (Fig. 1E e F). A região da cabeça é facilmente distinguível daquela de flagelo (Fig. 1A-C). Na região da cabeça observa-se o núcleo que mede cerca de 25  $\mu\text{m}$  de comprimento e um filamento paralelo a o núcleo, que se estende à frente da extremidade anterior nuclear por cerca de 25  $\mu\text{m}$  (Fig. 1C e D). Ao longo de toda a região do flagelo observa-se finas projeções que irradiam de todos os lados com cerca de 2  $\mu\text{m}$  de comprimento, espaçadas em 2  $\mu\text{m}$  umas das outras. (Figs. 1E, F e 2A-C). Ainda, na extremidade final da cauda observa-se três apêndices, cada um com cerca de 7  $\mu\text{m}$  de comprimento (Fig. 1E e F).

O núcleo é alongado e possui uma cromatina compacta e bastante eletrondensa (Fig. 3A, C e D). Apresenta formato circular em corte transversal (Fig. 3E-G) e, em corte longitudinal, a sua extremidade anterior termina abruptamente (Fig. 3C). A sua base é afilada, onde se associa com um dos filamentos do flagelo (Fig. 1C e D).

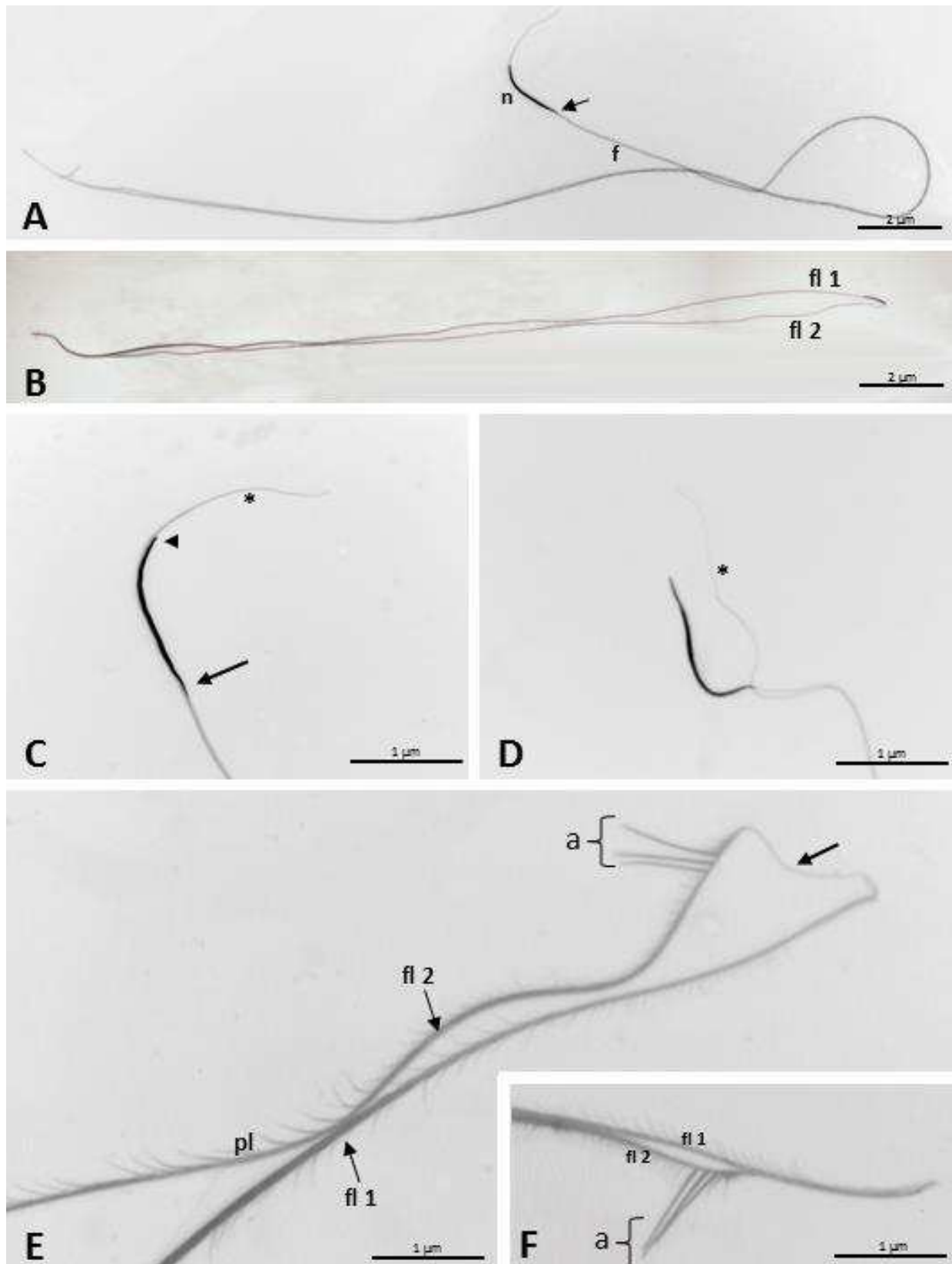
O filamento paralelo ao núcleo, em microscopia eletrônica de transmissão, é observado como uma estrutura composta por um material compacto, de densidade média e envolto por membrana plasmática (Fig. 3A e B). Na altura do terço posterior dessa estrutura, observa-se o início dos dois corpos acessórios, do axonema e de um dos derivados mitocondriais (Fig. 3D-G).

Os dois corpos acessórios iniciam aproximadamente na altura do terço posterior do núcleo (Fig. 3F e 3G). Em corte transversal, eles são bem desenvolvidos, apresentam formato de bastão e ainda são constituídos de um material compacto e pouco eletrondenso. Ambos envolvem parcialmente o axonema em lados opostos (Fig. 4A). Eles terminam em altura diferente, juntamente com início da desorganização dos microtúbulos do axonema, no terço posterior do flagelo (Fig. 4D e E).

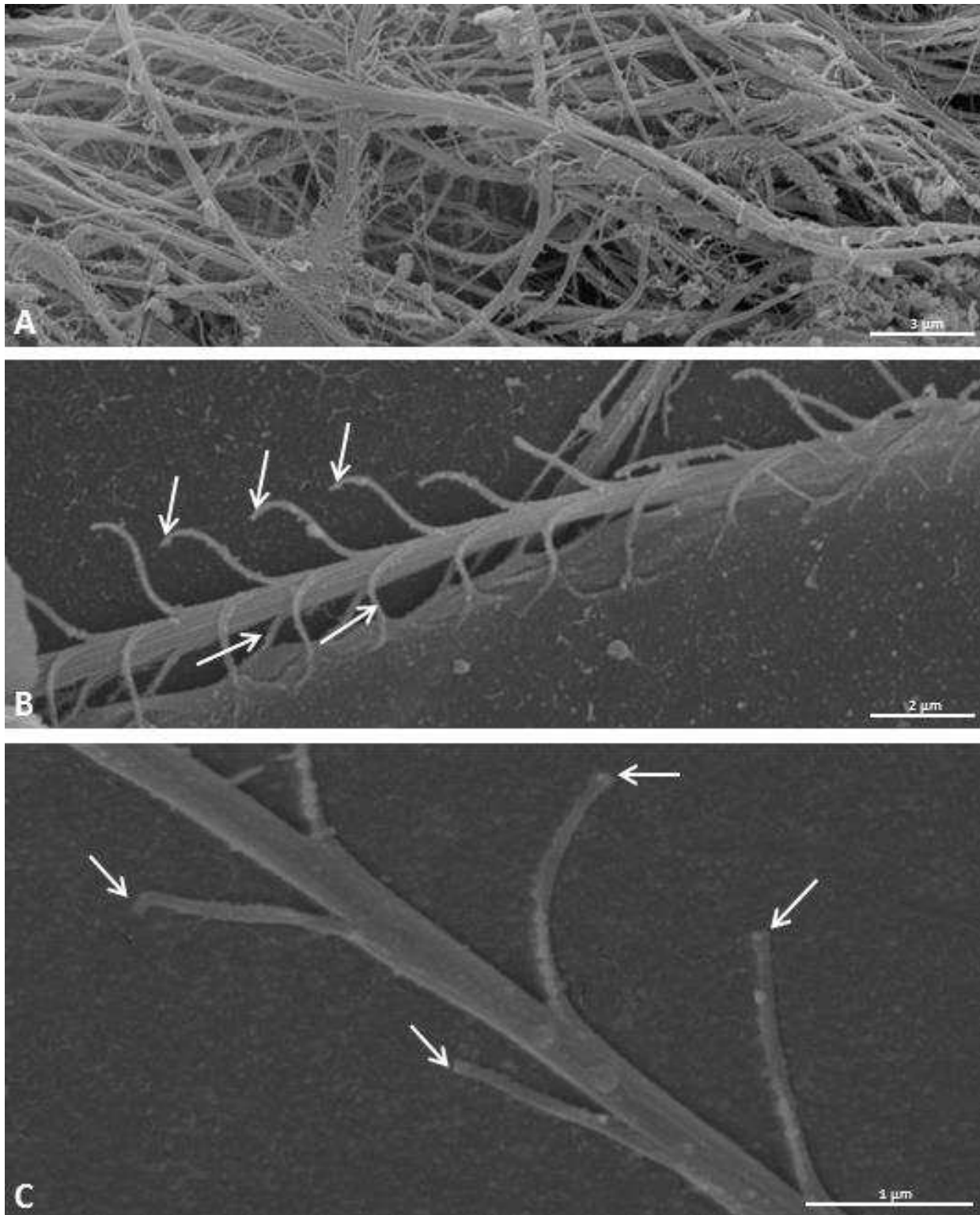
Os derivados mitocondriais começam em diferentes alturas, um no início da porção final do núcleo logo após a estrutura paralela ao núcleo (Fig. 3G) e o outro, possivelmente, logo abaixo da base nuclear (Fig. 1C). Em secções transversais eles são arredondados, aproximadamente simétricos e circundados ‘externamente’ por uma estrutura eletrondensa, em forma de “ferradura” e contínua com cada corpo acessório (Fig. 4A). Entretanto, na região do terço final flagelar, os derivados tornam-se assimétricos, sendo que o que inicia na base do núcleo apresenta maior diâmetro (dm1) (Fig. 4C-F). A região central dos derivados é homogênea e preenchida totalmente com material paracristalino (Fig. 4B). Os derivados flanqueiam toda a extensão do axonema ao longo de quase todo o flagelo e, finalmente, os dois terminam juntos, sendo esta organela, o último elemento flagelar a ter fim (Fig. 4F).



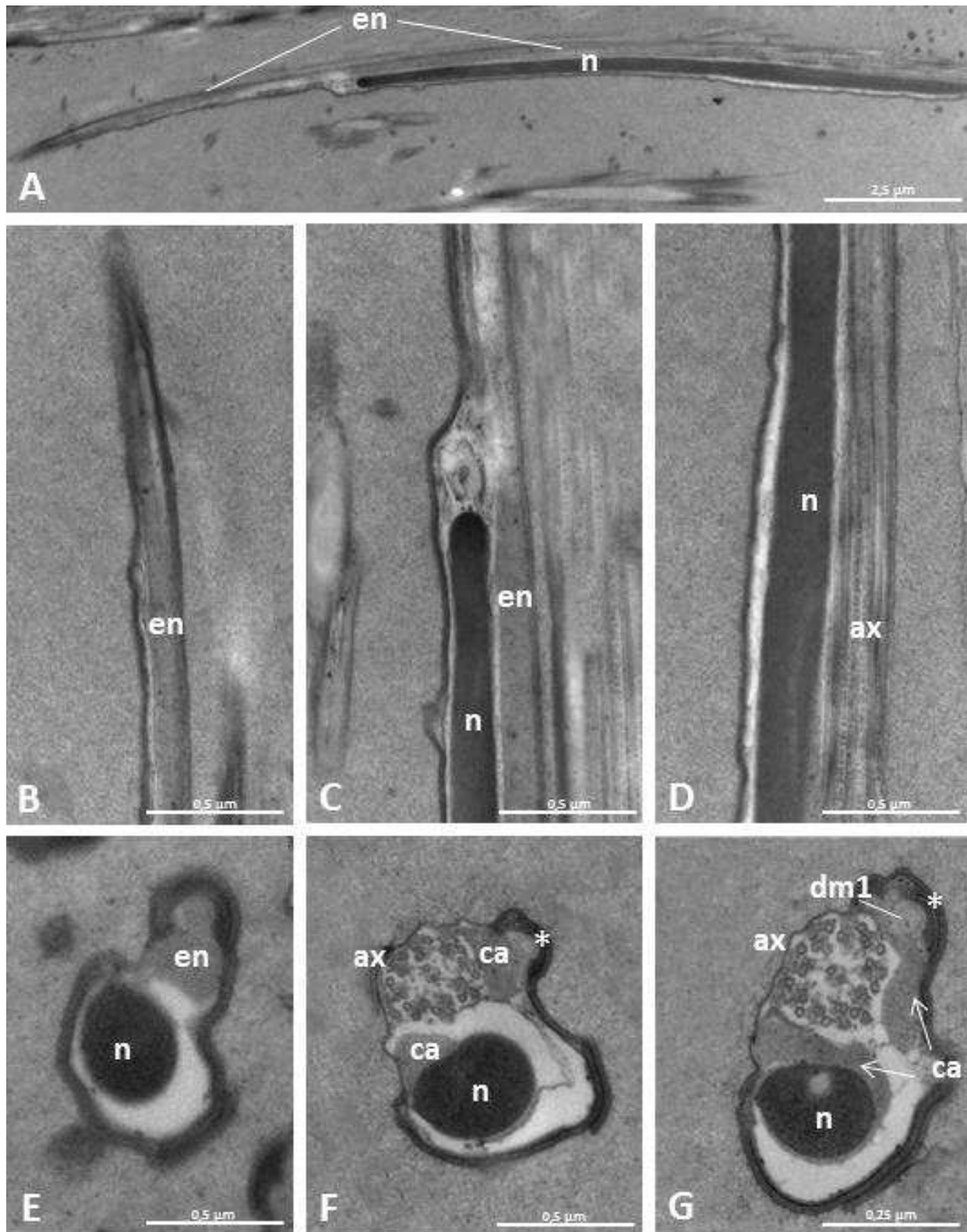
O axonema inicia-se logo abaixo daquela estrutura paralela ao núcleo, na altura do terço final nuclear (Fig. 3D, F e G). Ele possui um arranjo microtubular  $9 + 9 + 2$  com nove microtúbulos acessórios mais externos, seguidos de nove duplas e um par central (Fig. 4A). Em corte transversal, observa-se pouco material intertubular (Fig. 4A). Na porção final do flagelo ele que termina antes dos derivados mitocondriais, perde sua organização, com o par central de microtúbulos finalizando primeiro que os demais (Fig. 4D e E).



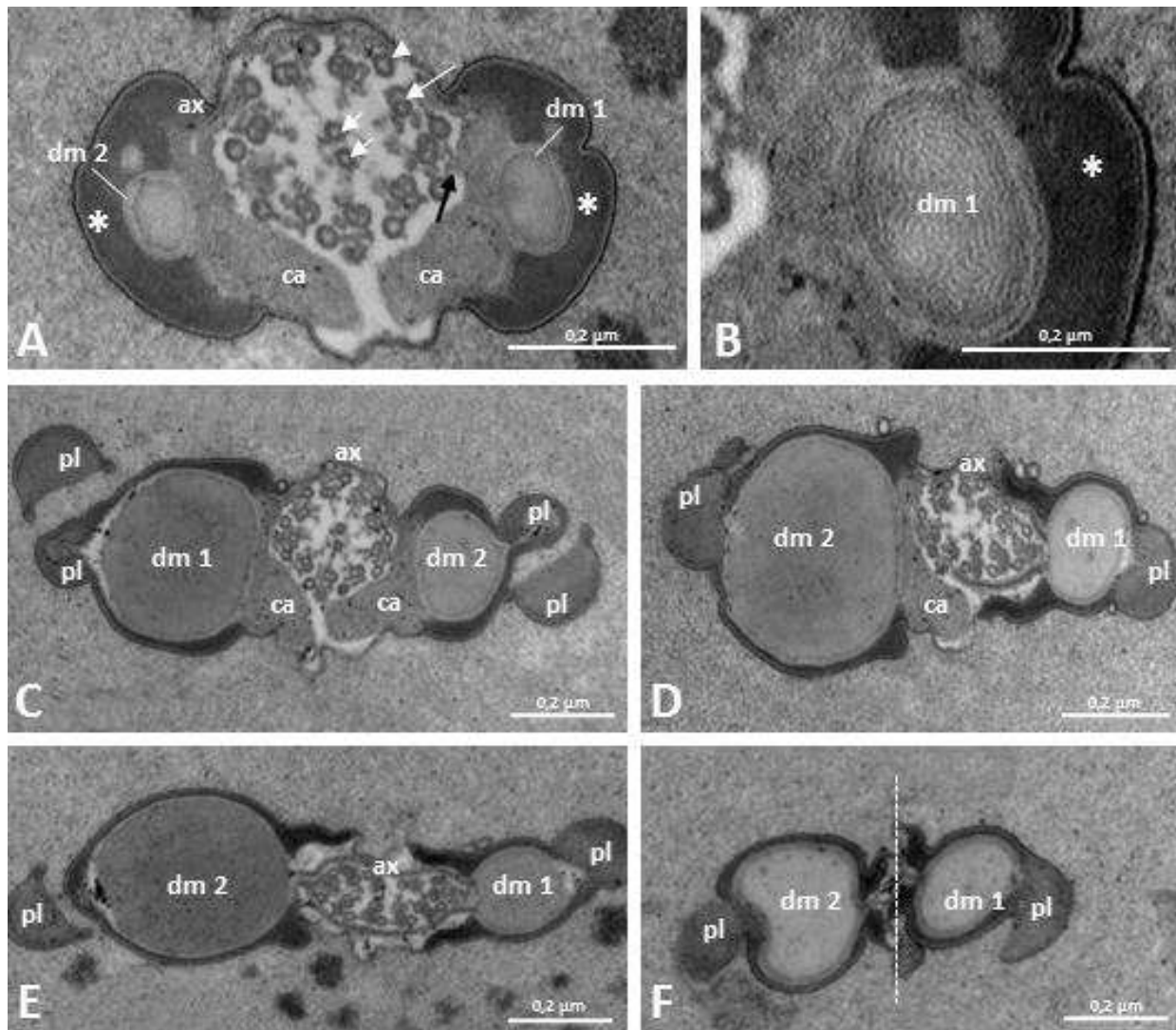
**FIGURA 1.** Espermatozoides *D. citri* em microscopia de luz corados com DAPI. (A e B) Espermatozoides com os filamentos juntos e separados, respectivamente. A seta indica a região de transição núcleo-flagelo. (C e D) Detalhe da região da cabeça mostrando o filamento (asteriscos) junto e separado do núcleo, respectivamente. A seta indica a base nuclear e a cabeça de seta, o ápice nuclear. (E e F) Detalhes do final do flagelo aberto e fechado, respectivamente. Observe os três apêndices na extremidade final do filamento 2 (fl2). A seta indica a região de união dos dois filamentos. (n) núcleo, (f), flagelo, (fl1) filamento 1, (fl2) filamento 2, (pl) projeções laterais e (a) apêndice.



**FIGURA 2.** Espermatozoides de *D. citri* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Espermatozoides no interior da vesícula seminal recém rompida mostrando as inúmeras projeções laterais. (B-D) Detalhe de uma região do flagelo mostrando que as projeções laterais irradiam de todos os lados (setas) com espaços bastante regulares entre elas.



**FIGURA 3.** Microscopia eletrônica de transmissão de espermatozoides de *D. citri* em seções longitudinais (A-D) e transversais (E-G). (A) região da cabeça, mostrando a estrutura, inicialmente paralela (en), se projetando à frente do núcleo (n) . (B-D) Regiões da figura anterior em maior aumento, destacando a estrutura à frente (B) e ao lado do núcleo (C). Ainda, observe em D que a extremidade anterior do axonema (ax) se posiciona ao lado do núcleo. (E-G) Região de transição núcleo-flagelo. Observe inicialmente o núcleo e a estrutura paralela (E) e, em seguida mas ainda ao lado do núcleo, o axonema (ax), os dois corpos acessórios (ca) e o início de um dos derivados mitocondriais (dm1) e do material eletrondenso (asterisco) que circunda externamente o derivado.



**FIGURA 4.** (A-F) Secções transversais do flagelo. (A) O axonema formado por nove duplas de microtúbulos (seta maior), um par central (seta curta) e nove túbulos acessórios (cabeça de seta), com pouco material intertubular. Note os dois derivados mitocondriais (dm1 e dm2) aproximadamente simétricos, cada um circundado externamente por um material eletrondenso em forma de “ferradura” (asteriscos), e os corpos acessórios conectados por pontes ao material intertubular (seta preta). (B) Maior aumento dm1 totalmente preenchido por material paracristalino. (C) Região mais posterior do flagelo mostrando os derivados mitocondriais já assimétricos e as projeções laterais (pl). (D e E) Região de finalização do axonema e dos corpos acessórios. Note que o axonema se desorganiza perdendo primeiro o par central e, dos dois corpos acessórios, aquele associado ao dm2 é o último a terminar. (F) Região final do flagelo onde se observa apenas os dois derivados mitocôndrias. A linha tracejada indica a região frágil do flagelo.

## 5. Discussão

Os espermatozoides de *D. citri* medindo por volta de 525  $\mu\text{m}$ , está dentro do intervalo observado para outros Psylloidea, que varia de 30 a 1000  $\mu\text{m}$  de comprimento (Le Menn, 1966).

Espermatozoides individualizados na vesícula seminal é uma característica descrita para a maioria das espécies de Sternorrhyncha, incluindo *D. citri*, todavia em todas as espécies de Auchenorrhyncha estudadas até o momento, essas células estão mantidas em feixe na vesícula seminal (Folliot e Maillet, 1970; Cruz-Landim e Kitajima, 1972; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005 e 2006; Araújo et al., 2010; Zhang & Dai, 2012).

Outra característica observada em *D. citri*, assim como em todas outras as espécies de Sternorrhyncha estudadas, foi a presença de apenas um tipo de espermatozoide. Entretanto, nas famílias de Auchenorrhyncha, Cicadidae e Cicadellidae, observa-se a produção de mais de um tipo de espermatozoide no mesmo indivíduo (polimorfismo) (Kato, 1956; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005 e 2006;), característica também reportada para algumas famílias da subordem Heteroptera (Pentatomidae, Largidae e Pirocorydae) (Bowen, 1922; Schrader e Leuchtenberger, 1950; Araújo et al., 2011 e 2012).

Os espermatozoides se abrindo em dois filamentos, quando manipulados, observado em *D. citri*, ocorre provavelmente porque existe pouco material conectivo entre os elementos flagelares. Em outros Psylloidea (Le Menn, 1966) é descrito que o espermatozoide consiste em dois filamentos paralelos de tamanho diferente, sendo observada na extremidade de um desses filamentos uma região feulgen-positiva, sendo supostamente a região nuclear. Conforme o exposto percebe-se que os resultados observados em *D. citri*, confirmam as suspeitas de Le Menn (1966). Pela assimetria nas espessuras entre os dois filamentos à microscopia de luz e entre os dois derivados mitocondriais à microscopia eletrônica de transmissão, pode se deduzir que cada filamento tem como principal componente um derivado mitocondrial.

A ultraestrutura dos espermatozoides de *D. citri* observados no presente estudo, é semelhante àquela observada na maioria dos Pterigota, incluindo os Hemiptera (Jamieson et al., 1999; Rosati et al., 1976), por possuir as seguintes características: (1) regiões de cabeça e flagelo diferenciáveis, (2) núcleo alongado e com cromatina homogênea e eletrondensa, (3) axonema de padrão 9+9+2, (4) presença de dois derivados mitocondriais e (5) presença de dois corpos acessórios. Entretanto, algumas características são comuns na subordem Sternorrhyncha, outras são compartilhadas na superfamília Psylloidea e finalmente algumas são exclusivas de *D. citri*.

As projeções laterais observadas em *D. citri* também são reportadas para outros Psylloidea (Le Menn, 1966) e também Aleyrodoidea (Bacceti e Dallai, 1977; e Bão et al., 1997).

Em Psylloidea, elas foram descritas como espinhos e medem cerca de 17  $\mu\text{m}$  de comprimento. Já Aleyrodoidea, foram chamadas de projeções acrossomais, pois, segundo esses autores, elas apresentam em suas extremidades resquícios de material acrossomal, e variam de 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de comprimento, ainda em algumas espécies elas podem ser ramificadas. Entretanto Bacceti e Dallai (1977) afirmaram que essas projeções não tem a capacidade de executar função acrossomal, o papel delas seria provavelmente orientar os espermatozoides durante o transporte que é passivo em Aleyrodoidea. Em *D. citri*, pela orientação e ocorrência preferencialmente no flagelo, nos parece estar de acordo com Bacceti e Dallai (1977).

Os três apêndices na extremidade final do flagelo observados em *D. citri*, é uma característica que, até o momento, diferencia esta espécie dos demais Psylloidea.

A estrutura paralela ao núcleo, em *D. citri*, pode ser prolongamento de um dos corpos acessórios ou uma estrutura distinta. Neste último caso ela poderia constituir um acrossomo “não-tradicional”. Pois, embora acrossomo esteja ausente em outros Psylloidea (Le Menn, 1966) e em alguns Coccoidea (Robinson, 1966; Ross e Robinson, 1969; Robinson, 1972), ele está presente em Aphidoidea (Mazzini, 1970). Da mesma forma, todas as espécies da subordem Auchenorrhyncha estudadas apresentam acrossomo (Folliot e Maillet, 1970; Cruz-Landim e Kitajima, 1972; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005 e 2006; Araújo et al., 2010; Zhang & Dai, 2012).

O núcleo com cromatina eletrodensa, circular em secção transversal e ocupando apenas uma pequena parte da região anterior do espermatozoide, como observado em *D. citri*, é descrito também para outros Psylloidea (Le Menn, 1966) e Aphidoidea (Mazzini, 1970). Entretanto em Aleyrodoidea, o núcleo ocupa a maior parte do espermatozoide, a cromatina apresenta-se em filamentos orientados longitudinalmente e, em corte transversal, ele é reniforme (Bacceti e Dallai, 1977; e Bão et al., 1997). Já em Coccoidea ele apresenta cromatina eletrônopaca e, em algumas espécies, ocupa a maior parte do comprimento do espermatozoide, já em outras, apenas a região anterior (Robinson, 1972).

Na maioria dos insetos, incluindo os Heteroptera (Lee & Lee, 1992; Araújo et al., 2011 e 2012) e Auchenorrhyncha (Folliot e Maillet, 1970; Cruz-Landim e Kitajima, 1972; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005 e 2006; Araújo et al., 2010; Zhang & Dai, 2012) os espermatozoides possuem, na região de transição núcleo-flagelo, uma estrutura eletrondensa, com função de manter unidos os elementos do flagelo com o núcleo, denominada adjunto do centríolo. Na espécie aqui estudada, as estruturas eletrondensas e em forma de “ferradura” que circundam externamente os derivados mitocôndrias (observe as Figs. 3F-G e 4A), tenha a

mesma função do adjunto do centríolo, além de claramente manter as projeções laterais unidas aos demais elementos do flagelo.

O axonema com arranjo microtubular 9+9+2, comum à maioria dos insetos, ocorre nos espermatozoides dos demais Psylloidea (Le Menn, 1966) e nos Aphidoidea (Mazzini, 1970), os quais apresentam motilidade. Em Coccoidea os espermatozoides também apresentam motilidade, entretanto o axonema é descrito como “bizarro”, pois os microtúbulos se arranjam em anéis em volta de um cerne ao longo do espermatozoide, o qual foi classificado como aflagelados (Robinson, 1966; Ross e Robinson, 1969; Robinson, 1972). Já nos Aleyrodoidea estudados o axonema degenera durante a espermiogênese, resultando em espermatozoides sem motilidade (Bacceti e Dallai, 1977; e Bão et al., 1997). Dallai (1979) sugere que, em Sternorrhyncha, o axonema evoluiu a partir de Aphidoidea e Psylloidea, com arranjo microtubular 9+9+2 e espermatozoide móvel, passando por Aleyrodoidea, com axonema degenerado e imóvel, chegando a Coccoidea, com axonema bizarro e espermatozoide aflagelado e móvel.

Em Psylloidea (Le Menn, 1966), incluindo a espécie aqui estudada, e Aphidoidea (Mazzini, 1970) os derivados mitocondriais são bem desenvolvidos, embora em Aphidoidea eles sejam reniformes em secção transversal, enquanto que nos Psylloidea, circulares. Em Aleyrodoidea é reportada a degeneração total dos derivados mitocôndrias durante a espermiogênese (Bão et al., 1997) ou, em algumas espécies, apenas a presença de corpos granulares, estruturas remanescentes dos derivados mas sem qualquer atividade da citocromo-c-oxidase (Bacceti e Dallai, 1977). E para Coccoidea foi reportada a ausência de qualquer organela no flagelo do espermatozoide maduro, incluindo os derivados mitocondriais (Robinson, 1966; Ross e Robinson, 1969; Robinson, 1972).

## **6. Conclusão**

- A organização dos espermatozoides livres na vesícula seminal assim como a ausência de polimorfismo nos mesmos observados em *D. citri*, diferencia, pelo menos, este Sternorrhyncha, dos Auchenorrhyncha, que nos quais os espermatozoides estão organizados em feixe na vesícula seminal e em algumas famílias é observado polimorfismo.
- As projeções laterais observadas nos espermatozoides das espécies de Psylloidea, incluindo *D. citri*, e em Aleyrodoidea, é uma característica comum para essas duas superfamílias, sugerindo uma proximidade filogenética entre esses dois grupos dentro de Sternorrhyncha.



- Os espermatozoides são compostos por dois filamentos (quando manipulados), observada em *D. citri*, até o momento, é uma característica comum dentro de Psylloidea, uma vez que foi observada apenas em outras espécies dessa superfamília.
- A presença de três apêndices na extremidade final da cauda no espermatozoide de *D. citri*, é uma característica que distingue, pelo menos, esta espécie dos demais indivíduos dentro de Psylloidea, bem como dentro da subordem Sternorrhyncha.

## 7. Referências Bibliográficas

- Afzelius, B.A., Baccetti B. and Dallai R. (1976). The giant spermatozoon of Notonecta. *Journal Submicroscopic Cytology. Pathology.* 8: 149–161.
- Afzelius, B.A., Dallai, R. and Lindskog, P. (1985). Spermatozoa of saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). *Journal of ultrastructure research*, 90(3), 304–312.
- Alves, I., Mancini, K., Lino-Neto J. and Dolder H. (2006). Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 87(2), 131–139.
- Araújo, V.A., Bão, S.N. and Lino-Neto, J. (2012). Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Acta Zoologica*, 93(2), 239–244.
- Araújo, V.A., Bão, S.N., Moreira, J., Neves, C.A. and Lino-Neto, J. (2010). Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). *Micron*, 41(4), 306–311.
- Araújo, V.A., Lino-Neto, J., de Sousa Ramalho, F., Zanuncio, J.C. and Serrão, J.E. (2011). Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron*, 42(6), 560–567.
- Aubert, B. (1987). *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera:Psylloidea), the two vectors of Citrus Greening Disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, 42(3), 149–162.
- Baccetti, B. (1970) The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogensis. In: Baccetti, B. (Ed). *Comparative spermatology*. New York: Academic Press, p. 169–182.
- Baccetti, B., Dallai, R. and Callaini G. (1981). The spermatozoa of arthropoda, *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 3(2), 87–99.
- Baccetti, B. and Dallai, R. (1977). The spermatozoon of arthropoda: XXIX. The degenerated axoneme and branched acrosome of Aleyrodids. *Journal of ultrastructure research*, 61(3), 260–270.

- Báo, S.N., DeSouza, W. (1994). Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue and Cell* 26(3): 299–308.
- Bào, S.N., Kitajima, E.W., Callaini, G., Lupetti, P. and Dallai, R. (1997). Spermiogenesis in three species of whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). *Acta Zoologica*, 78(2), 163–170.
- Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R. B., Barbosa, J. C., Fernandes, N. G., Yamamoto, P. T., and Massari, C. A. (2009). Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 137–145.
- Bourgoin, T.J., Steffan-Campbel, D. and Campbel, B.C. (1997). Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Auchenorrhyncha). The enigmatic Tettigometridae: Evolutionary affiliation and historical biogeography. *Cladistics*, 13(3), 207–224.
- Bowen, R. H. (1920). Studies on insect spermatogenesis I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. *The Biological Bulletin*, 39(6), 316-362.
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, Milan, 88(1), 7–37.
- Burckhardt, D. and Ouvrard, D. (2012). A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa*, 35(09), 1–34.
- Carver, M., Gross, G.F. and Woodward, T.E. (1991). Hemiptera (bugs, leafhoppers, cicadas, aphids, scale insects etc.), p. 429-509. In: CSIRO (ed.) *The insects of Australia: a textbook for students and research workers*. Ithaca Melbourne University Press Vol. I. 542 p.
- Catling, H.D. (1970). Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with note on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. *Fao Plant Protection Bulletin*, Roma, 18, (1), 8–15.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N. and Villet, M.H. (2005). Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue and Cell*, 37(4), 257–267.
- Chawanji, A.S., Hodgson, A.N. and Villet, M.H. (2006). Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue and Cell*, 38(6), 373–388.
- Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu Jr. J., Machado, M.A. (2004). First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, St Paul, 88, (12), 1382–1382.
- Costa Lima, A.M. da. (1942). *Insetos do Brasil: Homópteros*. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, v.3, p.1-327.
- Cruz-Landim, C. and Kitajima, E.W. (1972). The ultrastructure of male spermatozoa of corn leafhopper *Dalbulus maidis* Del. and W.(Homoptera: Cicadellidae). *Journal Submicroscopic Cytology*, 4, 75–82.

- Dallai, R. (1979). An overview of atypical spermatozoa in insects. *The Spermatozoon* (DW Fawcett and J. M. Bedford, eds.), 253-265.
- Dallai, R., Carapelli, A., Nardi, F., Fanciulli, P. P., Lupetti, P., Afzelius, B.A. and Frati, F. (2004). Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletiidae, Zygentoma, Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in *Zygentoma*. *Tissue & Cell*, 36(4), 233–244.
- Dallai, R., Lupetti, P., Carapelli, A., Frati, F. and Afzelius B.A. (2002). Sperm structure and spermiogenesis in *Atelura formicaria* Heyden (*Zygentoma*, Insecta). *Acta Zoologica*, 83(3), 245–262.
- Dallai, R. and Afzelius, B.A. (1980). Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *Journal of Morphology*, 164(3), 301–309.
- Dallai, R. and Afzelius, B.A. (1990). Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *Journal of Structural Biology*, 103(2), 164-179.
- Dallai, R. and Afzelius, B.A. (1995). Phylogeny significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: Jamieson, B. G. M. et al. (Ed.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Memoires du Museum National D’Histoire Naturelle*, Paris 16, 291–296.
- Dolder, H. (1988). Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (hemiptera, reduviidae). *Journal of ultrastructure and molecular structure research*, 101(2), 159–164.
- Fernandes, A.P. and Bão, S.N. (1998). Spermiogenesis in phytophagous bug (Hemiptera, Pentatomidae): an ultrastructural study. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 30(4), 485.
- Fernández, C.G. (2003). *Diaphorina citri* (Kuw.) (Homoptera, Psyllidae) in the cuban citriculture. *RIAC – IACNET, La Habana*, n. 21 e 22., 56p.
- Folliot, R. and Maillet, P.L. (1970). Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoide de divers insects Homoptères. In: Baccetti, B. (Ed.), *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, 289–300.
- Fundecitrus. 2012. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 09 de novembro de 2013.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C. de, Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S. and Omoto, C. (2002). *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920 p.
- Garnier, M., Daniel, N. and Bové, J.M. (1984). The greening organism is a gram-negative bacterium. In: *Conference of the International Organization OF Citrus Virologists*, 9., 1984, Argentina. *Proceedings*. Gainesville: University Florida Press, 115–124.

- Gravena, S. (2005). Manual prático de manejo ecológico de pragas dos citros. Jaboticabal: Gravena, 372 p.
- Halbert, S.E. and Manjunath, K.L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha:Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist, Winter Haven, 87(3), 330–353.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R and Afzelius, B.A. (1999). Insect: their spermatozoa and phylogeny. Science, Enfield, NH.
- Jamieson, B.G.M. (1987). The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kubo-Irie, M., Irie, M., Nakazawa, T. and Mohri, H. (2003). Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). Journal of insect physiology, 49(11), 983–991.
- Le Menn, R. (1966). Observations sur la spermiogénèse et le spermatozoïde des Psyllides (Homoptera Psylloidea).-Comptes Rendus des Sciences de l'Académie des Sciences Paris 262: 1731–1733.
- Lee, C.E. (1991). Morphological and phylogenetic studies on the true water bugs (Hemiptera: Heteroptera). Nature and Life, 21(2), 1–183.
- Lee, Y.H. and Lee, C.E. (1992). Ultrastructure of Spermatozoa and Spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with Special Reference to Phytogeny (Cell Biology). Zoological science, 9(5), 971–981.
- Lino-Neto, J. and Dolder, H. (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastridae) with phylogenetic considerations. Zoologica Scripta 30 (2), 89–96.
- Lino-Neto, J. and Dolder, H. (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). Acta Zoologica (Stockholm), 82(2), 159–164.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos, L. A. O. and Dolder, H. (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). Insectes sociaux, 53(3), 333–338.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H. and Dallai, R. (2009). Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). Arthropod Structure & Development, 38(1), 54–59.
- Mazzini, M. (1970). Lo spermatozoo di un afide: *Megoura viciae* Kalt .- Atti Accademia del Fisiocritici Siena 2, 14.
- Mercati, D., Giusti, F., and Dallai, R. (2009). A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). Journal of Morphology, 270(7), 825–833.

- Nava, D.E., Torres, M.L.G., Rodrigues, M.D.L., Bento, J.M.S. and Parra, J.R.P. (2007). Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, 131(9-10), 709-715.
- Phillips, D. M. (1970). Insect sperm: their structure and morphogenesis. *Journal Cell Biology*, 44(2), 243–277.
- Pitnick, S., Spicer, G.S. and Markow, T.A. (1995). How long is a giant sperm? *Nature*, 375(6527), 109–109.
- Rafael, J.A., G.A.R. Melo, C.J.B. Carvalho, S.A. and Casari, R. Constantino. (2012). *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ribeirão Preto: Holos, 796 pp.
- Robison, W.G. (1966). Microtubules in relation to the motility of a sperm syncytium in an armored scale insect. *The Journal of cell biology*, 29(2), 251–265.
- Robison, W.G. (1972). Microtubular patterns in spermatozoa of coccid insects in relation to bending. *The Journal of cell biology*, 52(1), 66–83.
- Ross, J. and Robison, W.G. (1969). Unusual microtubular patterns and three-dimensional movement of mealybug sperm and sperm bundles. *The Journal of cell biology*, 40(2), 426–445.
- Schrader, F., & Leuchtenberger, C. (1950). A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Experimental Cell Research*, 1(3), 421-452.
- Schuh, R.T., and Slater, J.A. (1995). *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history*. Cornell University Press.
- Teixeira, D.C., Ayres, A.J., Kitajima, E.W., Tanaka, F.A.O., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., Bové, J.M. (2005). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo state, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*” with the disease. *Plant Disease*, St Paul, 89(1), 107–107
- Trandaburu, V. (1973). The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). *Travels Museum Historiun Natural*, 13, 137-145.
- Triplehorn, C.A. and Johnson, N. (2005). *Introduction to the Study of Insects*. Belmont, California, Thomson Brooks/Cole.
- Tsai, J.H. and Liu, Y.H. (2000). Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae) on four host plants. *Horticultural Entomology*, 93(6), 1721–1725.
- Yamamoto, P. T. (Org) (2008). *Manejo integrado de Pragas dos Citrus*. Piracicaba, 336p.Cap.5.
- Zhang, B., and Dai, W. (2012). Ultrastructure of the spermatozoa of *Cicadella viridis* (Linnaeus) and its bearing on the phylogeny of Auchenorrhyncha. *Micron*, 43(9), 978–984.