
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR EM TRÊS
ESPÉCIES DE ISOPTERA**

LARA TEIXEIRA LARANJO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular)

Abril - 2015

LARA TEIXEIRA LARANJO

**MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DO
SISTEMA REPRODUTOR EM TRÊS ESPÉCIES DE
ISOPTERA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: PROF^a. DR^a. ANA MARIA COSTA LEONARDO

Rio Claro
2015

595.736 Laranjo, Lara Teixeira
L318m Morfologia e desenvolvimento do sistema reprodutor em
três espécies de Isoptera / Lara Teixeira Laranjo. - Rio Claro,
2015

154 f. : il., gráfs., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ana Maria Costa Leonardo

1. Térmita. 2. *Cryptotermes brevis*. 3. *Coptotermes gestroi*. 4. *Silvestritermes euamignathus*. 5. Aparelho reprodutor. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MORFOLOGIA FUNCIONAL E DINÂMICA DO APARELHO GENITAL EM REPRODUTORES MACHOS DE CUPINS COM ÊNFASE NAS VESÍCULAS SEMINAIS

AUTORA: LARA TEIXEIRA LARANJO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA MARIA COSTA LEONARDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA COSTA LEONARDO
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



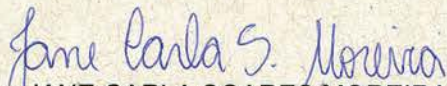
Prof. Dr. ALBERTO JOSE ARAB OLAVARRIETA
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC



Profa. Dra. RUSLEYD MARIA MAGALHÃES DE ABREU
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza / Universidade Federal do Acre



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. JANE CARLA SOARES MOREIRA
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Título alterado para: Morfologia e desenvolvimento do sistema reprodutor em três espécies de Isoptera

Data da realização: 07 de abril de 2015.

Dedicatória



*Aos meus pais Cristina e Euclides, ao meu tio
Affonso e ao meu padrinho Dr. Antônio Hologário
(in memoriam).*

Agradecimientos



A Deus, que me concedeu mais uma encarnação.

À Profª. Drª. Ana Maria Costa Leonardo, toda orientação científica e não-científica recebida ao longo desses 8 anos trabalhando juntas. Minha admiração pela pessoa e professora que ela é e o meu muito obrigada por me guiar nos rumos da ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2011/10590-4) que possibilitou a realização deste trabalho apoiando-o financeiramente.

À minha mãe, cujo amor transcende a vida e transborda minha alma de alegria.

Ao meu pai, que continua sendo o meu herói!

Aos meus avós (*in memorian*), tios, tias, madrinha, padrinho, primos e primas, namorados e namoradas agregados, agradeço os eventos em família, as risadas e cinemas compartilhados e o apoio que sempre recebi.

Ao meu padrinho, Dr. Hologário, ao sr. Sete Encruzilhadas, a Maria Padilha, a Maria dos Sete Coquinhos, ao sr. Martin Pescador, ao sr. Tupã, ao sr. Caveira (*in memorian*) e a todos os guias de luz que andaram lado a lado comigo desde que iniciei minha caminhada no Núcleo Espiritual Caboclo Tupã e Vó Chica. À minha mãe e aos meus irmãos de santo, obrigada!

À Princesa e à Fulana (*in memorian*), à Filó, à Xica e ao Espeto, meus filhos caninos que distribuem amor e carinho em forma de lambidas e rabos abanando.

A Marise e ao Francisco, sem os quais eu não teria nem onde morar esses anos todos!!! Obrigada pela confiança!

Aos meus amigos do Colégio Nossa Senhora do Carmo, que são pessoas que eu vou levar comigo pro resto da vida. Frá, amo você em qualquer continente que você estiver; Celsão, as brejas com você são sempre melhores; Pretti, você é a minha furona preferida; Pacheco, sem você meus conhecimentos em política seriam nulos.

Cá e João, nem tenho como explicar o amor que vocês cultivaram em mim. Obrigada por compartilharem a casa, os amigos, a fé, a vida, os filhos e a floresta encantada que dorme no quintal de vocês! Amo vocês demais!

Ao Alex, moreno bonito que em tão pouco tempo fez florescer um carinho tão grande em meu coração, obrigada por me dar ânimo extra nesse finalzinho de doutorado e ser uma companhia sempre serena e acolhedora!

Aos meus amigos biólogos do CBI 2005, cada um tomando seu rumo, formando família, trabalhando em outros lugares, mas a experiência de compartilhar os 4 anos da graduação com vocês foi inesquecível. “The nine” queridos, adoro vocês!

Ina e Marcelo, Rio Claro não seria a mesma sem vocês! Obrigada pelas séries, cervejas, bolos, brigadeiros, conversas sérias e não tão sérias! Amo vocês!

À Nara, vizinha querida, todas as milhares de coisas lindas compartilhadas!

A minha nova família “marieneana”, gente de SP, do RJ, de Salvador, mas que o carinho e amizade flui tão fácil que parece que nos conhecemos há muito tempo. É muito bom dividir shows, surpresas, músicas e amores com vocês! Um agradecimento especial aos marieneanos convictos de SP, vulgo família Castro, que rechearam meu 2014 com “colheitas” perfeitas.

À Amanda, minha irmã branca de “zoio” claro que eu achei há pouco mais de um ano, mas que vou levar pro resto da vida!!! “Tamo junta, mano”!

À Pati, outra alegria reencontrada nessa vida! “É nós, mermão”!

À Mari, toda alegria que trouxe pra minha vida, colorindo meus dias com canções divinas nessa voz encantadora. Aos meninos de ouro da Bahia que formam essa banda linda, obrigada por embalarem meus dias com música da melhor qualidade. À Eveline, cujo mundo certamente seria um lugar melhor se mais pessoas como ela existissem.

Aos companheiros de cupins, Ives, Juliana, Vanelize, Silvana, Luiza, Iago, Júlia, Otávio, Carol, as coletas,inhos e artigos compartilhados. Van e Ives, meu obrigada especial pelas tardes de trabalho sempre divertidas que passamos juntos!

A todas essas pessoas e as que também são especiais pra mim mas que não caberiam aqui e que de alguma forma fizeram ou fazem parte da minha vida, o meu muito obrigada!!!

MUITO OBRIGADA!!!

Epígrafe



Colheita

(Nelson Rufino)

*A vida é um desafio
Fogo cruzado, eu sei
No rumo traçado me guio
No meu faro eu confio
Na busca do que sonhei*

*Porta fechada é nada
É mais uma lição
A perseverança me ensinou
Só conquista o que se sonhou
Com fé e determinação*

*Tem que ter, tem que ter
Coragem pra viver
Pra ser feliz
Tem que ter, tem que ter
Coragem pra viver
Pra ser tudo que se quis*

*Eu sou a esperança que quer viver
O amor no momento maior
Eu sou a certeza de quem plantou
Pra ter a colheita melhor*

*Quem tem vontade no coração
Quem tem pela vida paixão
Terá o seu dia de vencedor
Verá sua consagração*

Resumo



RESUMO

Reis de Isoptera fornecem grandes quantidades de espermatozoides viáveis à rainha. Contudo, o estudo do sistema reprodutor dos machos destes insetos tem sido negligenciado quando comparado ao das fêmeas. Com o objetivo de suprir essa lacuna, a presente pesquisa visou um estudo comparativo do sistema reprodutor em diferentes idades desses machos, incluindo ninfas e reprodutores alados. Desse modo, foram escolhidas três espécies, pertencentes a três famílias que ocupam posições evolutivas diferentes: *Cryptotermes brevis*, *Coptotermes gestroi* e *Silvestritermes euamignathus*. No Capítulo I, foi dado destaque à produção de espermatozoides e desenvolvimento das vesículas seminais em ninfas de último ínstar, reprodutores alados e reis com 6 meses e 1 ano de idade de *C. brevis*. Nas ninfas, os espermatozoides estão restritos aos testículos. O Capítulo II enfoca principalmente a histoquímica e ultraestrutura das vesículas seminais de *C. gestroi* e assinala o início da espermatogênese em ninfas de 3º ínstar, apesar de ninfas de 5º ínstar ainda não estocarem espermatozoides nas vesículas seminais. Nesta espécie, as vesículas seminais individualizadas apresentam uma região distal secretora e uma região proximal com função de armazenamento de espermatozoides. Adicionalmente, a histoquímica evidenciou polissacarídeos e proteínas na secreção presente na região distal destas estruturas. No Capítulo III, foi acompanhada a evolução do aparelho reprodutor em machos de *S. euamignathus*. Os resultados mostraram um amadurecimento precoce do sistema reprodutor dos machos e um aumento da produção de espermatozoides em reis de colônias maduras. Além disso, as vesículas seminais aumentaram muito nestes indivíduos e se apresentaram como porções especializadas dos dutos deferentes. Adicionalmente, dados morfológicos e histoquímicos permitem inferir que as vesículas seminais de reis funcionam mais como órgão de armazenamento de espermatozoides do que estruturas secretoras. O Capítulo IV, é dedicado a uma análise das gônadas de reprodutores de

substituição, os quais foram coletados em três diferentes colônias de *C. brevis*. As colônias A e B eram formadas por um casal contendo um reprodutor neotênico e um reprodutor primário. O rei primário e o rei neotênico apresentaram um desenvolvimento similar do sistema reprodutor, sendo que ambos os machos apresentaram testículos bem desenvolvidos e espermatozoides nas vesículas seminais. A rainha neotênica e a rainha primária, também mostraram um desenvolvimento similar do sistema reprodutor, com ovócitos vitelogênicos e espermatozoides na espermateca. No entanto, o casal formado exclusivamente por reprodutores neotênicos (colônia C) tinha uma fêmea, que não possuía ovócitos vitelogênicos e nem espermatozoides na espermateca; enquanto o macho, era um intersexo. Este macho, não possuía espermatozoides nas vesículas seminais e apresentou um ovócito em estágio inicial de desenvolvimento, entre os lóbulos testiculares de um dos testículos. De um modo geral, as vesículas seminais dos cupins desempenham um importante papel no armazenamento e na nutrição dos espermatozoides. A presença de um desenvolvimento precoce do aparelho reprodutor nos machos dos cupins, caso das ninfas, mostra a preparação destes indivíduos para a rápida substituição dos reprodutores imaginais, caso de colônias orfanadas. Este fato corrobora com dinâmica de castas na sociedade destes insetos e contribui para a estabilização da colônia.

Palavras-chave: *Cryptotermes brevis*. *Coptotermes gestroi*. *Silvestritermes euamignathus*. Aparelho reprodutor. Isoptera.

Abstract



ABSTRACT

Kings of Isoptera supply large quantities of viable sperm to the queens. Nevertheless, the study of the male reproductive system of these insects has been neglected when compared to that of females. In order to fill this gap, this research aimed a comparative study of the reproductive system in different ages of termite males, including nymphs and winged reproductives. Thus, three species were chosen from three families that have different evolutionary positions: *Cryptotermes brevis*, *Coptotermes gestroi* and *Silvestritermes euamignathus*. Chapter I emphasized the production of sperm and development of seminal vesicles in last instar nymphs, alates and 6-month and 1-year-old kings of *C. brevis*. In nymphs, the sperm are restricted to the testicles. Chapter II focuses primarily on the histochemistry and ultrastructure of the seminal vesicles of *C. gestroi* and records the beginning of spermatogenesis in 3rd instar nymphs, even though 5th instar nymphs have not stored sperm in the seminal vesicles. In this species, individualized seminal vesicles have a secretory distal region and a proximal region with sperm storage function. In addition, the histochemistry showed polysaccharides and proteins present in the secretion of these structures at the distal region. In Chapter III, the evolution of the reproductive system in male of *S. euamignathus* was followed. The results showed an early maturation of the reproductive system of males and the increasing sperm production in kings of mature colonies. Additionally, morphological and histochemical data allowed us to infer that the seminal vesicles of kings function more likely as a sperm storage organ than secretory structures. Chapter IV is dedicated to an analysis of the gonads of replacement reproductives, which were collected in three different colonies of *C. brevis*. Colonies A and B were formed by a couple containing a neotenic and a primary reproductive. The primary king and the neotenic king showed a similar development of the reproductive system. Both males presented well-developed testicles and sperm in the seminal vesicles. The

neotenic queen and primary queen also showed a similar development of the reproductive system, with vitellogenic oocytes and sperm in the spermatheca. However, the couple formed exclusively by neotenic reproductives (colony C), the female had no vitellogenic oocytes and no sperm in the spermatheca; while the male was an intersex. This male had no sperm in the seminal vesicles and presented an oocyte, in early stage of development, among the testicular lobes of one testicle. In general, the seminal vesicles of termites play an important role in storage and nutrition of sperm. The presence of an early development of the reproductive system in the males of the termites, as observed in nymphs shows the preparation of these individuals for the rapid replacement of primary reproductives if the colonies became orphans. This fact confirms the dynamics of caste in society of these insects and contributes to the balance of the colony.

Keywords: *Cryptotermes brevis*. *Coptotermes gestroi*. *Silvestritermes euamignathus*. Reproductive system. Isoptera.

Listas de Ilustrações



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
CAPÍTULO I	
Figura 1. Sistema reprodutor do macho de <i>Cryptotermes brevis</i>	43
Figura 2. Secção histológica dos lóbulos testiculares de machos de <i>Cryptotermes brevis</i> , evidenciando as diferentes fases da espermatogênese	44
Figura 3. Túbulos seminíferos de imago macho de <i>Cryptotermes brevis</i>	45
Figura 4. Esquema do sistema reprodutor de um imago macho de <i>Cryptotermes brevis</i>	46
Figura 5. Vesículas seminais de machos de <i>Cryptotermes brevis</i>	47
Figura 6. Ultraestrutura da vesícula seminal de um imago macho de <i>Cryptotermes brevis</i>	48
Figura 7. Secção histológica longitudinal do canal ejaculatório em machos de <i>Cryptotermes brevis</i>	49
Figura 8. Vesículas seminais dos reprodutores machos de <i>Cryptotermes brevis</i> , submetidas a técnicas histoquímicas	50
CAPÍTULO II	
Figura 1. Aparelho reprodutor do macho de <i>Coptotermes gestroi</i>	73

Figura 2. Secção histológica do aparelho reprodutor em machos de <i>Coptotermes gestroi</i> , evidenciando as diferentes fases da espermatogênese	74
Figura 3. Detalhe das vesículas seminais de machos de <i>Coptotermes gestroi</i>	75
Figura 4. Secções das vesículas seminais dos reprodutores machos de <i>Coptotermes gestroi</i>	76
Figura 5. Ultraestrutura da vesícula seminal de reprodutores machos de <i>Coptotermes gestroi</i>	77

CAPÍTULO III

Figura 1. Imago macho e aparelho reprodutor de um imago macho de <i>Silvestritermes euamignathus</i>	96
Figura 2. Vista geral do aparelho reprodutor em machos de <i>Silvestritermes euamignathus</i> em corte longitudinal lateral	97
Figura 3. Lóbulos testiculares em machos de <i>Silvestritermes euamignathus</i>	98
Figura 4. Vista geral da vesícula seminal em machos de <i>Silvestritermes euamignathus</i>	99
Figura 5. Vesículas seminais em machos de <i>Silvestritermes euamignathus</i>	100
Figura 6. Vista geral do canal ejaculatório em machos de <i>Silvestritermes euamignathus</i>	101
Figura 7. Ultraestrutura dos testículos e vesícula seminal de <i>Silvestritermes euamignathus</i>	102

CAPÍTULO IV

Figura 1. Ínstares e castas reprodutivas de <i>Cryptotermes brevis</i>	121
Figura 2. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen de machos de <i>Cryptotermes brevis</i>	122
Figura 3. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen de fêmeas de <i>Cryptotermes brevis</i>	123
Figura 4. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen de reprodutores neotênicos de <i>Cryptotermes brevis</i> da colônia C	124
Figura 5. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen do rei neotênico de <i>Cryptotermes brevis</i> da colônia C	125

Sumário



SUMÁRIO

	página
RESUMO	06
ABSTRACT	08
Lista de Ilustrações	10
1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1. Infraordem Isoptera.....	18
• <i>Cryptotermes brevis</i>	20
• <i>Coptotermes gestroi</i>	20
• <i>Silvestritermes euamignathus</i>	20
1.2. A sociedade dos cupins.....	21
1.3. Aparelho reprodutor masculino	23
• Os testículos	23
• Espermatogênese e espermatozoides	25
• Os dutos deferentes	28
• As vesículas seminais.....	29
• O ducto ejaculatório e o pênis.....	31
1.4. O papel dos machos na reprodução	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivos específicos	33
CAPÍTULO I – “Espermatogênese e desenvolvimento das vesículas seminais em machos de <i>Cryptotermes brevis</i> (Isoptera, Kalotermitidae)”	34
Resumo	35
1. Introdução	36
2. Material e Métodos	38
2.1. Cupins	38
2.2. Morfologia e morfometria do aparelho reprodutor.....	38
2.3. Histologia e histoquímica	38
• Coloração com hematoxilina-eosina (HE).....	39
• Identificação de polissacarídeos neutros com a coloração de PAS (ácido periódico de Schiff).....	39

• Detecção de proteínas totais (ácidas e básicas) com a coloração de xylydine-Ponceau	40
2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	40
2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
2.6. Microscopia confocal por varredura a laser	40
3. Resultados	42
4. Discussão	53
Referências Bibliográficas	57

CAPÍTULO II – “Aparelho reprodutor em *Coptotermes gestroi* (Isoptera, Rhinotermitidae): uma abordagem estrutural e histoquímica”

Resumo	64
1. Introdução	65
2. Material e Métodos	67
2.1. Insetos	67
2.2. Formação de colônias no laboratório	67
2.3. Morfologia do aparelho reprodutor	67
2.4. Histologia e histoquímica	67
• Coloração com hematoxilina-eosina (HE).....	68
• Identificação de polissacarídeos neutros com a coloração de PAS (ácido periódico de Schiff).....	68
• Detecção de proteínas totais (ácidas e básicas) com a coloração de xylydine-Ponceau	69
• Identificação dos polissacarídeos neutros e ácidos com a coloração de PAS-Alcian Blue	69
• 2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	69
3. Resultados	70
4. Discussão	79
Referências Bibliográficas	82

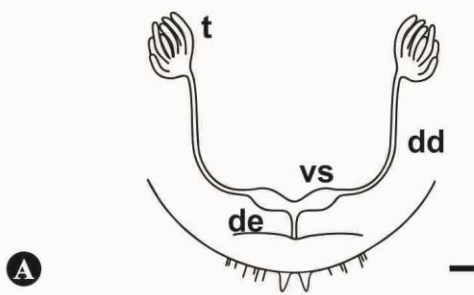
CAPÍTULO III – “Morfologia do sistema reprodutor durante o desenvolvimento do cupim *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae)”

Resumo	86
1. Introdução	87
2. Material e Métodos	90
2.1. Insetos.....	90
2.2. Formação de colônias no laboratório	90
2.3. Morfologia do aparelho reprodutor	90
2.4. Histologia e histoquímica	90
• Coloração com hematoxilina-eosina (HE).....	91
• Identificação de polissacarídeos neutros com a coloração de PAS (ácido periódico de Schiff).....	91
• Detecção de proteínas totais (ácidas e básicas) com a coloração de xylydine- Ponceau	92
2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	92
3. Resultados	93
4. Discussão	105
Referências Bibliográficas	108
CAPÍTULO IV – “Status reprodutivo e desenvolvimento do sistema reprodutor em neotênicos de <i>Cryptotermes brevis</i> (Isoptera, Kalotermitidae)”	113
Resumo	114
1. Introdução	115
2. Material e Métodos	118
2.1. Colônias de laboratório.....	118
2.2. Histologia	118
• Coloração com hematoxilina-eosina (HE).....	118
3. Resultados	120
4. Discussão	127
Referências Bibliográficas	131
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
APÊNDICE A	151
APÊNDICE B	153

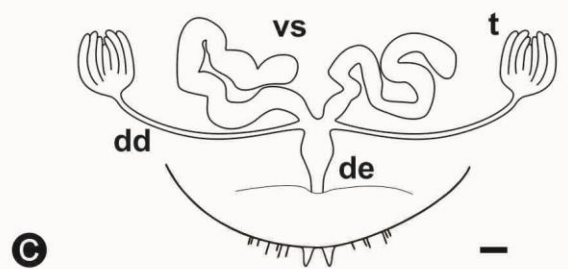
Introdução Geral



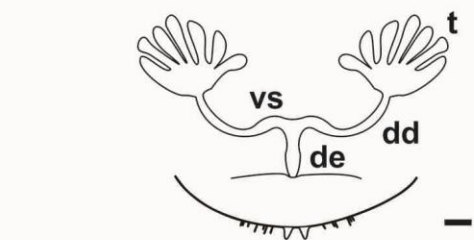
Revisão Bibliográfica



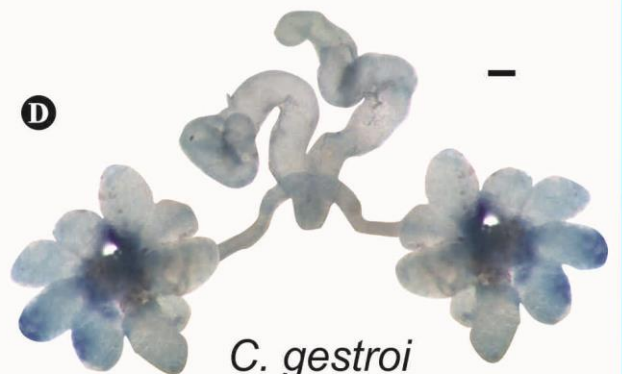
C. brevis



C. gestroi



S. euamignathus



C. gestroi

1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os cupins são insetos eussociais pertencentes à classe Insecta e à infraordem Isoptera (KRISHNA et al., 2013). Estes insetos constituem um importante grupo, com 2882 espécies de cupins descritas até o momento (CONSTANTINO, 2014), sendo 562 espécies encontradas na região Neotropical. No Brasil ocorrem cerca de 300 espécies que estão incluídas em quatro famílias: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitide e Termitidae (CONSTANTINO, 2015).

Todas as espécies conhecidas de cupins são sociais e divergiram de um ancestral comum que também originou as baratas subsociais da família Cryptocercidae, no final do Jurássico, cerca de 35 milhões de anos antes do aparecimento das formigas (ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009). A sociedade dos cupins, semelhante àquela dos Hymenoptera eussociais, é geralmente grande e apresenta divisão de trabalho característica, baseada na reprodução. Os Isoptera constituem um clado monofilético, no qual poucos indivíduos das colônias se reproduzem enquanto uma grande maioria renuncia a sua própria reprodução (KORB, 2007).

Os cupins diferem dos outros insetos sociais por apresentarem castas de ambos os sexos, um sistema de determinação do sexo diploide, desenvolvimento hemimetábolo e ínstares jovens participando do trabalho colonial (KRISHNA, 1969).

Coptotermes gestroi e *Cryptotermes brevis* são importantes espécies pragas exóticas no Brasil que apresentam nidificação distinta, já que a primeira constroi ninhos conspícuos e a segunda vive dentro da própria madeira que lhe serve de alimento. Desse modo, *C. brevis* é um cupim praga cosmopolita que pertence à família Kalotermitidae, considerada mais basal em termos evolutivos e *C. gestroi* é também um cupim praga porém pertencente à família Rhinotermitidae. Já *Silvestritermes euamignathus* é um cupim nativo da região Neotropical,

construtor de ninhos em montículos, característico de regiões de Cerrado e pertencente à família Termitidae, considerada mais derivada.

Em geral, o aparelho reprodutor masculino de insetos é constituído por um par de testículos conectados com vesículas seminais pareadas e um ducto ejaculatório mediano. Na maioria dos insetos há também um número variável de glândulas acessórias que se abrem no vaso deferente ou no ducto ejaculatório (CHAPMAN, 1998). Em Isoptera, o aparelho reprodutor dos machos é constituído por dois testículos, dois ductos deferentes, duas vesículas seminais e um ducto ejaculatório (GRASSÉ, 1982). Em cupins, estudos sobre aparelho reprodutor masculino são restritos aos reprodutores alados, os imagos. Modificações do sistema reprodutor dos reis desde o período da revoada até a maturidade e comparações deste sistema entre espécies pertencentes a diferentes famílias são escassas e, praticamente, restritas a cupins africanos.

1.1. Infraordem Isoptera

Atualmente os cupins são considerados baratas sociais e de acordo com Krishna et al. (2013) pertencem à infraordem Isoptera, contida na ordem Blattaria. Os argumentos que colocam cupins dentro do táxon Blattaria baseiam-se na evolução da eussocialidade nos Isoptera e são sustentados pelas baratas do gênero *Cryptocercus*, consideradas baratas subsociais. Adicionalmente, dados genéticos reforçam estes argumentos (INWARD; VOGLER; EGGLETON, 2007). Além disso, os comportamentos compartilhados por baratas e cupins dizem respeito à regulação das respostas ao ambiente físico, ou seja, ambos os grupos de insetos são fortemente tigmotáteis, têm aversão à luz e estão associados a temperaturas amenas e alta umidade (NALEPA, 2010). Outros comportamentos adicionais são o canibalismo, a habilidade de transportar alimento, comportamento de agregação, allogrooming, cuidado elaborado com a cria, comportamento higiênico e a supressão de artículos antenais (NALEPA, 2010).

Outro fator que aproxima Isoptera de Blattaria e os afasta dos Mantodea e da maioria dos Hymenoptera são as atividades diárias, incluindo forrageamento no escuro, que são fortemente baseadas em mecanismos não-visuais de orientação em direção aos recursos alimentares, locomoção e comunicação (NALEPA, 2010).

A Infraordem Isoptera encontra-se distribuída em nove famílias: Archotermopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Stolotermitidae, Stylotermitidae, Termitidae (ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009). Os cupins podem ser classificados baseando-se em sua ecologia e particularmente nos hábitos de alimentação e tipos de ninho. Porém, uma classificação tradicional e alternativa é quanto ao tipo de simbionte presente no trato digestivo desses insetos. Assim, os térmitas podem ser classificados em “cupins superiores”, que são aqueles cujo trato digestivo contém apenas bactérias como simbionte e são representados pela família Termitidae; e em “cupins inferiores”, cujos simbiontes do trato digestivo são em sua maioria protozoários, e correspondem a todas as outras famílias de Isoptera com exceção de Termitidae (KORB e HARTFELDER, 2008).

A família Kalotermitidae compreende os cupins de madeira seca e está distribuída nas regiões Australiana, Neoártica e Neotropical. As colônias da espécie *C. brevis* são pequenas, com cerca de 50 a 300 indivíduos, refletindo o tamanho da fonte alimentar que lhes serve de ninho (KORB e SCHMIDINGER, 2004).

A família Rhinotermitidae compreende os cupins subterrâneos, os quais são considerados pragas por se alimentarem de madeira estrutural e causarem danos em áreas urbanas (PEARCE, 1997; SU e SCHEFFRAN, 2000). No Brasil, foram catalogadas 12 espécies pertencentes a essa família (CONSTANTINO, 2014), a qual é subdividida em seis subfamílias: Coptotermitinae, Heterotermitinae, Psammotermitinae, Termitoginae, Rhinotermitinae e Prorhinotermitinae (ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009).

A família Termitidae constitui a maior família de cupins existente no mundo e abrange cerca de 75% de todas as espécies conhecidas. Todos os alados da família possuem fontanela e os cupins dessa família não apresentam protozoários simbiontes no intestino posterior (COSTA-LEONARDO, 2002). A família Termitidae é a mais diversificada do ponto de vista ecológico e compreende as subfamílias Sphaerotermitinae, Macrotermitinae, Foraminitermitinae, Syntermitinae, Nasutitermitinae, Apicotermitinae, Cubitermitinae e Termitinae (ENGEL, GRIMALDI; KRISHNA, 2009). A subfamília Syntermitinae abrange 15 gêneros de cupins, todos endêmicos da região Neotropical (ROCHA; CANCELLO, CARRIJO, 2012). Entre as espécies inclusas nessa subfamília, encontra-se a espécie recém-nomeada *S. euamignathus*.

***Cryptotermes brevis* (Walker, 1853)**

C. brevis é um cupim praga cosmopolita que pertence à família Kalotermitidae, considerada mais basal em termos evolutivos. Esta espécie de *Cryptotermes* é a mais abundantemente dispersa no mundo (GAY, 1967) e foi originalmente descrita para a Jamaica. Scheffrahn et al. (2000) relatam a presença desta espécie na natureza, em uma ilha do Havaí, contudo, sua origem permanece obscura e alguns autores admitem uma origem via região Neotropical. Assim como todos os indivíduos pertencentes à família Kalotermitidae, as espécies do gênero *Cryptotermes* seguem um desenvolvimento central (linear), o qual se caracteriza por sete mudas sucessivas que levam do primeiro ínstar larval ao alado (ROISIN, 2000). No entanto, esse desenvolvimento é altamente flexível. Após atingir o quarto ínstar larval, um indivíduo pode sofrer uma combinação de mudas progressivas, estacionárias ou regressivas e se tornar uma ninfa, um reprodutor neotênico ou um soldado (ROISIN, 2000), em resposta às condições ambientais (KORB e LENZ, 2004) e às condições da própria colônia (LENZ; MCMAHAN; WILLIAMS, 1982).

***Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896)**

O gênero *Coptotermes* pertence à subfamília Coptotermitinae e possui representantes distribuídos por todo o mundo (PEARCE e WAITE, 1994). Esse gênero apresenta aproximadamente 76 espécies descritas, sendo *C. gestroi* uma das mais importantes do ponto de vista econômico (CONSTANTINO, 2014). *C. gestroi* é cupim praga exótico introduzido no Brasil no século passado, com registros que datam de 1923 no Rio de Janeiro (RJ) e 1934 em Santos (SP) (ARAÚJO, 1958).

***Silvestritermes euamignathus* (Silvestri, 1901)**

S. euamignathus é uma espécie de cupim nativa da região Neotropical e pertencente à família Termitidae. Caracteriza-se por construir ninhos em montículos, típico de regiões de Cerrado (MATHEWS, 1977; DOMINGOS, 1985). Este cupim forma reprodutores de substituição do tipo ninfoide na ausência de um ou dos dois reprodutores primários. Este fenômeno foi observado em colônias de cupins orfanadas naturalmente (COSTA-LEONARDO; BARSOTTI; SOARES, 1996; 1999) e reproduzido após a retirada experimental dos reprodutores primários (COSTA-LEONARDO; SOARES; BARSOTTI, 1998). Costa-

Leonardo, Barsotti e Soares (1996) encontraram até 83 neotênicos em um mesmo ninho de *S. euamignathus*.

1.2. A sociedade dos cupins

O ninho é uma característica de todos os insetos eussociais, mas entre os cupins existe uma grande diversidade de tipos, alguns com arquitetura complexa que atingem tamanhos enormes e outros mais simples, que consistem de túneis escavados em uma peça de madeira (NOIROT e DARLINGTON, 2000). Uma divisão clássica dos tipos de ninhos é: “ninhs de uma peça”, característico de Termopsidae, Kalotermitidae e *Prorhinotermes* ou “ninhs de múltiplas peças”, observados em Mastotermitidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae (exceto *Prorhinotermes*) e Termitidae (KORB e HARTFELDER, 2008).

A determinação e o desenvolvimento de castas é mais complexo e mais plástico em cupins do que em himenópteros; no entanto, assim como em himenópteros, as castas reprodutivas dos cupins correspondem ao ponto final do desenvolvimento pós-embrionário (ROISIN e KORB, 2011). Os térmitas apresentam uma organização social complexa com especialização dos indivíduos em castas. A diferenciação das castas ocorre durante o desenvolvimento ontogenético dos indivíduos e pode ser influenciada tanto por fatores ambientais (MAO e HENDERSON, 2007) como determinada geneticamente (HAYASHI et al., 2007; KITADE et al., 2011).

Em geral, as colônias de cupins são formadas por indivíduos pertencentes a duas linhagens distintas, uma linhagem reprodutiva ou imaginal, composta por ninfas, indivíduos alados, o rei e a rainha; e uma linhagem neutra ou áptera, da qual fazem parte os operários e os soldados, bem como os ínstares precedentes destes indivíduos (ROISIN, 2000).

Os indivíduos sexuais são geralmente o rei e a rainha, denominados reprodutores primários, derivados de alados que perderam suas asas após o voo nupcial. O rei sempre permanece ao lado da rainha e a fecundação ocorre ao longo da vida desses reprodutores. Em algumas espécies, a rainha torna-se fisogástrica e produz muitos ovos, como ocorre com o cupim subterrâneo *C. gestroi*, no qual as colônias apresentam alta densidade populacional (COSTA-LEONARDO e CAMARGO-DIETRICH, 1999).

De acordo com Thorne (1996) e Roisin (2000), ninfas são os indivíduos que apresentam brotos de asas e fazem parte da linhagem imaginal, a qual dará origem aos alados. Podem apresentar olhos brancos ou levemente pigmentados. Nos Rhinotermitidae, as ninfas não são indivíduos dependentes, como os soldados e as larvas. Experimentos realizados com ninfas de *Coptotermes formosanus* mostraram que quando mantidas isoladas, elas são capazes de sobreviver. Elas também foram observadas realizando “grooming” nos soldados, quando os operários eram retirados dos experimentos (CROSLAND e SU, 2006). Já os reprodutores alados são os adultos que não sofrem novas mudas; apresentam o corpo bastante pigmentado, olhos compostos e são os fundadores de novas colônias. Eles são destinados à reprodução e possuem dois pares de asas membranosas, úteis apenas durante a revoada (FONTES e ARAÚJO, 1999). Quando os alados de uma colônia têm uma proporção de sexo inclinada para um dos sexos, a exogamia é promovida, porque a probabilidade de pareamento dentro da colônia é diminuída.

Além disso, em uma colônia de cupins podem aparecer reprodutores de substituição quando um ou ambos os reprodutores primários morrem. Estes indivíduos são denominados reprodutores neotênicos porque amadurecem o aparelho reprodutor antes de alcançarem a idade adulta. Reprodutores neotênicos são machos ou fêmeas que sempre mantêm características juvenis e substituem os reprodutores primários. Esse tipo de reprodutor é mais frequentemente observado em cupins inferiores (MILLER, 1969), e não é bem conhecido nos cupins superiores (NOIROT, 1969). Eles se desenvolvem após a perda dos reprodutores primários e são classificados em ninfoides, quando derivados das ninfas que retêm as tecas alares, ou ergatoides, quando derivados de operários, que são ápteros (NOIROT, 1990; ROISIN, 2000). Korb e Hartfelder (2008) recomendam utilizar a denominação reprodutores braquípteros, quando derivados de ninfas, e ápteros, quando derivados de instares larvais para cupins inferiores. Costa-Leonardo, Barsotti e Soares (1999) estudaram a morfologia dos reprodutores de substituição ninfoides em três ninhos de *S. euamignathus* e verificaram ovariolos com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento nas secções histológicas das fêmeas analisadas. Os machos analisados mostraram testículos multilobulados e com desenvolvimento semelhante ao dos reprodutores primários, apresentando testículos maduros e ativos na espermatogênese, com espermatozoides na região proximal do ducto deferente.

1.3. Aparelho reprodutor masculino

O sistema reprodutor de machos e fêmeas passou por uma considerável evolução dentro dos grupos. Nos machos, o número de elementos testiculares passou por um desenvolvimento semelhante ao das fêmeas, porém com um menor aumento dos elementos germinativos das formas mais primitivas para as mais derivadas. As chamadas vesículas seminais ou glândulas acessórias mostraram uma grande diversidade de grupo para grupo, enquanto os espermatozoides sofreram acentuadas modificações de forma e tamanho (WEESNER, 1969).

O aparelho reprodutor dos machos de Isoptera é constituído por dois testículos, dois dutos ou vasos deferentes, duas vesículas seminais e um duto ejaculatório ou ejaculador (GRASSÉ, 1982). Segundo Costa-Leonardo e Barsotti (1998), o aparelho reprodutor do macho de *C. gestroi* é constituído por dois testículos, dois canais deferentes, duas vesículas seminais e um ducto ejaculatório situado sob o 9º esternito abdominal. Todos os constituintes do aparelho reprodutor são embriologicamente de origem mesodérmica, menos o duto ejaculador, que é uma invaginação da ectoderme.

Os testículos

Nos insetos em geral, os testículos localizam-se acima ou abaixo do intestino, no abdômen, e estão frequentemente próximos à linha mediana do corpo. Geralmente cada testículo é constituído por uma série de tubos ou folículos arranjados em números que variam de 01, no coleóptero Adephaga até 100 em gafanhotos (Acrididae). Alguns Lepidoptera apresentam folículos não completamente separados um do outro e em Diptera, os testículos são sacos individuais simples, que podem ser considerados como folículos únicos (CHAPMAN, 1998). Em *Polistes vesicolor vesicolor* (Hymenoptera), cada testículo é formado por 3 folículos fusiformes, dos quais emergem dutos eferentes que mais tarde se unem formando o duto deferente. Estes folículos são cobertos por uma única cápsula e preenchidos inteiramente por cistos, os quais possuem até 95 espermatozoides em média (ARAÚJO; MOREIRA; LINO-NETO, 2010).

Em abelhas os testículos podem encontrar-se separados, ambos no interior da mesma cápsula, ou unidos medianamente por um prolongamento da cápsula envoltória. Os folículos testiculares são mantidos juntos por uma cápsula envolvente ou membrana peritoneal. Eles são

estruturas alongadas, limitadas externamente por um epitélio fino de células escamosas e envolvidos pela membrana peritoneal (CHAPMAN, 1998). A parede dos folículos é formada por um epitélio delgado, algumas vezes constituído por duas camadas de células, que se dispõem sobre a lâmina basal. Os folículos são mantidos unidos por uma bainha peritoneal, formada por tecido conjuntivo (CHAPMAN, 1998).

Em Isoptera, os testículos consistem em um número de folículos testiculares unidos em um cluster apertado. Eles estão localizados lateralmente ao sistema digestivo, na região posterior do abdômen, sendo que deles partem dutos deferentes que terminam no duto ejaculatório comum (WEESNER, 1969). De acordo com o mesmo autor, os testículos são constituídos por um número variável de folículos testiculares, sendo 9 em *Kaloterme flavicollis* (STELLA, 1938) e de 7 a 9 em *Reticulitermes hesperus* (WEESNER, 1956). Os testículos de *C. gestroi* são constituídos por vários folículos agrupados e estão localizados látero-dorsalmente no abdômen posterior. No macho alado, os testículos são pouco desenvolvidos e não se distinguem bem os folículos individualizados porque estes ficam compactamente agrupados. Contudo, um rei primário de uma colônia de 2 anos pode ter até 7 folículos distintos (COSTA-LEONARDO, 2002). Segundo Weesner (1969), os testículos dos Termitidae são mais estruturados, com folículos constituídos por túbulos espermáticos.

A porção terminal de cada folículo testicular consiste de uma massa pequena e irregular, geralmente achatada e densamente empacotada de células, entre as quais células em divisão são frequentemente observadas. A aparência geral dessa região é comparável ao germário das fêmeas, tanto em cupins como em abelhas (WEESNER, 1969; CRUZ-LANDIM, 2008). Em Isoptera, aparentemente não há uma célula apical, como encontrado nos testículos de alguns insetos, como é o caso da abelha *Apis mellifera* (CRUZ-LANDIM, 2008) e do lepidóptero *Diatraea saccharalis* F. (BILHA, 2008). Abaixo do germário, as células são arredondadas, ou cuboídes, com núcleo redondo e estão arranjadas em grupos ou cistos, nos quais, todas as células de um cisto apresentam estágios compatíveis de desenvolvimento. Nos cistos superiores, os núcleos das células apresentam arranjos difusos de cromatina. Alguns grupos mostram células com arranjos típicos da prófase meiótica enquanto outros grupos estão passando por outros estágios de divisão meiótica, com todas as células de um mesmo cisto, apresentando estágios de desenvolvimento bem próximos. Na região basal de cada túbulo espermático são encontrados cistos contendo espermátides e espermatozoides. Os cistos

aparentemente arrebentam e os espermatozoides são liberados no vaso deferente (WEESNER, 1969).

Espermatogênese e espermatozoides

Em insetos, o desenvolvimento das células germinativas masculinas geralmente ocorre em compartimentos, chamados de cistos (ARAÚJO; MOREIRA; LINO-NETO, 2010). Estes cistos são encontrados dentro dos túbulos seminíferos ou folículos testiculares e são formados por clones de células germinativas cercadas por uma camada epitelial de células não germinativas (BACCETTI e BAIRATI, 1964). Durante a espermatogênese, as espermatogônias sofrem divisões mitóticas que geram um número constante de células por cisto. Após duas divisões meióticas, as células se tornam espermátides (LINDSLEY e TOKUYASU, 1980; OGUMA e KUROKAWA, 1984; CRUZ-LANDIM, 2001; LINO-NETO ARAÚJO; DOLDER, 2008). Geralmente, as divisões mitóticas dentro de um mesmo cisto são sincrônicas, com algumas exceções como em *Drosophila* (Diptera), cujas divisões são assincrônicas, gerando um número variável de espermatozoides por cisto (LIEBRICH, 1984).

Cada espécie tem um número particular de espermátides/espermatozoides dentro do cisto, que é determinado pelo número de divisões celulares, o qual é constante para cada espécie, mas pode variar de espécie para espécie. Frequentemente, após a espermiogênese, os espermatozoides do mesmo cisto podem permanecer juntos, como um feixe, por um período variável de tempo. De acordo com Virkki (1970, 1973), insetos mais derivados tendem a ter menos espermatozoides por feixe do que os menos derivados.

Descrições da espermatogênese em Isoptera foram realizadas por Weesner (1953) em *Tenuirostritermes tenuirostris*, por Banerjee (1961) em *Odontotermes redemani* e por Grandi (1992) em *K. flavicollis*.

A espermatogênese em cupins se inicia prematuramente na fase ninfal (GRANDI, 1992; YE; JONES; AMMAR, 2009), podendo ser comparado este desenvolvimento prematuro à espermatogênese dos machos de abelhas, cujo início se dá entre o 3º e 4º estágios larvais (CRUZ-LANDIM, 2008) e da vespa *Polistes*, cuja espermatogênese se inicia no estágio pupal (ARAÚJO; MOREIRA; LINO-NETO, 2010). Dean e Gold (2004) encontraram espermatozoides maduros no duto ejaculatório de larvas de 5º instar de *Reticulitermes flavipes*.

Diferentemente dos machos de formigas (BALL e VINSON, 1984), abelhas (DALLACQUA e CRUZ-LANDIM, 2003) e vespas (ARAÚJO et al., 2005), que só produzem espermatozoides uma vez e cujos testículos degeneram após a migração dos espermatozoides para a vesícula seminal, os machos de cupins produzem espermatozoides ao longo de toda a vida, em maior ou menor quantidade, de acordo com ciclos reprodutivos e apresentam um aumento do volume testicular com o passar dos anos (HIGA, 1981; RAINA; PARK; FLORANE, 2003).

Variações na morfologia dos espermatozoides dos Isoptera já foram descritas, sendo que a maioria deles não é flagelada (GRASSÉ, 1982; JAMIESON, 1987). Os espermatozoides de cupins apresentam morfologia muito mais diversificada quando comparados com himenópteros sociais, (CAETANO, 1980; JAMIESON, 1987; QUICKE et al., 1992). Nestes últimos, os espermatozoides têm a mesma estrutura básica de outros insetos, sendo uma célula alongada sem distinção entre a cabeça e a cauda. O comprimento total dos espermatozoides é variável em formigas e abelhas sociais (BAER, 2005; BAER; ARMITAGE; BOOMSMA, 2006) e uma redução na variação do tamanho do espermatozoide em espécies poliândricas indicam que a seleção natural pode ter influência na evolução (FITZPATRICK e BAER, 2011).

Weesner (1969) reportou um tipo de espermatozoide semelhante ao dos himenópteros sociais para os cupins. De acordo com Baccetti, Dallai e Callaini (1981), os Rhinotermitidae e Termitidae têm espermatozoides esféricos e aparentemente imóveis. Já o cupim *Mastotermes darwiniensis*, possui espermatozoides flagelados (BACCETTI e DALLAI, 1977). Segundo Grassi e Sandias (1893), os espermatozoides de *K. flavicollis* não são flagelados e têm a forma de uma semente de zínia. Bugnion e Popoff (1912) descreveram o espermatozoide de Termitidae como corpos arredondados muito pequenos e não flagelados. Imms (1948) enfatiza que os espermatozoides de *Archotermopsis wroughtoni* possuem a forma geralmente encontrada em outros insetos, incluindo flagelo. Em *Zootermopsis*, o espermatozoide também parece ser flagelado (STEVENS, 1905). De acordo com Grassé (1949), os espermatozoides de Kalotermitidae variam de 12 a 20 μm de comprimento. Em Rhinotermitidae e Termitidae, os espermatozoides são menores, arredondados e possuem de 1,5 a 4 μm de diâmetro, tendendo a ser maior nos Rhinotermitidae e menor nos Termitidae, além de não flagelados e aparentemente imóveis (Tabela 1).

Em adição ao esperma que parece ser normal para a espécie, há geralmente presente também um esperma abortivo, e o cisto todo pode sofrer desenvolvimento anormal (JUCCI,

1924; GRASSÉ e BONNEVILLE, 1936; GRASSÉ, 1937; STELLA, 1938; LIGHT; WEESNER, 1955). Tal esperma aberrante é mais ou menos numeroso no ducto deferente e foi considerado por Jucci (1924) como sendo um tipo de esperma nutridor. Em outras espécies, esse tipo de esperma também foi encontrado nas vesículas seminais.

Tabela 1. Tipos de espermatozoides encontrados em Isoptera.

Espécies	Espermatozoide	Referência
MASTOTERMITIDAE		
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Multiflagelados, em forma de cone	Bacetti & Dallai, 1977, 1978
HODOTERMITIDAE		
	Desconhecido	Desconhecido
ARCHOTERMOPSIDAE		
<i>Zootermopsis nevadensis</i>	Não flagelado, em forma de haste	Bacetti et al., 1981 Jamieson et al., 1999
STOLOTERMITIDAE		
	Desconhecido	Desconhecido
KALOTERMITIDAE		
<i>Kalotermes flavicollis</i>	Não flagelado, em forma de semente de zínia (em forma de cone)	Grassia & Sandias, 1893; Vieau, 1973
<i>Cryptotermes brevis</i>	Não flagelado, em forma de semente de zínia (em forma de cone)	Estudo atual
STYLOTERMITIDAE		
	Desconhecido	Desconhecido
RHINOTERMITIDAE		
	Não flagelado	Bacetti et al., 1974
<i>Reticulitermes lucifugus</i>	Esférico, não flagelado	Bacetti, 1972, 1974, 1979

<i>Coptotermes amanii</i>	Esférico, não flagelado	Bacetti et al., 1981; Tuzet, 1977
<i>Coptotermes gestroi</i>	Esférico, não flagelado	Costa-Leonardo, 2002
SERRITERMITIDAE	Esférico, não flagelado	Costa-Leonardo (comunicação pessoal)
TERMITIDAE	Esférico, não flagelado	Bugnion & Popoff, 1912; Grassé, 1982
<i>Macrotermes natalensis</i>	Esférico, não flagelado	Geyer, 1951
<i>Amitermes unidentaus</i>	Esférico, não flagelado	Bacetti et al., 1981
<i>Macrotermes sp.</i>	Esférico, não flagelado	Jamieson et al., 1999
<i>Odontotermes sp.</i>	Esférico, não flagelado	
<i>Odontotermes classicus</i>	Esférico, não flagelado	
<i>Trinevitermes díspar</i>	Esférico, não flagelado	
<i>Silvestritermes euamignathus</i>	Esférico, não flagelado	Laranjo & Costa-Leonardo, 2015

Os dutos deferentes

Quanto aos vasos deferentes, estes parecem ser tubos condutores de espermatozoides dos testículos para o ducto ejaculatório, contudo, aparentemente também servem para armazenamento de esperma. Eles se originam a partir dos testículos e descem verticalmente, inserindo-se em um ducto comum, o ducto ejaculatório mediano (WEESNER, 1969). Na vespa *P. vesicolor*, a primeira metade do ducto deferente é alargada e diferenciada em uma região especializada para o armazenamento de esperma, a vesícula seminal (ARAÚJO; MOREIRA; LINO-NETO, 2010).

Em Termitidae, os dutos deferentes podem ser considerados mais largos na base. Imms (1919) observou que os dutos deferentes de *A. wroughtoni* se juntam imediatamente antes de sua inserção na região mediana-dorsal do ducto ejaculatório. Em todas as outras espécies

estudadas, os dutos deferentes aparentemente entram no ducto ejaculatório independentemente. Em *M. darwiniensis*, os dutos deferentes se curvam em direção às projeções das glândulas acessórias e se abrem na região anterior do ducto ejaculatório, pela região ventral. Em *Zootermopsis angusticollis*, *Anacanthotermes ochraceus* e *K. flavicollis*, os dutos deferentes se abrem a partir da região dorsal. Isso também ocorre na família Rhinotermitidae, cujas espécies estudadas foram: *R. hesperus*, *Reticulitermes lucifugus*, *Psammotermes assuanensis*, *Coptotermes sjöstedti* e *Schedorhinotermes javanicus*.

As vesículas seminais

Nos cupins inferiores há várias estruturas associadas com o sistema reprodutor masculino que têm sido chamadas por diferentes autores de vesículas seminais ou glândulas acessórias. Existe uma certa confusão no que diz respeito à distinção entre ducto ejaculatório e glândulas acessórias. Imms, Thompson, Weesner e outros têm considerado a estrutura na qual os dutos deferentes se abrem, como ducto ejaculatório, o qual suporta em sua região anterior as glândulas acessórias pareadas, ou vesículas seminais. Jucci e outros autores italianos têm considerado a estrutura na qual os dutos deferentes desembocam como a porção basal ou comum das vesículas seminais (WEESNER, 1969).

De acordo com Chapman (1998), em muitos insetos as vesículas seminais são dilatações do ducto deferente. Em alguns insetos, as vesículas seminais têm origem epidermal e sua luz tem um forro cuticular. Neste caso, as células são glandulares e provavelmente fornecem nutrição para o espermatozoide (CHAPMAN, 1998). Nos cupins inferiores, existem estruturas que foram associadas com o sistema reprodutor dos machos e que foram denominadas glândulas acessórias ou vesículas seminais (WEESNER, 1969; GRASSÉ, 1982; GODOY e TORALES, 2000). Contudo, a ausência das vesículas seminais nos cupins superiores ou Termitidae é controversa.

Em *M. darwiniensis*, a vesícula seminal é uma estrutura elipsoidal que se mantém sésil e possui projeções glandulares em forma de couve-flor no seu polo cefálico (SPRINGHETTI, 1952). Springhetti e Oddone (1963), estudando machos da família Rhinotermitidae, descreveram as vesículas seminais como estruturas bastante longas no seu aspecto dorsal, largas e pareadas, com projeções em forma de dedo no pólo cefálico. Estas projeções saem em pares de um tronco curto e comum. No aspecto ventral, há um par de troncos secundários que surgem

do lobo esquerdo e direito, quase que imediatamente após a bifurcação inicial. Estes troncos secundários, também sustentam projeções em forma de dedo em seu pólo cefálico.

Imms (1919), estudando machos de *A. wroughtoni* descreveu as vesículas seminais como clusters de túbulos que emergem de tubos basais maiores e pareados. O mesmo padrão é observado em *Z. angusticollis* (THOMPSON, 1922; CHILD, 1934; SPRINGHETTI, 1953). Em *Anacanthotermes ochraceus*, as vesículas seminais consistem em dois troncos basais, cada um sustentando numerosos túbulos em forma de dedo no pólo anterior, que se bifurcam várias vezes de maneira irregular. Posteriormente, os dois troncos se unem para formar uma câmara comum na qual o duto deferente se abre.

Em *K. flavicollis*, as vesículas seminais não possuem os túbulos em forma de dedo no pólo cefálico e consistem de duas estruturas em forma de saco, bastante amplas. A porção terminal da vesícula seminal é irregular, rasa e em forma de bolsos (JUCCI, 1924; STELLA, 1938; GELMETTI, 1958). Já em Rhinotermitidae, as vesículas seminais são simples, pareadas e alongadas, chegando da margem anterior do duto ejaculatório ventral e imediatamente adjacentes, às aberturas dos dutos deferentes (GRASSI e SANDIAS, 1893; THOMPSON e SNYDER, 1920; JUCCI, 1924; WEESNER, 1956; SPRINGHETTI e GELMETTI, 1960). Em Termitidae, aparentemente não há nenhuma estrutura comparável à vesícula seminal dos cupins inferiores.

Muitos autores concordam que as várias estruturas associadas com a porção anterior do duto ejaculatório no trato reprodutivo dos machos dos cupins inferiores têm função secretora. Se elas funcionam como áreas de estocagem de espermatozoides ainda não foi bem resolvido. Em *Anacanthotermes* (IMMS, 1919), *Zootermopsis* (THOMPSON, 1922) e *Mastotermes* (SPRINGHETTI e ODDONE, 1963) não foram observados espermatozoides nas vesículas seminais. Já para *K. flavicollis* e *R. lucifugus*, Jucci (1924) afirma que as vesículas seminais servem como áreas de estocagem de espermatozoides. Jucci (1924) observou que as vesículas seminais contêm várias inclusões esféricas, chamadas de elementos degenerativos dos testículos ou células nutridoras de espermatozoides. Estas células podem auxiliar na manutenção dos espermatozoides durante o período em que ele fica retido no macho. Estas inclusões ocorrem com uma abundância variada nas estruturas acessórias dos outros grupos de cupins.

O duto ejaculatório e o pênis

O duto basal comum, no qual os dutos deferentes se abrem é considerado por alguns como uma porção comum das glândulas acessórias e por outros, como uma estrutura distinta, o duto ejaculatório. Este duto pode ser definido como um tubo curto e muscular no qual desembocam os dutos deferentes e as glândulas acessórias. Ele pode ser bastante bulboso anteriormente e estreito posteriormente e se abre através de um poro mediano simples na margem posterior do 9º esternito (WEESNER, 1969).

Nem as rainhas nem os reis possuem genitália externa esclerotizada (WEESNER, 1969), com exceção do *Stolotermes ruficeps* (KLASS; THORNE; LENZ, 2000) e *M. darwiniensis* (KLASS, 2000), nos quais os machos possuem um pequeno e simétrico lobo fálico, muito diferente da complexa, muito esclerotizada e assimétrica genitália das baratas e mantídeos (GRANDCOLAS, 1996). Em *Rotunditermes rotundiceps* (HOLMGREN, 1909) e *Hodotermes mossambicus* (GEYER, 1951), o gonóporo se localiza numa papila, o que pode representar um pênis membranoso. Em *T. tenuirostris* (LIGHT; WEESNER, 1955) e *R. hesperus* (WEESNER, 1956), o gonóporo é cercado por uma invaginação dessa membrana intersegmental, o que forma uma cobertura distinta, sugerindo que a porção proximal do duto ejaculatório é na verdade, um pênis curto e capaz de se esconder.

A genitália externa dos machos e fêmeas é assumida como sendo de central importância para a seleção sexual (EBERHARD, 1985; 1996) e evoluiu rápido o suficiente de modo que pode ser usada na taxonomia como uma característica altamente espécie-específica (BELYAEVA e DOVGOBROD, 2006). A ausência dessa genitália em cupins pode ser outro indicador de que a seleção sexual é altamente ausente em muitas espécies destes insetos.

De um modo geral, os espermatozoides parecem ser transferidos para a fêmea pela membrana intersegmental, em volta do gonóporo masculino e/ou pela porção proximal do duto ejaculatório, que forma um *aedeagus* membranoso e dilatável (WEESNER, 1969).

1.4. O papel dos machos na reprodução

Em contraste com os himenópteros, a cópula dos cupins não ocorre durante a revoada e formação dos pares, mas sim, depois da fundação da colônia e dentro da proteção da cavidade do ninho (NUTTING, 1969). A cópula dos cupins ocorre em posição oposta, similar às baratas,

e é precedida por comportamentos de corte, incluindo antenação mútua e "grooming" (RAINA; PARK; FLORANE, 2003). A duração e a frequência das cópulas em pares maduros são desconhecidas, porém em casais com menos de um ano de idade foram observadas cópulas que duram de 30 segundos a 10 minutos e que podem ocorrer muitas vezes durante 24 horas (HIGA, 1981; RAINA; PARK; FLORANE, 2003). Durante a cópula, o esperma é transferido para a câmara genital externa das fêmeas. Em fêmeas recém inseminadas de *R. hesperus*, os espermatozoides estavam embebidos em uma matriz dentro da câmara genital (WEESNER, 1969).

O fluido seminal é um meio complexo que contém uma grande variedade de moléculas, produzidas principalmente pelas glândulas acessórias sexuais e por outras células que não os espermatozoides (POIANI, 2006). Esses componentes do fluido seminal podem ter várias funções comparáveis àquelas conhecidas para muitos himenópteros, nos quais eles são de importância central para manter os espermatozoides vivos (KING et al., 2011).

A habilidade que os reis de cupins têm de prover grande quantidade de esperma viável para a rainha continuamente por várias décadas é tão importante quanto a capacidade de algumas rainhas de himenópteros sociais de armazenar o esperma do seu par falecido por uma quantidade de tempo semelhante (PAMILO, 1991; KELLER e GENOUD, 1997). A grande fertilidade dos reis é ilustrada em *Reticulitermes speratus*, no qual um único rei é capaz de copular repetidamente e prover esperma para centenas de rainhas de substituição (MATSUURA et al., 2009).

A redução ou ausência de vesículas seminais nos cupins superiores (WEESNER, 1969; GRASSÉ, 1982) indica que a seleção natural pós-copulatória nos componentes dos fluidos seminais é altamente ausente neste grupo, mas podem ocorrer nos cupins inferiores.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi estudar a morfologia comparativa do sistema reprodutor dos machos dos ínstaros (ninfas) e castas reprodutivas (alados e reis) de *Cryptotermes brevis* (Kalotermitidae), *Coptotermes gestroi* (Rhinotermitidae) e *Silvestritermes euamignathus* (Termitidae) visando entender a organização desse sistema nestas espécies de

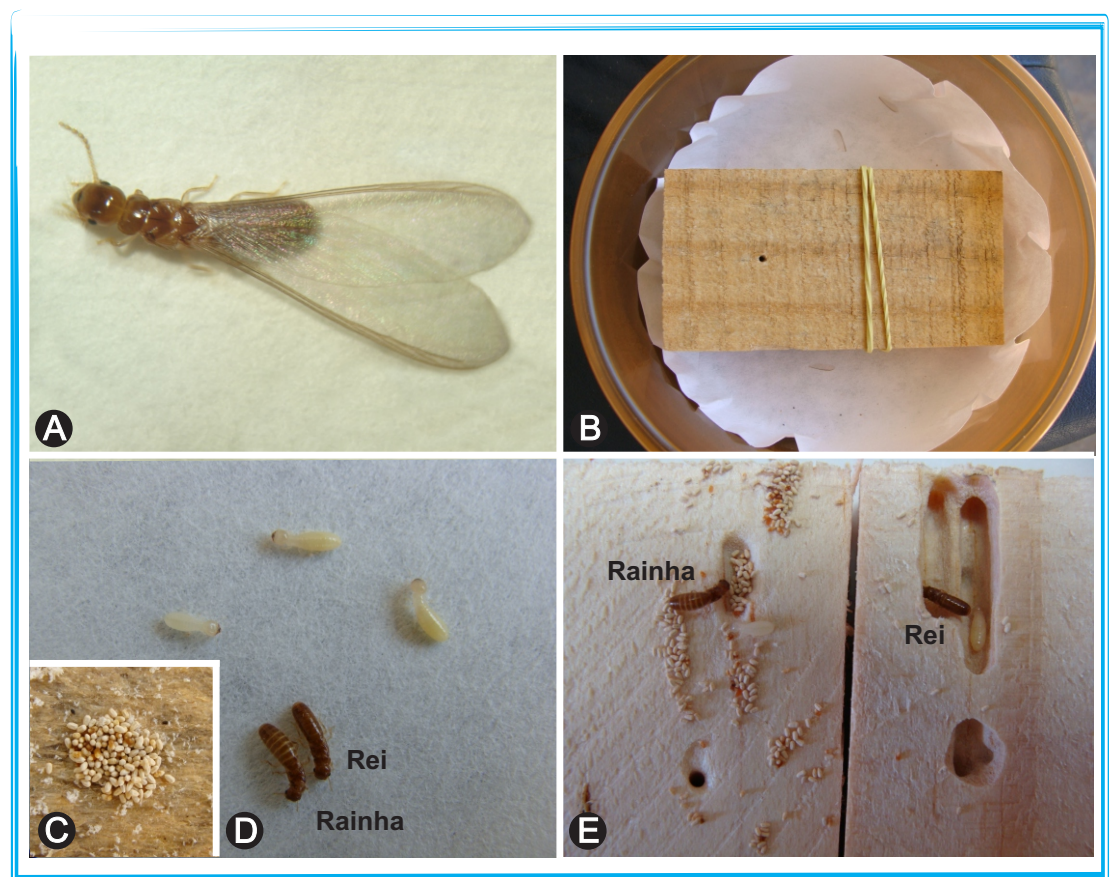
cupins, representantes de três diferentes famílias, bem como descrever a estrutura das vesículas seminais em reprodutores funcionais, tanto criados em laboratório como de colônias naturais.

2.1. Objetivos específicos

- Qual a dinâmica funcional das estruturas componentes do aparelho reprodutor?
- Existem vesículas seminais ou apenas dilatações dos dutos deferentes na espécie representante da família Termitidae?
- O desenvolvimento do aparelho reprodutor em alados machos e reis é basicamente o mesmo nos representantes das 3 famílias ou é diferente?
- Qual a ultraestrutura das vesículas seminais nas diferentes espécies de cupins estudadas?

Capítulo I

*Espermatogênese e desenvolvimento das vesículas
seminais em machos de Cryptotermes brevis
(Isoptera, Kalotermitidae)*



RESUMO

A maioria dos estudos disponíveis sobre o sistema reprodutor dos cupins, é restrito às fêmeas ou aos reprodutores alados, sendo que neste aspecto os reis foram negligenciados. O presente estudo utiliza microscopia de luz, histoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, além de microscopia confocal por varredura a laser para caracterizar o sistema reprodutor de machos de *Cryptotermes brevis* em diferentes fases da vida, desde ninfas de último ínstar até reis primários com um ano de idade. Os resultados mostraram que em todos os machos estudados, o aparelho reprodutor é formado por um par de testículos, dois dutos deferentes, duas vesículas seminais e um ducto ejaculatório, além de um pênis retrátil. Contudo, os testículos amadurecem precocemente nos machos dessa espécie, uma vez que nas ninfas, que são indivíduos jovens precursores dos imagos ou reprodutores alados, já existem espermatozoides. Os testículos apresentam-se formados por lóbulos individualizados, sendo que em reis primários de 1 ano de idade existem cerca de 7 lóbulos por testículo, os quais contêm cistos com células sexuais que estão no mesmo estágio de desenvolvimento. Espermatozoides em forma de cone estão presentes em machos de todas as idades examinadas, contudo, aparecem em maior número nos reprodutores primários. As vesículas seminais se apresentam como uma dilatação contínua dos dutos deferentes, que aumenta nos reis funcionais mais velhos. Elas se diferenciam dos dutos deferentes por apresentarem um epitélio mais colunar, além de produzirem uma secreção nos reis funcionais, a qual é constituída por uma mistura de polissacarídeos e proteínas. Esta secreção não está presente nas vesículas seminais dos reprodutores alados. Ninfas não possuem espermatozoides nas vesículas seminais, estando estes restritos aos testículos e dutos deferentes. Nos imagos e reis espermatozoides são observados ao longo de todo o aparelho reprodutor. A grande quantidade de secreção e espermatozoides observada em reis primários sugere uma habilidade desses indivíduos em prover esperma viável para as fêmeas, apesar da fecundidade da colônia ser limitada pela ausência de uma fisogastria avantajada na fêmea e pela disponibilidade de alimento e espaço para o crescimento das colônias.

Palavras-chave: sistema reprodutor, vesículas seminais, testículos, morfologia, histoquímica.

1. INTRODUÇÃO

Todos os cupins são eussociais e, de acordo com recente classificação de Krishna et al. (2013), estão inclusos na ordem Blatária e agrupados em 9 famílias dentro da infraordem Isoptera. Estes insetos são derivados de um ancestral comum das baratas subsociais da família Cryptocercidae, família considerada grupo-irmão dos Isoptera (ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009). Cerca de 70% das espécies de Isoptera existentes pertencem à família Termitidae, que é considerada mais derivada, sendo os constituintes desta família conhecidos como "cupins superiores", por apresentarem bactérias como simbioses no trato digestivo (EGGLETON e TAYASU, 2001; INWARD; VOGLER; EGGLETON, 2007; ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009). As demais espécies, pertencentes às outras 8 famílias estão incluídas nos cupins conhecidos como "inferiores", pois seus representantes se alimentam principalmente de madeiras e possuem protozoários e bactérias como simbioses no trato digestivo (ROISIN, 2000; VARGO e HUSSENER, 2009).

Entre os "cupins inferiores", os representantes da família Kalotermitidae, como *Cryptotermes brevis*, são considerados cupins basais, com ninhos localizados dentro da madeira que lhes serve de alimento. Atualmente, esta espécie apresenta grande distribuição em toda a faixa tropical do mundo, tendo ampliado seus limites também para áreas subtropicais (EDWARDS e MILL, 1986; SCHEFFRAHN e KRECEK, 1999). *C. brevis* é um cupim de madeira seca, considerado uma importante praga de madeira estrutural de edificações e de acervos históricos no Brasil (VASCONCELLOS et al., 2002), podendo uma colônia madura sobreviver em um pedaço de madeira por alguns anos (MCMAHAN, 1962; EDWARD e MILL, 1986).

Os cupins de madeira seca são caracterizados por apresentarem um desenvolvimento flexível, com uma combinação de mudas progressivas, estacionárias e regressivas, em que

falsos operários (“pseudergates”) totipotentes podem originar todas as outras castas constituintes da colônia (KORB, 2008). Na maioria dos Isoptera, em uma colônia madura, a produção de imagos é anual e a produção da linhagem áptera (operários e soldados) é mais ou menos contínua durante o ano. Como nos demais térmitas, a linhagem reprodutiva dos cupins de madeira seca é constituída por uma série de ínstares ninfais que culminam no aparecimento dos imagos ou reprodutores alados, indivíduos responsáveis pela dispersão da espécie. Além disso, estes cupins têm a capacidade de avaliar a disponibilidade de alimento para a colônia por meio de vibrações acústicas, geradas durante a "mastigação" da madeira, o que os leva a prever a longevidade da colônia e assim ajustar seu potencial reprodutivo ou não, investindo em reprodutores alados que irão colonizar novas fontes alimentares (INTA; EVANS; LAI, 2009; COSTA-LEONARDO e CASARIN, 2013). Colônias de *Cryptotermes* apresentam além dos falsos operários, muitas ninfas (CROSSLAND; TRANIELLO; SCHEFFRAHN, 2004). De acordo com Neoh e Lee (2011), o gênero *Cryptotermes* apresenta um desenvolvimento linear desde larva até alado, porém este desenvolvimento é altamente flexível, sendo influenciado pelas condições ambientais. Em geral, os kalotermitídeos apresentam 4 ínstares larvais e 3 ínstares ninfais durante o período pós-embrionário (LUYKX, 1986; ROISIN e PASTEELS, 1991; MAISTRELLO; OCETE; LÓPEZ, 2010; NEOH e LEE, 2011).

Apesar de sua importância econômica, a biologia reprodutiva dos kalotermitídeos tem sido negligenciada. Dados da literatura estão restritos a uma única descrição do aparelho reprodutor do macho na espécie *Kalotermes flavicollis* (STELLA, 1938; GELMETTI, 1958). Mesmo para outras espécies de cupins, as pesquisas desenvolvidas nesta área são superficiais e algumas vezes os dados disponíveis são conflitantes para uma mesma espécie. Contudo, torna-se evidente que o aparelho reprodutor, tanto do macho quanto da fêmea, sofreu uma evolução dentro dos vários grupos de cupins.

Com o objetivo de suprir essa lacuna a respeito da biologia reprodutiva de uma importante espécie praga, a presente pesquisa visou um estudo comparativo do sistema reprodutor dos machos de *C. brevis* em diferentes fases da vida, dando ênfase para a produção de espermatozoides e morfologia das vesículas seminais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cupins: ninfas e reprodutores de *Cryptotermes brevis* (Walker, 1853) com diferentes idades foram utilizados no presente estudo. Ninfas e imagos machos (reprodutores alados) foram coletados diretamente de colônias provenientes de madeiras infestadas obtidas em revoadas na cidade de Rio Claro, SP. As ninfas utilizadas tinham olho marrom e broto alar conspícuo, provavelmente correspondendo a ninfas de último ínstar. Reis de 6 meses e de 1 ano de idade foram coletados de colônias de laboratório, originadas a partir de um par de reprodutores alados (imagos), de acordo com a metodologia descrita abaixo:

Colônias de laboratório: reprodutores alados coletados em revoadas a partir de madeira infestada foram sexados e cada casal foi colocado em dois pedaços de *Pinus* sp. (10 x 5 x 1 cm), previamente perfurados com prego e desgastados na parte interna, com formão, para criar uma depressão ao redor do furo. Os blocos de madeira foram mantidos unidos por um elástico e este "sanduíche" de madeira foi colocado em um recipiente plástico de 500 mL. Setenta e duas novas colônias foram iniciadas dessa maneira, e mais tarde (após 6 meses e após 1 ano) abertas para coleta dos reis.

2.2. Morfologia e morfometria do aparelho reprodutor: 20 reprodutores alados e 10 reis de 1 ano de *C. brevis* foram dissecados sob estereomicroscópio e o aparelho reprodutor isolado. A seguir, este aparelho reprodutor foi colocado individualmente em lâmina histológica, corado com azul de metileno 1% e feita a montagem total deste órgão. Após a montagem total, estas lâminas foram fotografadas sob estereomicroscópio, com auxílio do software Optikaview. Após este procedimento, foram realizadas medidas do comprimento e largura das vesículas seminais e ductos deferentes, bem como avaliada a área das vesículas seminais e dos testículos.

2.3. Histologia e histoquímica: ninfas, reprodutores alados e reis primários com 6 meses e 1 ano de idade foram fixados em FAA (álcool absoluto, ácido acético glacial, formoldeído 40%,

na proporção 3:1:1) por 24 horas e desidratados em uma bateria de etanol (70, 80, 90 e 95%) tendo, cada banho, duração de 60 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de historesina Leica® de infiltração onde foram mantidas por 7 dias em geladeira. Após essa etapa, os insetos foram incluídos lateralmente em moldes especiais, preenchidos com historesina Leica® mais catalisador, para polimerização em estufa a 37° C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura com navalhas de tungstênio, em micrótomo (Leica RM 2245). As secções histológicas foram submetidas às técnicas descritas abaixo e, posteriormente, examinadas e documentadas em fotomicroscópio (Leica DM500/Leica ICC50), com o auxílio do software LAS v4.0 (Leica Application Suite v4).

- **Coloração com hematoxilina-eosina (HE)** (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983): as secções histológicas foram lavadas em água destilada por 1 minuto e posteriormente coradas com hematoxilina por 10 minutos. Em seguida, estas secções foram colocadas para reagir em água parada por 4 minutos e posteriormente coradas com eosina por 5 minutos e posteriormente lavadas. Após este procedimento, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após secagem, as lâminas foram montadas em bálsamo e fotografadas em fotomicroscópio. Ninfas, reprodutores alados e reis primários de colônias de 6 meses e 1 ano criadas em laboratório tiveram seu aparelho reprodutor submetido a esta técnica..

- **Identificação de polissacarídeos neutros com a coloração de ácido periódico de Schiff (PAS)** (PEARSE, 1960; MELLO e VIDAL, 1980): as secções histológicas foram banhadas em ácido periódico 0,4% por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada por cerca de 1 minuto e, posteriormente, coradas com reativo de Schiff por 60 minutos em local escuro. Após esse procedimento, as secções histológicas foram submetidas a três banhos de água sulfurosa por cerca de 3 minutos cada. Em seguida, foram lavados em água corrente por 20 minutos e as lâminas secas à temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram montadas em bálsamo e documentadas em fotomicroscópio. Reprodutores alados e reis primários de colônias de 6 meses e 1 ano criadas em laboratório tiveram seu aparelho reprodutor submetido a esta técnica.

- **Deteção de proteínas totais (ácidas e básicas) com a coloração de xylidine-Ponceau (XP)** (MELLO e VIDAL, 1980): as secções histológicas foram coradas com xylidine-Ponceau por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram passadas em tampão acetato de sódio (pH = 2,6) por 1 minuto, lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram montadas em bálsamo e posteriormente analisadas e documentadas em fotomicroscópio. Reprodutores alados e reis primários de colônias de 6 meses e 1 ano criadas em laboratório tiveram seu aparelho reprodutor submetido a esta técnica.

2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): os abdômens dos alados machos e dos reis com um ano de idade foram fixados em glutaraldeído 2,5%, pós-fixados em OsO₄ 1% e embebidos em resina epon Araldite. Os materiais foram incluídos em resina Epon pura e polimerizados a 60°C por 72 horas. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): 5 alados machos foram fixados em solução de FAA (álcool absoluto, ácido acético glacial, formoldeído 40%, na proporção 3:1:1) e, posteriormente desidratados em uma série crescente de soluções de acetona (50, 70, 90 e 95%), passando em seguida por 2 banhos de acetona pura (100%), com duração de 5 minutos cada banho. Em seguida, o material foi levado ao ponto crítico, para completa secagem em aparelho Balzers CPD/030. Posteriormente, este material foi colado em suportes de alumínio com fita dupla face na posição desejada. Após a cobertura com ouro em aparelho vaporizador Balzers CPD/050, as amostras foram examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo, HITACHI TM3000.

2.6. Microscopia confocal por varredura a laser: foram utilizados 03 reprodutores alados de *C. brevis* para esta técnica. Foram utilizadas técnicas de imunocitoquímica para marcação de membrana plasmática (vermelho), citoesqueleto (verde) e núcleo (azul).

- *Imunocitoquímica para marcação de membrana plasmática e núcleo:* O aparelho reprodutor destes indivíduos foi dissecado em paraformaldeído 4%, isolado e lavado 2 vezes em solução tampão fosfato-salino (PBS). Em seguida, estes materiais foram incubados em Alexa 633 para marcação de membrana plasmática por 1h, lavados 2 vezes em PBS, 5 minutos cada. Após esta etapa, foram incubados em SYTO 11 por 20 minutos para marcação de núcleo e, novamente, lavados por 2 vezes em PBS, 5 minutos cada. Por fim, os materiais foram montados em lâminas

e observados no microscópio confocal por varredura a laser (Leica TCSSP5-II) e as imagens obtidas com o auxílio do software LAS AF2.3.6 (Leica Application Suite af2.3).

- *Imunocitoquímica para marcação de citoesqueleto e núcleo*: O aparelho reprodutor destes indivíduos foi dissecado em paraformaldeído 4%, isolado e lavado 2 vezes em solução tampão fosfato-salino (PBS). Em seguida, estes materiais foram colocados em Triton X-100 0,1% por 30 minutos e novamente lavados 2 vezes em PBS com albumina por 5 minutos cada. Estes materiais foram incubadas *overnight* em uma mistura de anticorpos monoclonais anti alpha- e beta-tubulina (Sigma-Aldrich) (1:100) em câmara úmida e, em seguida, lavadas em PBS, 2 vezes 5 minutos cada. Posteriormente, foram incubados em Alexa 405 por 1h, lavados 2 vezes em PBS com albumina, 5 minutos cada, incubados e SYTO 11 por 30 minutos e, novamente, lavados 2 vezes em PBS com albumina, 5 minutos cada banho. Por fim, os materiais foram montados em lâminas e observados no microscópio confocal por varredura a laser (Leica TCSSP5-II) e as imagens obtidas com o auxílio do software LAS AF2.3.6 (Leica Application Suite af2.3).

3. RESULTADOS

Após dissecação observou-se que o sistema reprodutor de imagos machos de *Cryptotermes brevis* é constituído por dois testículos, dois canais deferentes com dilatações na região basal, que foram interpretadas como vesículas seminais e um ducto ejaculatório (Figura 1). Adicionalmente, os imagos também possuem um pênis retrátil que só foi observado nas secções histológicas.

Os testículos são formados por conjuntos de lóbulos testiculares. Nos imagos ou reprodutores alados (Figura 1A), não foi possível identificar com precisão cada lóbulo testicular individualmente, pois os testículos estavam em um estágio inicial de desenvolvimento. Já nos reis primários (Figura 1B), esses lóbulos apresentaram-se maiores e individualizados e, nos reis primários com 1 ano de idade de *C. brevis*, foram observados até 7 lóbulos por testículo. Nos reprodutores alados, os lóbulos são bastante delgados e apresentam uma área testicular média de $34,21 \mu\text{m}^2$, enquanto em reis primários, eles se apresentam mais robustos e atingem uma área testicular de $51,45 \mu\text{m}^2$. Do ápice à base de um lóbulo testicular é possível visualizar as células germinativas que estão em estágios progressivos de desenvolvimento, desde espermatogônias até espermatozoides (Figura 2).

Os túbulos seminíferos são mantidos juntos por uma cápsula envolvente de tecido conjuntivo, a bainha peritoneal (Figuras 2 e 3). Em cada cisto todas as células estão no mesmo estágio de desenvolvimento. Na região apical dos lóbulos testiculares são observadas células com núcleos arredondados, as espermatogônias, e na região basal, células cuja cromatina apresentou arranjos típicos de divisão meiótica, que caracterizam os espermatócitos, além de espermátides e espermatozoides (Figura 2). A forma do núcleo nos diferentes estágios pode ser observada com detalhe por imunofluorescência em azul (Figura 3). Com esta marcação, a bainha peritoneal que envolve os lóbulos testiculares aparece corada em vermelho, delimitando

a área de cada lóbulo (Figura 3). Células sexuais degenerativas, com núcleos fortemente picnóticos também estão presentes na luz testicular, de reprodutores alados e reis primários, por entre os espermatozoides, e elas podem ser observadas individualizadas ou agrupadas (Figura 2).

Os dutos deferentes são formados por uma camada interna de tecido epitelial simples escamoso, circundada por uma camada delgada de musculatura, em todos os machos de *C. brevis*. Em secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina podem ser observados espermatozoides na luz dos dutos deferentes (Figura 4).

A vesícula seminal dos machos estudados não variou quanto à organização, sendo formada por uma parede constituída por um epitélio interno simples envolvido por uma camada delgada de musculatura circular. Todos os indivíduos analisados apresentaram vesículas seminais constituídas por um epitélio colunar com núcleos ovais característicos. O diâmetro da vesícula seminal aumentou consideravelmente do ínstar ninfal em comparação com aquele de um rei primário funcional (Figura 5).

O lúmen das vesículas seminais de ninfas de último ínstar não contém secreção nem espermatozoides, apesar destes últimos terem sido encontrados nos testículos e dutos deferentes (Figura 5A). Contudo, foram observados espermatozoides nas vesículas seminais de imagos e reprodutores funcionais, bem como uma secreção característica no lúmen destas estruturas (Figuras 5B-D). As células das vesículas seminais dos imagos machos (reprodutores alados) são polarizadas e na superfície voltada para a luz existem microvilosidades que são observadas frequentemente em contato com os espermatozoides (Figura 6). Estas células epiteliais da vesícula apresentam núcleos característicos de células com alta atividade secretora, pois o núcleo apresenta pouca heterocromatina, membrana nuclear com uma superfície irregular e nucléolos conspícuos (Figuras 6A e 6B). Em *C. brevis* os espermatozoides são alongados, não flagelados e apresentam forma de cabeça de seta arredondada. Estes espermatozoides medem em média 9 μm de comprimento, variando entre 7 e 12 μm , e têm em média 1 μm de largura (Figura 6C). Espermatozoides foram observados em todos os indivíduos estudados tanto nos testículos como nas vesículas seminais, com exceção das ninfas, nas quais foram observados espermatozoides apenas nos testículos e dutos deferentes, mas não nas vesículas seminais.

A histologia do canal ejaculatório em *C. brevis* mostrou uma camada simples de células epiteliais envolta externamente por uma camada muscular. Além disso, também foi observada

uma fina camada de cutícula recobrando o epitélio. Este referido canal é formado pela junção dos dois dutos deferentes em um ducto mediano e sua parte terminal se apresenta como um pênis membranoso. O pênis dessa espécie é um órgão retrátil, de tamanho reduzido e formado pela porção final do canal ejaculatório. Ele foi observado em todos os reprodutores estudados e até em ninfas de último ínstar, nas quais mostra um tamanho menor em relação aqueles dos imagos e reis primários (Figura 7). Não existe uma diferenciação externa do aparelho reprodutor de *C. brevis*. Exteriormente, é possível observar um poro genital na região mediana do 9º esternito, localizado entre o 9º e o 10º esternitos, por onde este pênis é externado por ocasião da cópula (Figuras 6D-E). Contudo, os machos são reconhecidos por não apresentarem aumento do 7º esternito e apresentarem estilos.

Os testes histoquímicos aplicados nas secções histológicas das vesículas seminais de reprodutores alados e reis primários (Figura 8 e Tabela 1) evidenciaram o papel secretor destas estruturas nestes reprodutores. Após o teste histoquímico do PAS, foi possível observar uma secreção heterogênea no lúmen das vesículas seminais constituída por polissacarídeos neutros, e esta secreção já pode ser observada em reis primários de 6 meses de idade (Figuras 8A, 8B e tabela 1). O teste histoquímico de xylydine-Ponceau evidenciou que em reis de *C. brevis*, a secreção presente no lúmen das vesículas também tem caráter proteico e um aspecto floculado (Figura 8D). Em imagos machos (reprodutores alados) esta secreção proteica não está presente no lúmen das vesículas seminais, que apresentam somente espermatozoides e células sexuais degenerativas dos testículos, as quais apresentaram núcleos picnóticos e citoplasma fracamente corado (Figura 8C). Estas células degenerativas estão presentes nos imagos e reis primários, embora nestes últimos a grande quantidade de secreção, muitas vezes presente nas vesículas seminais, atrapalhe a visualização das mesmas. Adicionalmente, também foi constatada a ocorrência diferencial de espermatozoides no lúmen vesicular dos diversos indivíduos analisados.

Tabela 1. Resultados dos testes histoquímicos em vesículas seminais de machos de *C. brevis*.

Coloração	Imago	Rei primário	Rei primário
		6 meses	1 ano
PAS*	-	+	+
XP**	-	+	+

*PAS, ácido periódico de Shiff; **XP, xylydine-Ponceau; +, corados; -, não corados.

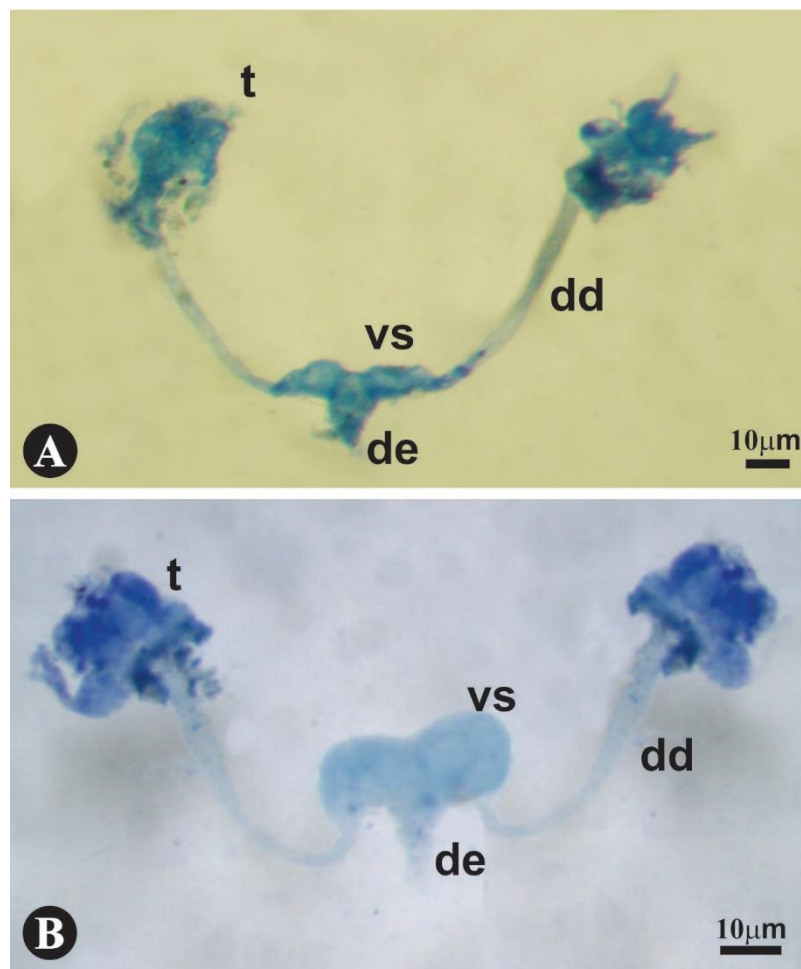


Figura 1. Montagem total do sistema reprodutor do macho de *Cryptotermes brevis*. Coloração: azul de metileno. **A.** Imago. **B.** Rei de 1 ano de idade. **dd**, duto deferente; **de**, duto ejaculatório; **t**, testículo; **vs**, vesícula seminal.

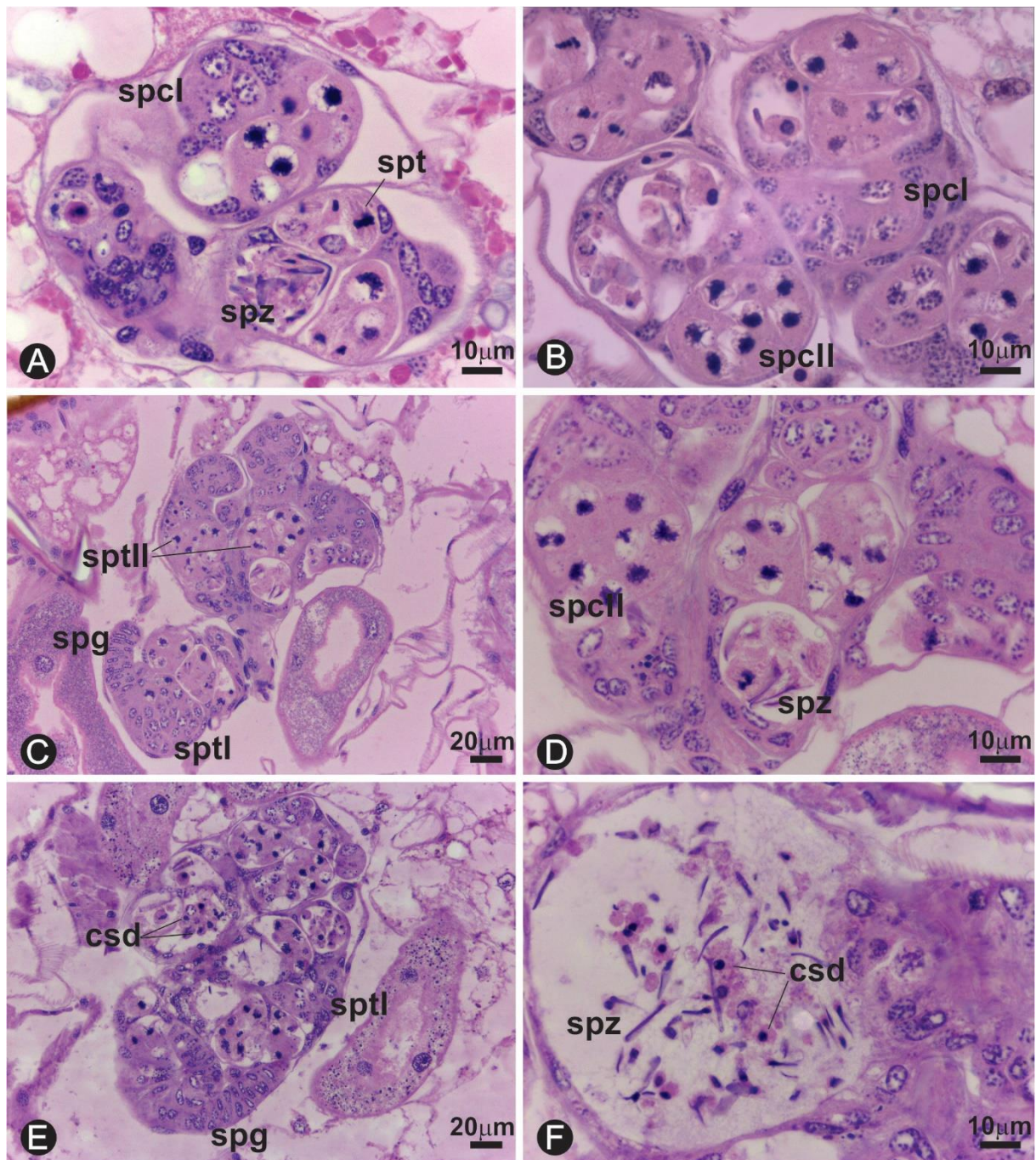


Figura 2. Secção histológica dos lóbulos testiculares de machos de *Cryptotermes brevis*, evidenciando as diferentes fases da espermatogênese. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Detalhe dos túbulos seminíferos de uma ninfa de último instar com espermatídes (**spt**) e espermatozoides (**spz**). **B.** Detalhe dos lóbulos testiculares de um reproduztor alado com espermatócitos I (**spcl**) e espermatócitos II (**spcII**). **C.** Vista geral dos túbulos seminíferos com espermatogônias (**spg**) em reis primários de 6 meses de idade. **D.** Detalhe dos cistos testiculares contendo células sexuais de mesmo estágio de desenvolvimento em reis primários de 6 meses de idade. **E.** Túbulos seminíferos em rei primário com 1 ano de idade. **F.** Detalhe de um cisto contendo muitos espermatozoides (**spz**) e células sexuais degenerativas (**csd**) em rei primário com 1 ano de idade.

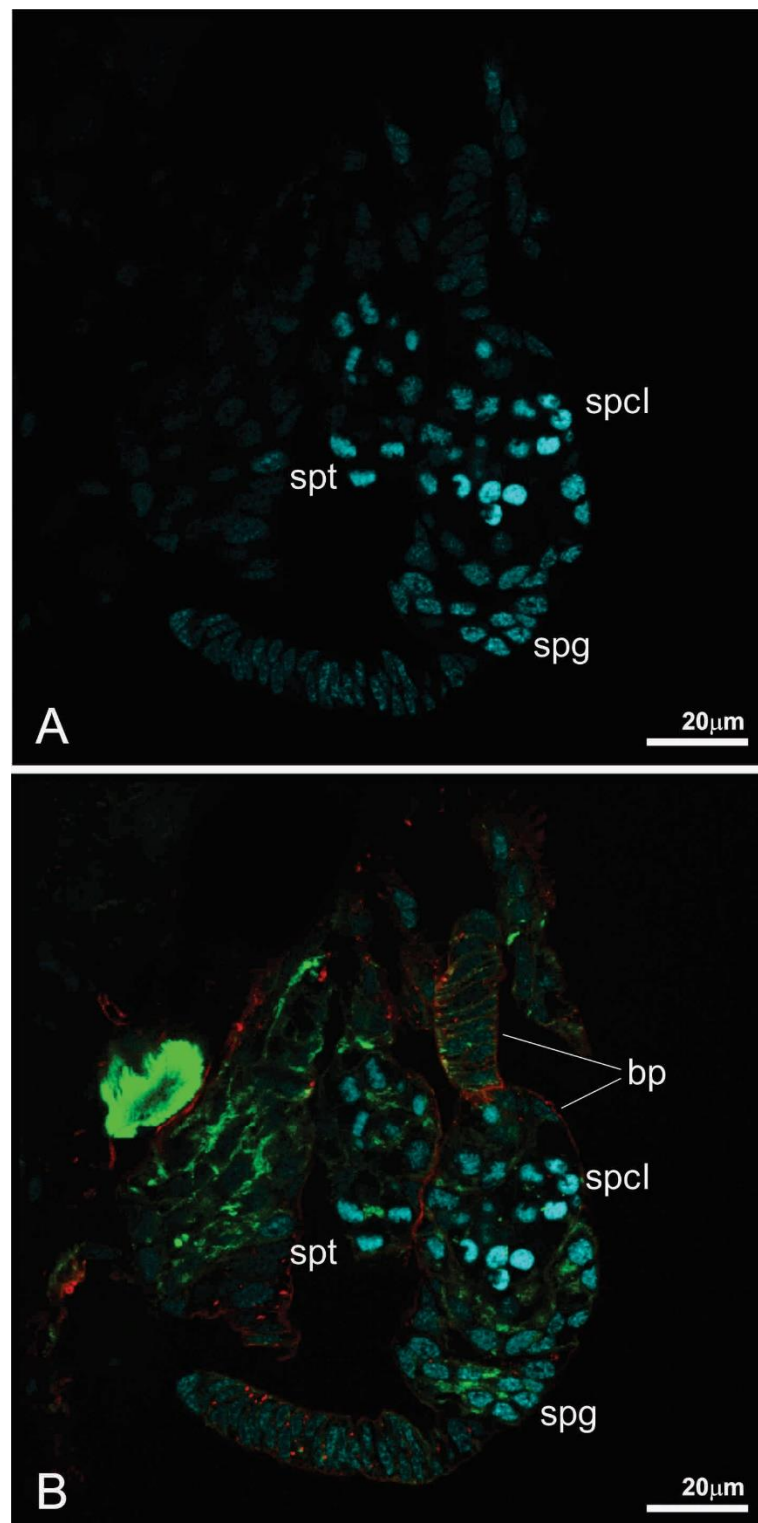


Figura 3. Túbulos seminíferos de imago macho de *Cryptotermes brevis* com marcação por imunocitoquímica do núcleo (azul), membrana plasmática (vermelho) e citoesqueleto (verde). **A.** Notar as diferentes fases da espermatogênese, caracterizada pela forma dos núcleos. **B.** Observar a marcação da bainha peritoneal (**bp**) em vermelho, que delimita os cistos com as células sexuais. **spcl**, espermatócito I; **spg**, espermatogônia; **spt**, espermátide.

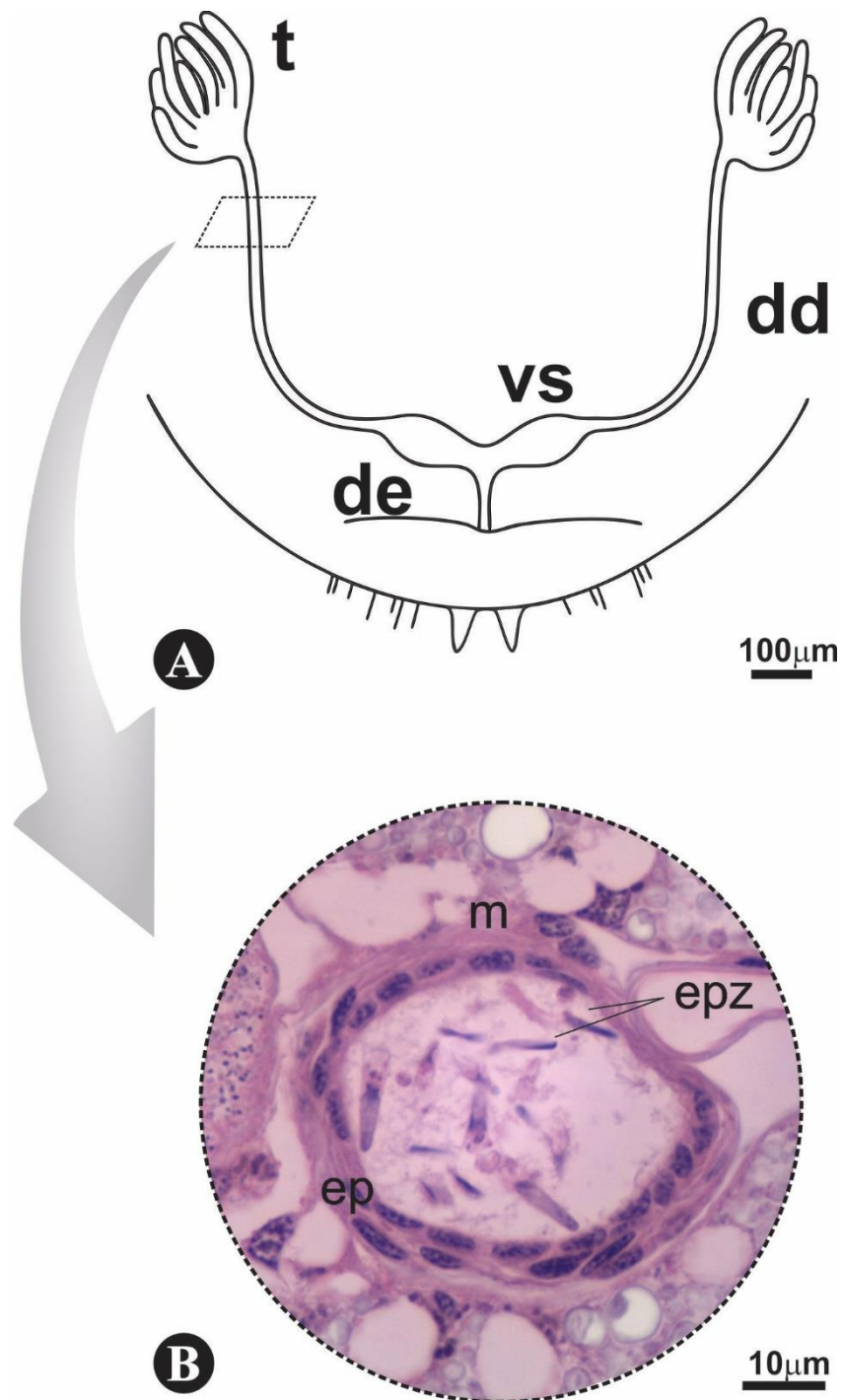


Figura 4. **A.** Esquema do sistema reprodutor de um imago macho de *Cryptotermes brevis*. **B.** Detalhe do ducto deferente com vários espermatozoides (**epz**). Coloração: hematoxilina-eosina. **dd**, ducto deferente; **de**, ducto ejaculatório; **ep**, epitélio do ducto; **m**, musculatura; **t**, testículo; **vs**, vesícula seminal.

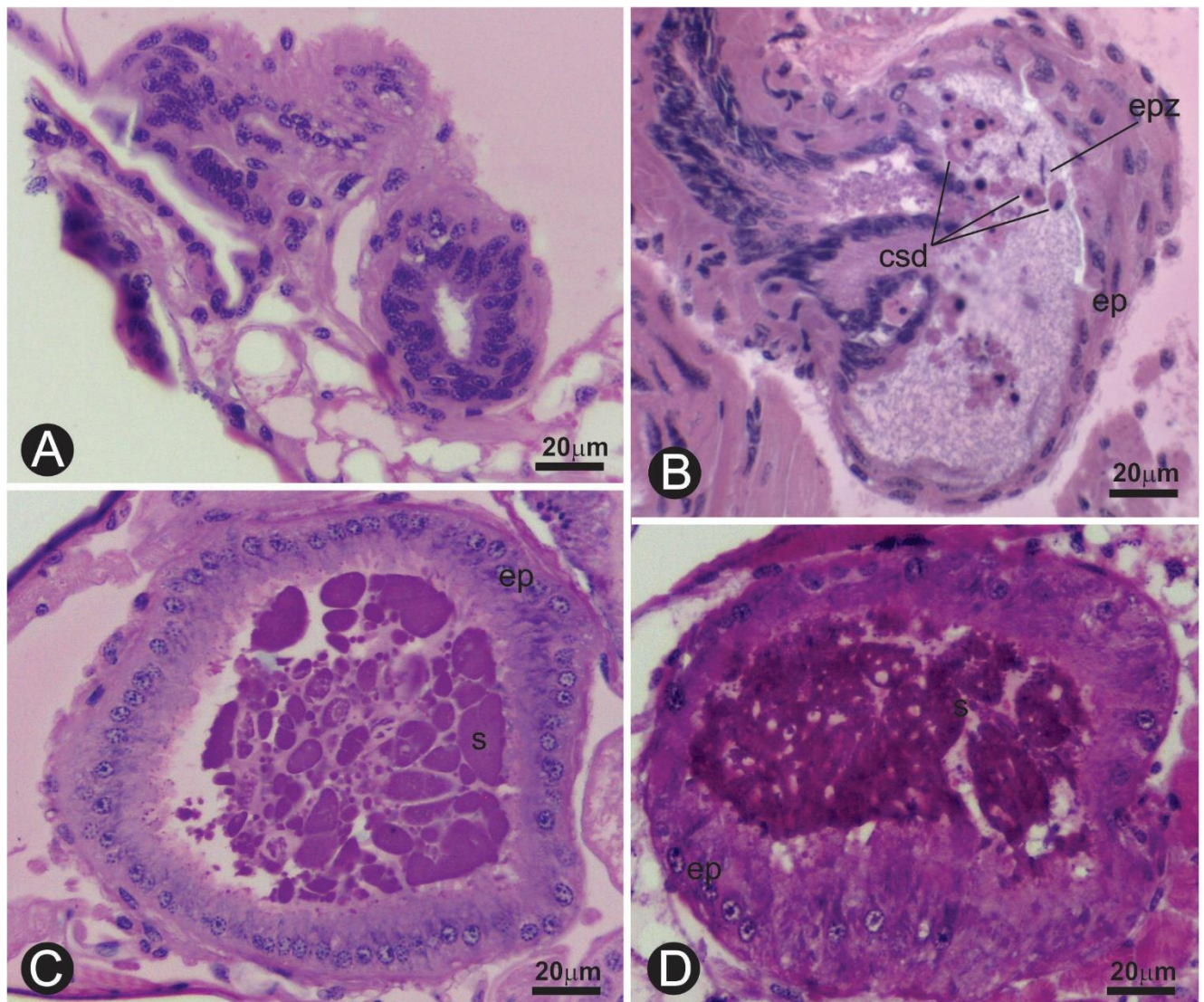


Figura 5. Vesículas seminais de machos de *Cryptotermes brevis*. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Ninfa de último ínstar. **B.** Imago macho. Observar a presença de espermatozoides (**epz**) e de células sexuais degenerativas do testículo (**csd**). **C., D.** Reis com 6 meses e 1 ano de idade, respectivamente. Notar o lúmen das vesículas repleto de secreção (**s**) e o aumento do epitélio vesicular (**ep**).

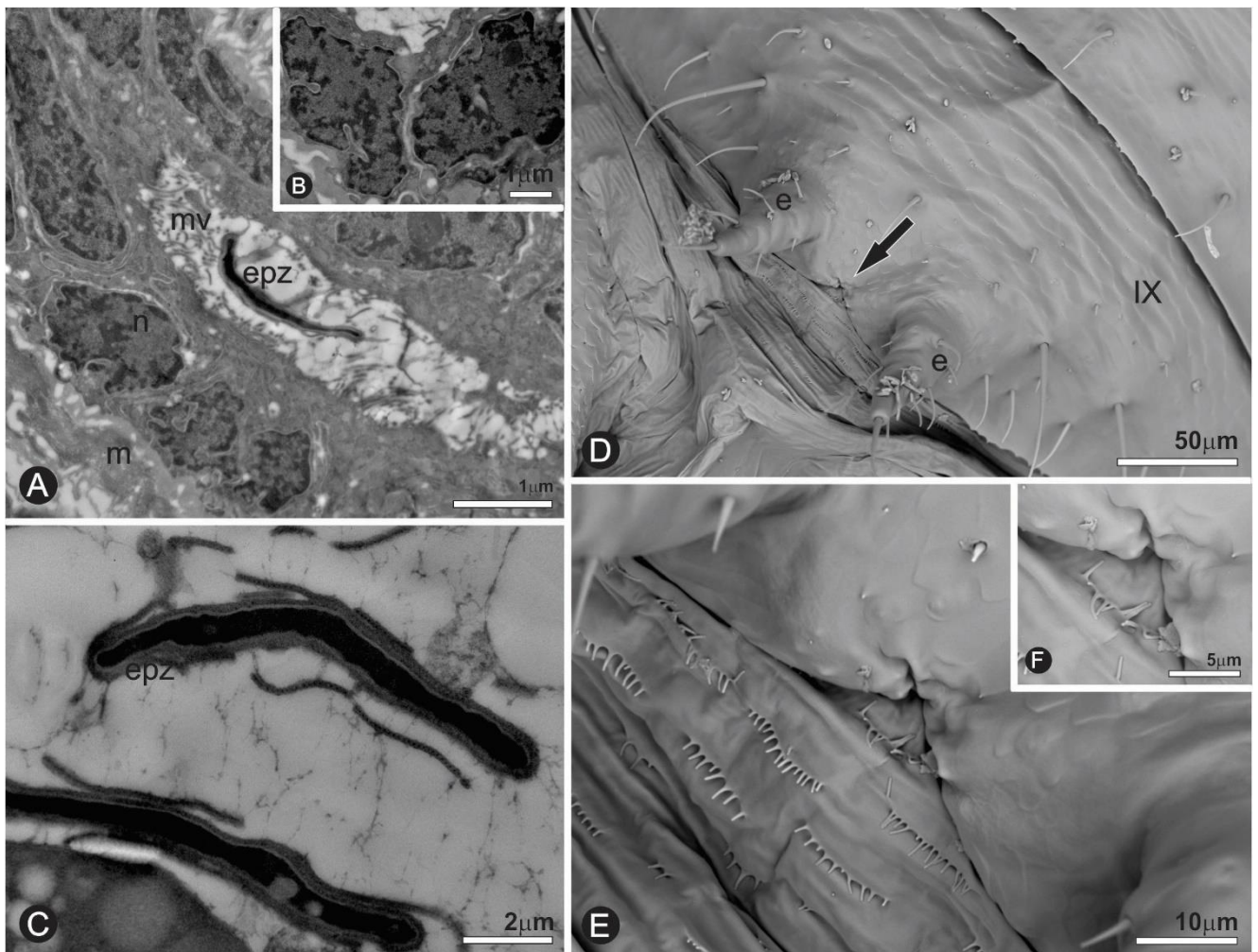


Figura 6. Ultraestrutura da vesícula seminal de um imago macho de *Cryptotermes brevis*, **A.** Epitélio da vesícula seminal com microvilosidades (**mv**) na porção apical, voltada para a luz do órgão. **B.** Detalhe dos núcleos das células epiteliais com superfícies irregulares. **C.** Detalhe de secções de espermatozoides (**epz**) na luz da vesícula seminal. **D.** Fotomicrografia eletrônica de varredura da região ventral do abdômen posterior de um alado macho. A seta indica o poro genital. **E.** Detalhe da região mediana do 9º esternito (IX) do abdômen de um alado macho. **F.** Detalhe do poro genital de um alado macho. **e**, estilo; **m**, musculatura; **n**, núcleo.

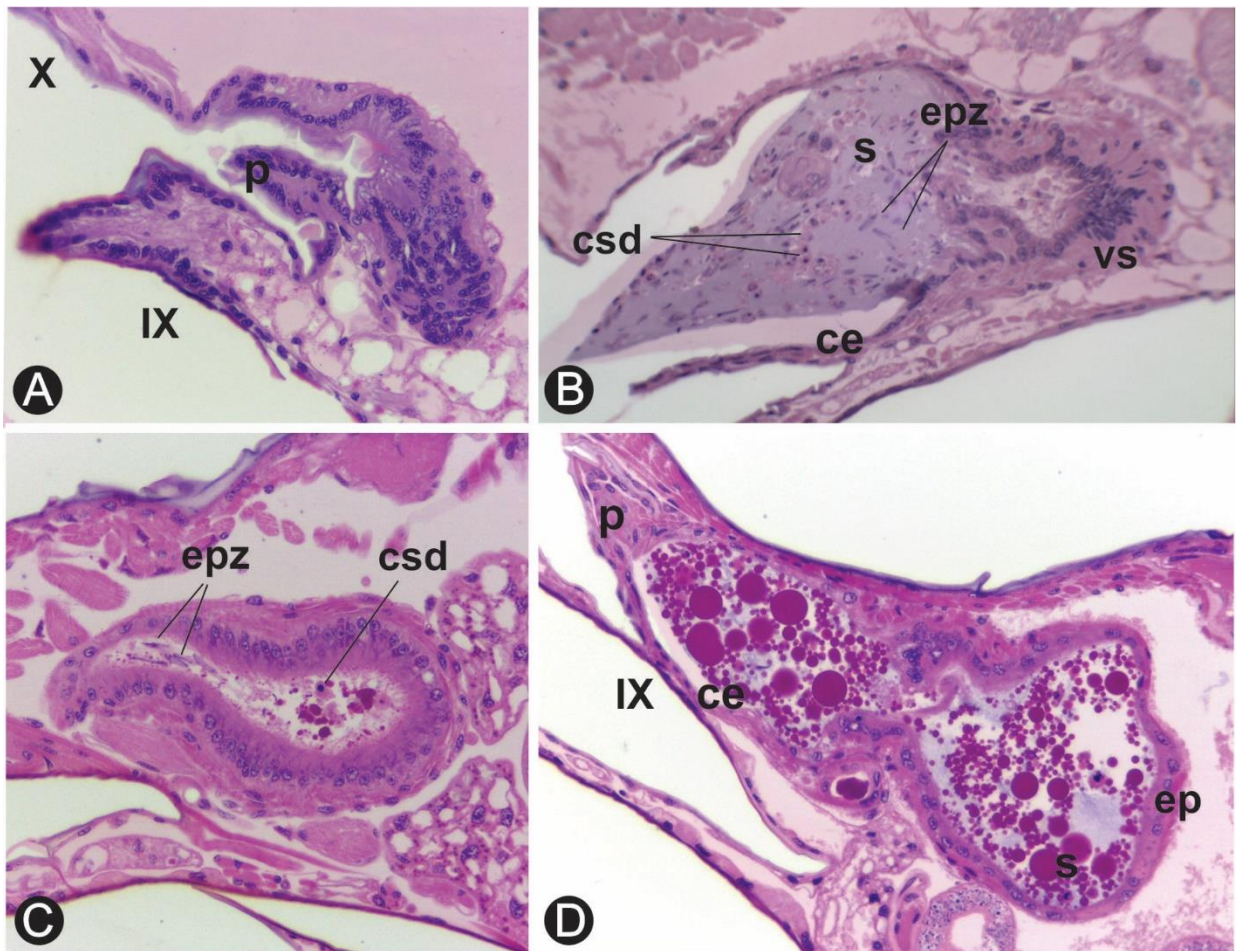


Figura 7. Secção histológica longitudinal do canal ejaculatório em machos de *Cryptotermes brevis*. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Detalhe da vesícula seminal e da formação do pênis retrátil (**p**) entre o nono (**IX**) e o décimo (**X**) esternito em ninfas de último ínstar. **B.** Detalhe da vesícula seminal (**vs**) e do canal ejaculatório (**ce**) de um reprodutor imago macho. Notar na luz vesicular secreção (**s**) entremeada com espermatozoides (**spz**) e células sexuais degenerativas do testículo (**csd**). **C.** Rei primário de 6 meses de idade. Espermatozoides e células sexuais degenerativas do testículo também estão presentes na luz vesicular. **D.** Rei primário de 1 ano de idade. Notar que a secreção globular apresenta grande variação em tamanho. **ep**, epitélio vesicular.

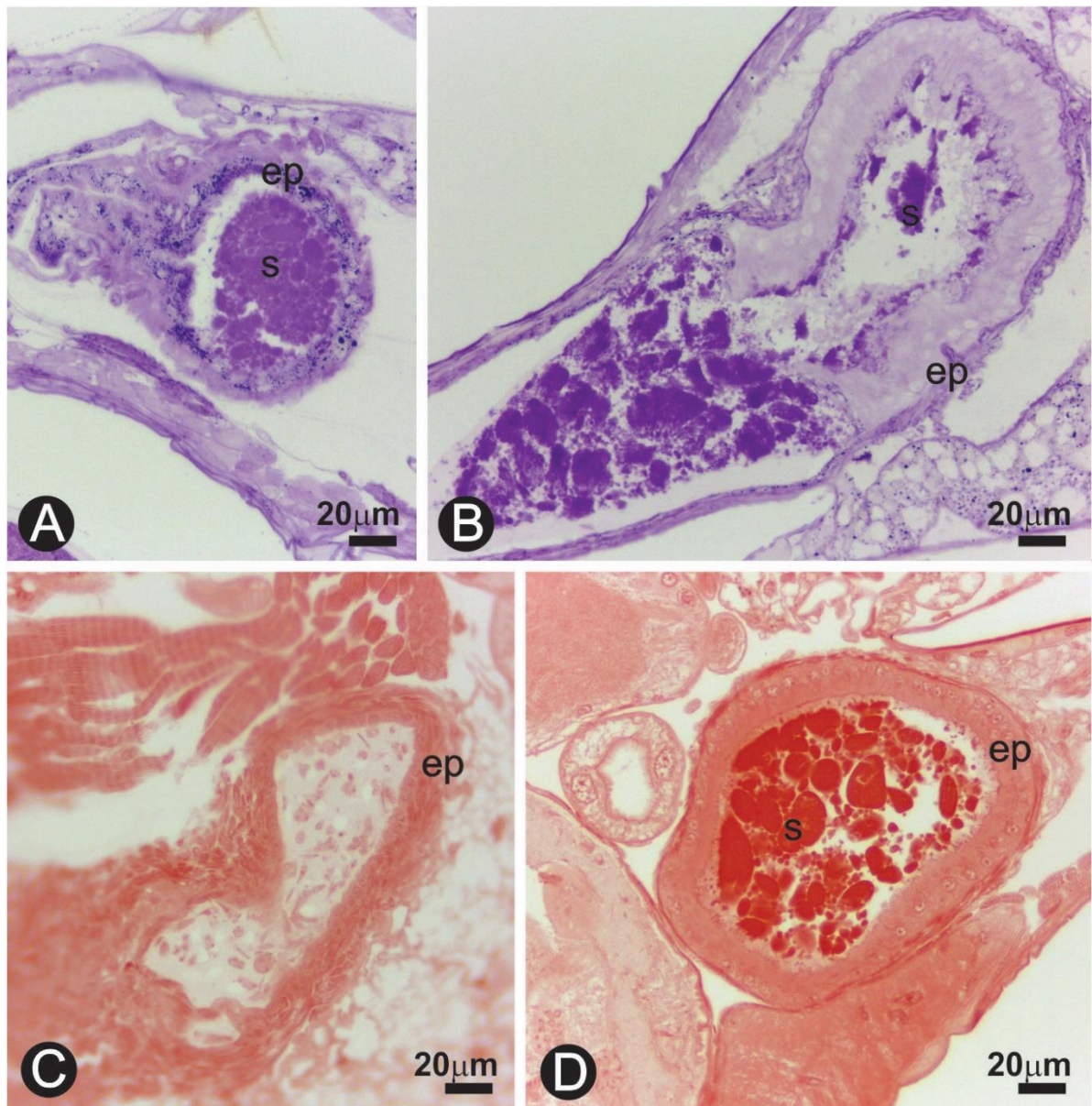


Figura 8. Vesículas seminais dos reprodutores machos de *Cryptotermes brevis*, submetidas a técnicas histoquímicas. **A.** Rei primário com 6 meses de idade. **B.** Rei com 1 ano de idade. Coloração: ácido periódico de Schiff (PAS). **C.** Imago macho. **D.** Rei primário com 6 meses de idade. Coloração: xylidine-Ponceau. **ep**, epitélio vesicular, **s**, secreção.

4. DISCUSSÃO

A morfologia do sistema reprodutor de *Cryptotermes brevis* é similar àquela descrita para o cupim *Reticulitermes hesperus*, em que os testículos do reprodutor primário macho são constituídos por vários lóbulos testiculares. Cada lóbulo tem uma área terminal em forma de dedo, com células em divisão e uma área basal, contendo espermatozoides maduros (WEESNER, 1969).

Em *C. brevis*, os folículos testiculares e a área terminal de cada lóbulo testicular aumentam em comprimento a medida que as ninfas macho de último ínstar se desenvolvem para imagos e estes, em reis primários. O número de lóbulos testiculares é variável entre as espécies e nos cupins inferiores geralmente ocorrem de 7 a 10 lóbulos por testículo (WEESNER, 1969), sendo de 8 a 10 em *Archotermopsis* (IMMS, 1919), 9 em *Kalotermes flavicollis* (STELLA, 1938), 8 ou 9 em *Reticulitermes lucifugus* (JUCCI, 1924; STELLA, 1938), e de 7 a 9 em *R. hesperus* (WESNEER, 1956). Nos Termitidae ocorre um aumento no número de elementos testiculares. Cada lóbulo testicular é uma estrutura composta por 6 túbulos espermáticos, sendo que o lóbulo se abre numa pequena câmara acessória, o vaso eferente, e, subsequentemente, no vaso deferente (GEYER, 1951; WEESNER, 1955). Para cada testículo, já foram descritos em Isoptera até 50 túbulos espermáticos sendo que existe uma tendência das partes finais destes túbulos se apresentarem fortemente recurvadas (BONNEVILLE, 1936; GEYER, 1951; WEESNER, 1955). Como relatado no presente trabalho, foram observados 7 lóbulos testiculares em reis primários de 1 ano de idade, além de uma curvatura característica da porção final destes lóbulos.

Espermatozoides foram observados em todos os reprodutores e até nas ninfas de *C. brevis* estudadas, sugerindo que os testículos iniciam a maturação dos espermatozoides precocemente, ou seja, no estágio ninfal. De acordo com Dean e Gold (2004), o início da

maturação dos espermatozoides é anterior àquele em que os ovários das fêmeas começam a maturar os ovócitos, uma vez que não existe registro de ovócitos maduros em ninfas. Além disso, uma quantidade maior de espermatozoides foi observada nas secções histológicas de testículos de reis mais velhos, sugerindo que estes produzem espermatozoides a uma taxa muito mais rápida do que ninfas e reprodutores alados. Adicionalmente, ao contrário do que ocorre na maioria dos himenópteros, cujos testículos se degeneram após a cópula (BOOMSMA; BAER; HEINZE, 2005), em *C. brevis* e nos cupins em geral, estes órgãos tendem a aumentar de tamanho de acordo com a faixa etária do rei, tamanho da colônia e dos ciclos reprodutivos do casal real.

Dados da literatura mostram que a maioria dos espermatozoides de Isoptera é aflagelada, mas existem variações morfológicas entre as diferentes famílias (JAMIESON, 1987). Grassi e Sandias (1893) verificaram que o espermatozoide de *K. flavicollis* apresentava a forma de cone e não era flagelado. Grassé (1949) relatou que os espermatozoides dos Isoptera são aflagelados e imóveis, sendo a única exceção a espécie *Mastotermes darwiniensis* que possui espermatozoides flagelados (BACCETTI e DALLAI, 1978; DALLAI, 2014). Os espermatozoides de *C. brevis* são idênticos aos descritos para *K. flavicollis* (VIEAU, 1973; BACCETTI e DALLAI, 1974), evidenciando uma uniformidade dentro da família. No entanto, eles são diferentes dos espermatozoides multflagelados dos Mastotermitidae (BACCETTI e DALLAI, 1978), daqueles em forma de haste de Archotermopsidae (BACCETTI; DALLAI; GALLAINI, 1981) e dos esféricos dos Termitidae (GRASSÉ, 1982) e Rhinotermitidae (BACCETTI, 1979; JAMIESON, 1987; COSTA-LEONARDO, 2002).

Os dutos deferentes parecem exercer a função de condutores de espermatozoides até o ducto ejaculatório. Espermatozoides foram observados no lúmen dos dutos deferentes de todos os reprodutores estudados, assim como nas ninfas. Os dutos deferentes dos machos de *C. brevis* apresentaram uma camada delgada de musculatura ao seu redor, semelhante àquela observada por Grimm (1985) em espécies de efemeróptera da família Leptophlebiidae. De acordo com Brito, Salles e Dolder (2012), esta musculatura é importante para movimentar os espermatozoides destes insetos, uma vez que eles são aflagelados, assim como aqueles presentes nos machos de *C. brevis*. Portanto, a parede muscular deve atuar na condução dos espermatozoides destes insetos até as vesículas seminais.

A vesícula seminal mostrou o mesmo padrão histológico nas diferentes fases da vida dos reprodutores machos de *C. brevis*, que foi caracterizada por um epitélio espesso envolto por musculatura. Na vespa *Polistes vesicolor*, a porção mediana do ducto deferente é alargada e diferenciada em uma região especializada para o armazenamento de esperma e, por isso, esta região foi considerada como correspondente à vesícula seminal (ARAÚJO; MOREIRA; LINO-NETO, 2010). A vesícula seminal dos machos de *C. brevis* também se mostrou como uma estrutura diferenciada, formada por um alargamento do ducto deferente, que aumenta muito nos reis funcionais, porém apresenta características morfológicas distintas daquelas encontradas no referido ducto. Nesta espécie de cupim, a região considerada como vesícula seminal também parece contribuir para a estocagem dos espermatozoides, além de ser responsável por uma secreção com aspectos e funções distintas nas diferentes fases da vida destes machos, sugerindo uma participação ativa na manutenção da vida útil e nutrição dos espermatozoides.

No lúmen vesicular também foram observadas células sexuais degenerativas, provenientes dos testículos. Jucci (1924) sugeriu que estas células atuam como células nutridoras de espermatozoides, auxiliando na manutenção dos mesmo durante o armazenamento na vesícula. Contudo, esta hipótese não parece plausível, uma vez que elas apresentam características degenerativas, tais como núcleos picnóticos e citoplasmas fracamente corados. O número e a ocorrência das células sexuais degenerativas variam entre as vesículas seminais dos térmitas e os pesquisadores concordam que estas células tem origem testicular. Material semelhante foi encontrado nas vesículas seminais de machos de gafanhotos e foi interpretado por Odhiambo (1969) como material em processo de eliminação e não nutrição, fato compatível com os resultados encontrados no presente estudo.

Os resultados mostram que as vesículas seminais dos imagos analisados não produzem secreção, porém, as vesículas seminais dos reis funcionais produzem uma secreção que é constituída tanto por proteínas quanto por polissacarídeos, evidenciando que esta estrutura tem importante função na manutenção e nutrição dos espermatozoides ou que estas proteínas ligadas a carboidratos façam parte do fluido seminal. As proteínas do fluido seminal modificam a fisiologia e o comportamento das fêmeas em insetos (POIANI, 2006; SPIEGEL et al., 2013) As secreções produzidas pelas vesículas seminais variam sua composição química e função entre os diferentes grupos de insetos. Em abelhas, as secreções consistem basicamente de proteínas, mas também podem incluir açúcares e lipídios. Essas substâncias são adicionadas aos espermatozoides e afetam todas as fases da biologia reprodutiva das fêmeas acasaladas,

incluindo proteção, estocagem e ativação dos espermatozoides, competição entre espermatozoides, inibição da receptividade e aumento da fecundidade (BLUM et al., 1962; BLUM et al., 1967; BAER et al., 2005; BOOMSMA; BAER; HEINZE, 2005).

A habilidade que os reis de cupins têm de prover grande quantidade de esperma viável para a rainha continuamente por várias décadas é tão importante quanto a capacidade de algumas rainhas de himenópteros sociais de armazenarem o esperma do seu par falecido por uma quantia de tempo semelhante (PAMILO, 1991; KELLER e GENOUD, 1997). Esta capacidade parece estar ligada de um modo geral às vesículas seminais, que são as estruturas que auxiliam no armazenamento de esperma e espermatozoides. A grande fertilidade dos reis é ilustrada em *Reticulitermes speratus*, no qual um único rei primário é capaz de copular repetidamente com centenas de rainhas partenogenéticas, e prover esperma para todas estas rainhas de substituição (MATSUURA, et al., 2009). Em *C. brevis*, a grande quantidade de secreção observada na vesícula seminal dos reis primários, bem como a presença de muitos espermatozoides nestes órgãos sugere uma grande capacidade reprodutiva. No entanto, o crescimento lento dessas colônias se deve provavelmente à biologia da espécie, cujas fêmeas não apresentam uma fisogastría avantajada. Este fato limita a fecundidade da colônia, que por sua vez, também tem um crescimento limitado pelo espaço e quantidade de alimento disponível, já que estes cupins têm ninho no próprio alimento que é finito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, V.A.; ZAMA, U.; NEVES, C.A.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Braz J Morphol Sci.** n.22, p.193-201, 2005.

ARAÚJO, V.A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the Male Reproductive System of the Social Wasp, *Polistes Versicolor Versicolor*, with Phylogenetic Implications. **Journal of Insect Sciences.** v.10, n.71, p.1-10, 2010.

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

BACCETTI, B. 1979. Ultrastructure of sperm and its bearing on arthropod phylogeny. In: Gupta, A.P. (Ed.). **Arthropod Phylogeny.** pp.609-644. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

BACCETTI, B. DALLAI, R. The spermatozoon of Arthropoda XXVI: the spermatozoon of Isoptera, Embioptera and Dermaptera. **Journal de Microscopie.** n.21, p.159-172, 1974.

BACCETTI B., DALLAI R. The spermatozoon of Arthropoda XXIX. The multiflagelated spermatozoon in the termite *Mastotermes darwiniensis*. **Journal of Cell Biology,** n.76, p.569-576, 1978.

BACCETTI, B.; DALLAI, R.; ROSATI, F.; GIUSTI, F.; BERNINI, F.; SELMI, G. The spermatozoon of Arthropoda. XXVI. The spermatozoon of Isoptera, Embioptera and Dermaptera. **Journal of Microscopie.** n.21, p.159-172, 1974.

BACCETTI, B.; DALLAI, R.; GALLAINI, G. The spermatozoon of Arthropoda: *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny International. **Journal of Invertebrate Reproduction.** p.87-99, 1981.

BAER, B.; MAILE, R.; SCHMID-HEMPEL, P.; MORGAN, D.E.; JONES, G.R. Chemistry of a mating plug in bumblebees. **Journal of Chemical Ecology.** n.26, p.1869-1875.

BLUM, M.S.; GLOWSKA, Z.; TABER, S. Chemistry of the drone honey bee reproductive system. II. Carbohydrates in the reproductive organs and semen. *Annals of the Entomological Society of America*. n.55, p.135-139, 1962.

BLUM, M.S.; BUNGARNER, J.E.; TABER, S. Composition and possible significance of fatty acids in lipid classes in honey bee semen. *Journal of Insect Physiology*. n.13, 1301-1308, 1967.

BONNEVILLE, P. Recherches sur l'anatomie microscopique des termites. *Arvernia Biologica*. n.15, p.1-127, 1936.

BOOMSMA, J.J.; BAER, B.; HEINZE, J. The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 395-420, 2005.

BRITO, P.; SALLES, F.F.; DOLDER, H. Morphology of Male Reproductive Systems in Ephemeroptera: Intrinsic Musculature. *Neotropical Entomology* (Impresso), v.41, p.306-310, 2012.

BUGNION, E.; POPOFF, N. Anatomie de la reine et du roi-termite (*Termes redemanni, obscuriceps ethorni*). *Mém. Soc. Zool. Fr.* n.25, p.210-231, 1912.

COSTA-LEONARDO, A.M.; CASARIN, F.E. Novidades sobre os nossos velhos conhecidos "os cupins de madeira seca". *Vetores & Pragas*. XVII, n.34, 2013.

COSTA-LEONARDO, A.M. **Cupins-praga: morfologia, biologia e controle**. Rio Claro, Ana Maria Costa-Leonardo (Ed.), 128p., 2002.

CROSLAND, M.W.J.; TRANIELLO, J.F.A.; SCHEFFRAHN, R.H. Social organization in the drywood termite, *Cryptotermes cavifrons*: is there polyethism among instars? *Ethology Ecology & Evolution*. v.16, n.2, p.117-132, 2004.

DALLAI, R. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Structure & Development*. n.43, p.257-290, 2014.

DEAN, S.; GOLD, R. Sex ratios and development of the reproductive system in castes of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Annals of the Entomological Society of America*. n.97, p.147-152, 2004.

EDWARDS, R.; MILLS, A. E. **Termites in buildings: Their biology and control**. East Grinstead: Rentakil Limited. 1986, 261p.

EGGLETON, P.; TAYASU, I. Feeding groups, lifetypes and the global ecology of termites. **Ecological Research**. n.16, p.941-960, 2001.

ENGEL, M.S., GRIMALDI, D.A., AND KRISHNA, K. 2009. Termites (Isoptera): Their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, 3650: 1–27, 2009.

ENGEL, M.S.; GRIMALDI, D.A.; AND KRISHNA, K. 2009. Termites (Isoptera): Their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, 3650: 1–27, 2009.

GELMETTI, B.L. Sul contenuto delle vescicole seminali di *Kaloterme flavicollis*. **Symposium on Genetics and Biology of Italy**, n.6, p.48-54, 1958.

GEYER, J.W.C. The reproductive organs of certain termites, with notes on the hermaphrodites of neoterme. *Entomology Memoirs*. v.9, n.2, p.233-325, 1951.

GRASSÉ, P.P. Ordre des Isoptères ou termites. In: Grassé, P.P. (Ed.). **Traité de zoologie**. Masson, Paris, v.9, p.408-544, 1949.

GRASSÉ, P.P.; BONNEVILLE, P. Les sexués inutilisés ou achrestogonimes des Protermitides. **Bull. Biol. Fr. Belg**. n.69, p. 474-491, 1935.

GRASSÉ, P.P. **Termitologia**, Tome I. Masson, Paris, 1982

GRASSI, B.; SANDIAS, A. Costituzione e sviluppo della società dei Termitidi. Appendice I. Protozoa parassiti dei termitidi. **Atti Acad. Gioenia Sci. Nat. Catania**. n.7, p.45-59, 1893.

GRIMM, R. Vergleichend-anatomische Untersuchung der abdominalen Muskulatur und der Gonoducte männlicher Ephemeroptera-Images (Insecta). **Stuttgarter Beitr. Naturk. A**. n.59, p.1-59, 1985.

IMMS, A. D. On the structure and biology of *Archotermopsis* together with description of new species of intestinal Protozoa and general observations on the Isoptera. **Phil. Trans. Roy. Soc. London**, 209, p.75-108, 1919.

- INTA, R.; EVANS, T.A.; LAI, J.C.S. Effect of vibratory soldier alarm signals on the foraging behavior of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economical Entomology**. n.102, p.121-26, 2009.
- INWARD, D.J.G.; VOGLER, A.P.; EGGLETON, P. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. n.44, p.953-967, 2007.
- JAMIESON, B.G.M. 1987. **The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. Cambridge University Press, Cambridge, 320pp.
- JAMIESON, B.G.M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B.A. 1999. **Insects, Their Spermatozoa and Phylogeny**. Enfield, NH: Science Publishers, Inc.
- JUCCI, C. Sulla differenziazione delle caste nella società dei Termitidi. I. Neotenici (Reali veri e neotenici - l'escrezione nei reali neotenici - la fisiologia e la biologia). **Atti. Accad. nazl. Lincei, R. C. Cl. Sci. fis., mat., nat.** n.14, p.267-500, 1924.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.
- KELLER, L.; GENOUD, M. Extraordinary lifespan in ants: a test of evolutionary theories of ageing. **Nature**. n.389, p.958-960, 1997.
- KORB, J. 2008. **The ecology of social evolution in termites**. In: Ecology of Social Evolution, Korb, J.; Heinze, J (Eds). Springer Berlin Heidelberg. pp.151-174
- KRISHNA, K.; GRIMALDI, D.A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M.S. 2013. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 377, pp.2704.
- LUYKX, P. Termite colony dynamics as revealed by the sex- and caste-ratios of whole colonies of *Incisitermes schwarzi* banks (Isoptera: Kalotermitidae). **Insectes Sociaux**, n. 33, p. 221-248, 1986.
- MAISTRELLO, L.; OCETE, R.; LÓPEZ, M. A. Seasonal trends in the social composition and inside-trunk distribution of *Kalotermes flavicollis* (Isoptera: Kalotermitidae) colonizing grapevines. **Environmental Entomology**, n. 39, p. 295-302, 2010.

MATSUURA, K.; VARGO, E.L.; KAWATSU, K.; LABADIE, P.E.; NAKANO, H.; YASHIRO, T.; TSUJI, K. Queen succession through asexual reproduction in termites. **Science**. n.323, p.1687-1687, 2009.

MCMAHAN, E. Laboratory studies of colony establishment and development in *Cryptotermes brevis* (Walker) (Isoptera: Kalotermitidae). **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**. n.18, p.145-153, 1962.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de biologia celular**. Rio de Janeiro: Edgard Blücher Ltda., 1980. 71p.

NEOH, K. B.; LEE, C. Y. Developmental stages and caste composition of a mature and incipient colony of the drywood termite, *Cryptotermes dudleyi* (Isoptera: Kalotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, n. 104, v. 2, p. 622-628, 2011.

ODHIAMBO, T.R. The architecture of the accessory reproductive glands of the male desert locust. IV. The fine structure of the glandular epithelium. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. n.256, p.85-114, 1969.

PAMILO, P. Life span of queens in the ant *Formica exsecta*. **Insectes Sociaux**. n.38, p. 111-119, 1991.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 2 ed., London: J & A Churchill ltd., 1960, xiv+998p., 1960.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. n.60, p.289-310, 2006.

ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T., BIGNELL, D. E., HIGASHI, M. (Eds.). **Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology**. London: Kluwer Academic Press, 2000. p. 95-119.

ROISIN, Y.; PASTEELS, J. M. Polymorphism in the giant cocoa termite, *Neotermes papua* (Desneux). **Insectes Sociaux**, n. 38, p. 263-272, 1991.

SCHEFFRAHN, R.H.; KRECEK, J. Termites of the Genus *Cryptotermes* Banks (Isoptera: Kalotermitidae) from the West Indies. **Insecta Mundi**. v.13, n.1, p.11-71, 1999.

SPIEGEL, C.N.; BRETAS, J.A.C.; PEIXOTO, A.A.; VIGODER, F.M.; BRUNO, R.V.; SORES, M.J. Fine structure of the male reproductive system and reproductive behavior of *Lutzomyia longipalpis* sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLOS ONE**, n.8, v.9, p.1-12, 2013.

STELLA, E. Ricerche citologiche sui neutri e sui riproduttori delle termiti italiane, *Calotermes falavicolis* e *Reticulitermes lucifugus*. **Rend. Acad. Naz. Lincei**. n.7, p.30, 1938.

TUZET, O. In: Grassé, P.P. (ed.). *Traité de Zoologie*. n.8, Masson, Paris, p.139-276, 1977.

VARGO, E.L.; HUSSENER, C. The biology of subterranean termites: Insights from molecular studies on *Reticulitermes* and *Coptotermes*. **Annual Review of Entomology**. n.54, p.379-403, 2009.

VASCONCELLOS, A.; BANDEIRA, A.G.; MIRANDA, C.S.; SILVA, M.P. Termites (Isoptera) Pests in Buildings in João Pessoa, Brazil. **Sociobiology**. n.40, p.1-6, 2002.

VIEAU, F. Contribution à l'étude du spermatozoïde de *Kalotermes flavicollis* Fabr. (Insecte Isoptère). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. n.277, p.1173-1176, 1973.

WEESNER, F.M. The reproductive systems of young primary reproductives of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). **Insectes Sociaux**. v.2, n.4, p.323-345, 1955.

WEESNER, F.M. The reproductive system of young primary reproductives of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). **Insectes Sociaux**, 2, p.323-345, 1956.

WEESNER, F.M. 1969 External anatomy. In **Biology of termites**, vol.1 (ed. K. Krishna & F. M. Weesner), pp.19-47. New York: Academic Press. 598p.

Capítulo II

Aparelho reprodutor em Coptotermes gestroi (Isoptera, Rhinotermitidae): uma abordagem estrutural e histoquímica



RESUMO

Coptotermes gestroi é um cupim subterrâneo introduzido no Brasil. As colônias desta espécie de cupim são lideradas por um par de reprodutores primários, porém, reprodutores neotênicos não funcionais também podem ocorrer, mesmo na presença do par real. O aparelho reprodutor de ninfas, imagos, reprodutores neotênicos não funcionais e reis primários de *C. gestroi* foi analisado e estudado comparativamente em diferentes fases da vida destes reprodutores, com enfoque nas modificações ao longo do amadurecimento destes indivíduos. O sistema reprodutor destes machos foi investigado por meio de histoquímica, microscopia de luz e de transmissão, com destaque para a secreção das vesículas seminais. A estrutura geral do aparelho reprodutor em ninfas, imagos, neotênicos e reis obedeceu ao padrão descrito para insetos em geral, porém, estes indivíduos não apresentaram um pênis conspícuo, nem glândulas acessórias diferenciadas. Nos reis, cada testículo apresentou cerca de 7 lóbulos, os quais mostraram um aumento significativo de tamanho em relação aos presentes em reprodutores alados, neotênicos e ninfas. A espermatogênese tem início em ninfas a partir do 3º ínstar, sendo possível observar espermatozoides nos testículos destes indivíduos. Vesículas seminais de ninfas de 5º ínstar não apresentaram espermatozoides no seu lúmen, apesar destes terem sido observados nos testículos. As vesículas seminais mostraram uma parte distal secretora e uma parte proximal com função de armazenamento de espermatozoides. A ultraestrutura revelou que as células do epitélio da vesícula seminal possuem junções do tipo septadas, microvilosidades apicais, perfis de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. A histoquímica mostrou que a secreção das vesículas seminais de imagos e reis apresentou uma reação fortemente positiva ao PAS, enquanto o teste de xylydine-Ponceau evidenciou proteínas que aumentaram em quantidade com a idade dos machos. Este é o primeiro relato da ocorrência de glicoproteínas no lúmen das vesículas seminais de Isoptera e futuros estudos deverão esclarecer como estas glicoproteínas produzidas no aparelho reprodutor do macho interagem na fisiologia e no comportamento das fêmeas de cupins.

Palavras-chave: sistema reprodutor, vesículas seminais, testículos, morfologia, histoquímica.

1. INTRODUÇÃO

Coptotermes gestroi é um cupim endêmico do sudeste asiático, nativo da região indomalaia (TAKEMATSU et al., 2006), que pertence à subfamília Coptotermitinae, a qual possui representantes em todo o mundo (GRASSÉ, 1986). Esta subfamília faz parte da família Rhinotermitidae, que compreende os cupins subterrâneos; sendo que a maioria dessas espécies é considerada praga pelo fato de se alimentarem de madeiras estruturais e provocarem danos em áreas urbanas (SU e SCHEFFRAN, 2000).

De acordo com Costa-Leonardo (2002), a população de uma colônia de *C. gestroi* atinge mais de um milhão de indivíduos e esta colônia está distribuída em ninhos policíclicos (múltiplas peças), que podem ser subterrâneos e aéreos. Portanto, este cupim constroi um ninho principal que abriga o casal real e, mais tarde com o crescimento da colônia, são formadas novas construções conhecidas como ninhos satélites. Quando os reprodutores primários morrem ou ficam enfraquecidos, ou durante a divisão da colônia, quando um ninho satélite se separa do principal, podem aparecer reprodutores de substituição ou neotênicos. Geralmente estes indivíduos são neotênicos braquípteros porque possuem broto alar e se originam de ninfas. Neotênicos imaturos aparecem mesmo em colônias que possuem ambos os reprodutores primários (COSTA-LEONARDO e ARAB, 2004).

As castas de cupim são determinadas durante o seu desenvolvimento pós-embrionário e o desenvolvimento hemimetábolo de ovo até imago é caracterizado por estágios larvais e ninfais (NOIROT, 1969; 1990). Barsotti e Costa-Leonardo (2005) encontraram 6 ínstaes ninfais em *C. gestroi*, o que parece ser comum à família Rhinotermitidae, já que também foram encontrados 6 ínstaes ninfais em *Reticulitermes speratus* (TAKEMATSU, 1992) e *Coptotermes lacteus* (ROISIN e LENZ, 1999). No entanto, apenas ninfas de 3º, 4º e 5º ínstar saem para forragear junto aos operários e soldados, sendo mais comum a presença das ninfas de 4º e 5º ínstar entre os grupos de forrageiros (ALBINO e COSTA-LEONARDO, 2011).

Costa-Leonardo e Barsotti (1998) verificaram que o aparelho reprodutor do macho de *C. gestroi* é constituído por dois testículos, dois canais deferentes, duas vesículas seminais e um duto ejaculatório situado sob o 9º esternito abdominal. Os testículos são constituídos por vários lóbulos agrupados e estão localizados látero-dorsalmente no abdômen posterior. No macho alado, os testículos são pouco desenvolvidos e não se distinguem bem os lóbulos individualizados porque estes ficam compactamente agrupados (COSTA-LEONARDO, 2002). Contudo, em um rei primário de uma colônia incipiente de 2 anos, a autora descreveu até 7 lóbulos testiculares distintos. A mesma autora também observou que os espermatozoides presentes nos testículos dos machos de *C. gestroi* tinham uma forma esférica peculiar.

Para aprofundar o conhecimento acerca da morfologia e caracterizar a secreção presente nas vesículas seminais do cupim *C. gestroi* foi desenvolvido um estudo histológico, ultraestrutural e histoquímico em machos desta espécie, desde ninfas até reis primários com 6 anos de idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cupins: alados machos de *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) coletados em revoada, reis primários com 6 meses, 1, 2 e 4 anos de idade obtidos a partir de colônias previamente formadas em laboratório e reprodutores neotênicos coletados na natureza, de um ninho que possuía rei e rainha primários foram utilizados. Ninfas forrageiras desta espécie foram coletadas em armadilhas colocadas na natureza e foram classificadas em 3 ínstares, de acordo com análises morfométricas realizadas no laboratório de cupins (UNESP/Rio Claro). No mínimo 3 indivíduos de cada idade foram utilizados para a histologia e para cada coloração histoquímica.

2.2. Formação de colônias no laboratório: reprodutores alados de *C. gestroi* foram coletados em revoada, sexados e pareados para formação de colônias. Um total de 256 colônias foram iniciadas e mantidas em laboratório para obtenção dos reis primários de diferentes idades.

2.3. Morfologia do aparelho reprodutor: reprodutores alados e reis de *C. gestroi* de diferentes idades foram dissecados sob estereomicroscópio, em solução fisiológica para insetos e os órgãos genitais isolados. A seguir, cada órgão genital foi colocado individualmente em lâmina histológica, corado com uma solução aquosa de azul de metileno 1% e fotografado sob estereomicroscópio, com o auxílio do software Motic Image Plus 2.0 ML.

2.4. Histologia e histoquímica: as porções finais dos abdômens de ninfas, alados machos, reis de colônias laboratoriais com diferentes idades e reis neotênicos de *C. gestroi* foram fixadas inteiras em FAA (álcool absoluto, ácido acético glacial, formoldeído 40%, na proporção 3:1:1) por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram colocadas em álcool e desidratadas em uma bateria crescente de etanol (70 a 95%) tendo, cada banho, duração de 60 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de resina (Leica) de infiltração e

mantidas por 7 dias em geladeira. Após essa etapa, os abdômens foram incluídos lateralmente em moldes especiais e preenchidos com historesina Leica® mais catalisador, para polimerização em estufa a 37° C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura com navalhas de tungstênio em micrótomo (Leica RM2245). As secções histológicas depois de coradas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio (Leica DM500/Leica ICC50), com o auxílio do software LAS v4.0 (Leica Application Suite v4). A tabela a seguir indica as técnicas de coloração utilizadas para os diferentes machos analisados:

Tabela 1. Colorações utilizadas para observação do sistema reprodutor em *Coptotermes gestroi*.

Reprodutores machos	Colorações*			
	HE	PAS	XP	PAS/Alcian
Ninfas	x			
Reprodutor alado	x	x	x	x
Rei 6 meses	x	x	x	x
Rei 1 ano	x	x	x	x
Rei 2 anos	x			
Rei 4 anos	x	x	x	x
Reprodutor neotênico	x	x		

*HE, hematoxilina-eosina; PAS, ácido periódico de Schiff; XP, xylydine-Ponceau; x, coloração desenvolvida.

- **Coloração com hematoxilina-eosina (HE):** as secções histológicas foram lavadas em água destilada por 1 minuto e posteriormente coradas com hematoxilina por 10 minutos. Em seguida, estas secções foram colocadas para reagir em água parada por 4 minutos e posteriormente coradas com eosina por 5 minutos (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Após este procedimento, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após secagem, as lâminas foram montadas em bálsamo e fotografadas em fotomicroscópio.

- **Identificação de polissacarídeos neutros com a coloração de ácido periódico de Schiff (PAS):** as secções histológicas foram banhadas em ácido periódico 0,4% por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada por cerca de 1 minuto e, posteriormente, coradas com reativo de Schiff por 60 minutos em local escuro. Após esse procedimento, os cortes foram submetidos a três banhos de água sulfurosa por cerca de 3 minutos cada. Em seguida, foram lavados em água corrente por 20 minutos e as lâminas secas à temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram montadas em bálsamo e documentadas em fotomicroscópio. Este

método evidencia os polissacarídeos neutros e as glicoproteínas, os quais se coram intensamente de vermelho-magenta e as glicosaminoglicanas, que aparecem coradas em púrpura (PEARSE, 1960; MELLO e VIDAL, 1980).

- **Detecção de proteínas totais (ácidas e básicas) com a coloração de xyloidine-Ponceau (XP):** as secções histológicas foram coradas com xyloidine-Ponceau por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram passadas em tampão acetato de sódio (pH = 2,6) por 1 minuto, lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram montadas em bálsamo e posteriormente analisadas e documentadas em fotomicroscópio. Por este método, as proteínas coram-se em vermelho alaranjado (MELLO e VIDAL, 1980).

- **Identificação dos polissacarídeos neutros e ácidos com a coloração de PAS-Alcian Blue:** as secções histológicas foram hidratadas em água destilada, coradas com o azul de alcian pH=2,5 por 30 minutos, novamente lavadas em água destilada e, em seguida, coradas com o ácido periódico de Schiff 1% durante 5 minutos. Após outra lavagem em água destilada, estas secções foram colocadas no reativo de Schiff por 30 minutos no escuro, lavadas em água sulfurosa por 1 minuto, em água corrente durante 10 minutos e foram secas à temperatura ambiente. Por este método os polissacarídeos ácidos coram-se em azul celeste e polissacarídeos neutros com agrupamento 1-2 glicol, em vermelho (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983).

2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): abdômens de reprodutores alados machos e de reis funcionais de *C. gestroi* com um ano de idade foram fixados em glutaraldeído 2,5%, pós-fixados em OsO₄ 1% e embebidos em resina epon Araldite. Os materiais foram incluídos em resina Epon pura e polimerizados a 60°C por 72 horas. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

3. RESULTADOS

O aparelho reprodutor das ninfas e dos reprodutores machos de *Coptotermes gestroi* mostrou ser constituído por dois testículos, dois dutos deferentes, duas vesículas seminais bem evidentes e um ducto ejaculatório comum (Figuras 1 e 2A). Em reprodutores alados machos de *C. gestroi* (Figura 1A) foram observadas vesículas seminais conspícuas enquanto os lóbulos testiculares apareceram como estruturas pequenas e agrupadas. Já em um rei primário com 6 anos de idade (Figura 1B), além das vesículas seminais conspícuas e aumentadas, foram observados os lóbulos testiculares em formato de flor, muito alargados e evidentes, sendo possível distinguir um lóbulo do outro. Esse aumento dos lóbulos testiculares foi bem visível no desenvolvimento dos reprodutores de *C. gestroi* (Figura 2).

Nas ninfas e nos reprodutores alados não foi possível distinguir cada lóbulo testicular independentemente, pois eles além de se apresentarem ainda delgados, também encontram-se agrupados (Figuras 2B-D). Em reis primários com 6 meses, 1, 2 e 4 anos de idade, os testículos aumentaram consideravelmente de tamanho e foi possível observar os lóbulos testiculares individualizados, bem como as células germinativas em diferenciação nos cistos (Figuras 2E-H). Nos reprodutores neotênicos não funcionais, os lóbulos testiculares não estavam tão individualizados como nos reis primários e pareciam ter um desenvolvimento intermediário entre os imagos e os reis funcionais (Figura 2I). Em reis primários com 4 e 6 anos de idade foi possível visualizar de 5 a 9 lóbulos testiculares (Figuras 1B e 2A). Estes lóbulos testiculares são formados por cistos de espermátides/espermatozoides, envolvidos por uma parede própria e separados um do outro por uma bainha de aparência fibrosa, a bainha peritoneal. Além disso, em cada cisto pôde-se notar que todas as células estão no mesmo estágio de desenvolvimento. Na região apical dos lóbulos testiculares foram observadas células com núcleos arredondados e na região basal, células cuja cromatina apresentou arranjos típicos de divisão meiótica, além

de espermatozoides (Figura 2). Em *C. gestroi* os espermatozoides são arredondados, aflagelados e medem cerca de 2 μ m de diâmetro.

Os dutos deferentes observados são pares e partem dos testículos lateralmente no sentido dorso-ventral até a base do nono esternito. Estes dutos são formados por uma camada de tecido epitelial simples, circundada por uma camada de musculatura. No interior destes dutos deferentes, foram observados espermatozoides em trânsito até a vesícula seminal, onde serão estocados (Figura 2A).

As vesículas seminais de *C. gestroi* são pares e individualizadas nos reprodutores examinados (Figura 1). Nas ninfas de 3^o, 4^o e 5^o ínstar, estas estruturas, apesar de individualizadas apresentaram-se bem menores e não mostraram espermatozoides no seu lúmen. Contudo, a partir de ninfas de 3^o ínstar já exibiram espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos. As vesículas seminais desembocam na porção final dos dutos deferentes e têm a aparência de dois tubos retorcidos (Figura 1). Nos reprodutores machos, estas vesículas são formadas, na sua porção mais distal, por um epitélio simples colunar envolvido por musculatura e na sua porção proximal, por um epitélio simples cúbico, também circundado por musculatura. Estas regiões são facilmente distintas pela grande quantidade de espermatozoides presente no lúmen da porção proximal (Figura 3). Além disso, a musculatura visceral da parte proximal é mais espessa do que a presente na porção distal (Figura 3A).

O canal ejaculatório em machos de *C. gestroi* apresentou uma camada simples de células epiteliais envolta por uma camada muscular visceral (Figura 2A). Ele é formado pela junção dos dois dutos deferentes em um ducto mediano e sua porção final termina em um pênis membranoso.

O lúmen das vesículas seminais mostrou uma secreção fortemente positiva ao teste histoquímico de PAS em reprodutores alados, reprodutores neotênicos e reis primários com 1 e 4 anos de idade (Figuras 4A-B). Contudo, o teste histoquímico de PAS/Azul de Alcian foi negativo para polissacarídeos ácidos nos mesmos indivíduos, confirmando a presença de polissacarídeos neutros na secreção das vesículas seminais (Figura 4C). A região basal do epitélio das vesículas seminais também mostrou positividade ao PAS em todos os indivíduos examinados, enquanto o citoplasma destas células epiteliais mostrou uma reação negativa (Figuras 4A-C).

O teste histoquímico de xylidine-Ponceau praticamente não evidenciou proteínas na secreção da vesícula seminal de reprodutores alados (Figura 4D). Reis primários com 6 meses

possuem uma grande quantidade de proteína, a qual aumenta muito em reis primários com 4 anos de idade (Figuras 4E-F). Portanto, os resultados mostraram uma secreção proteica na luz das vesículas seminais que é acumulada na forma de uma secreção esférica, cuja quantidade varia de acordo com a maturidade e funcionalidade dos reprodutores.

Secções semifinas das vesículas seminais evidenciaram melhor a musculatura visceral que envolve o epitélio secretor destes órgãos em reprodutores alados (Figura 5A). A ultraestrutura da vesícula seminal em reprodutores alados e reis mostrou muitas microvilosidades na região apical das células epiteliais da vesícula seminal (Figuras 5B e 5C). Nos reprodutores alados também se observou uma secreção floculada no lúmen das vesículas seminais (Figura 5C), enquanto perfis de retículo endoplasmático rugoso foram observados no citoplasma das células epiteliais destas estruturas (Figura 5D). Além disso, em ambos os reprodutores, foi observada uma lâmina basal espessa envolta por células musculares viscerais (Figura 5E). Outra característica das células epiteliais das vesículas seminais nestes reprodutores é a união das células por meio de junções septadas (Figuras 5F e 5G). Em reis funcionais, o citoplasma das células epiteliais apresentou retículo endoplasmático rugoso, polirribossomos, complexo de Golgi e poucas mitocôndrias. Na região proximal da vesícula seminal de reis funcionais é possível observar muitos espermatozoides esféricos fortemente eletrondensos no lúmen, próximo a células sexuais degenerativas (Figura 5H). Detalhe de um espermatozoide, com aproximadamente 2µm de diâmetro, evidenciou o núcleo esférico eletrondenso, que neste caso contém uma área eletronlúcida (Figura 5I). Os espermatozoides mostram em um dos seus pólos, uma pequena região que abriga dois centríolos e duas mitocôndrias. Microtúbulos não foram observados nos espermatozoides e nas espermátides.

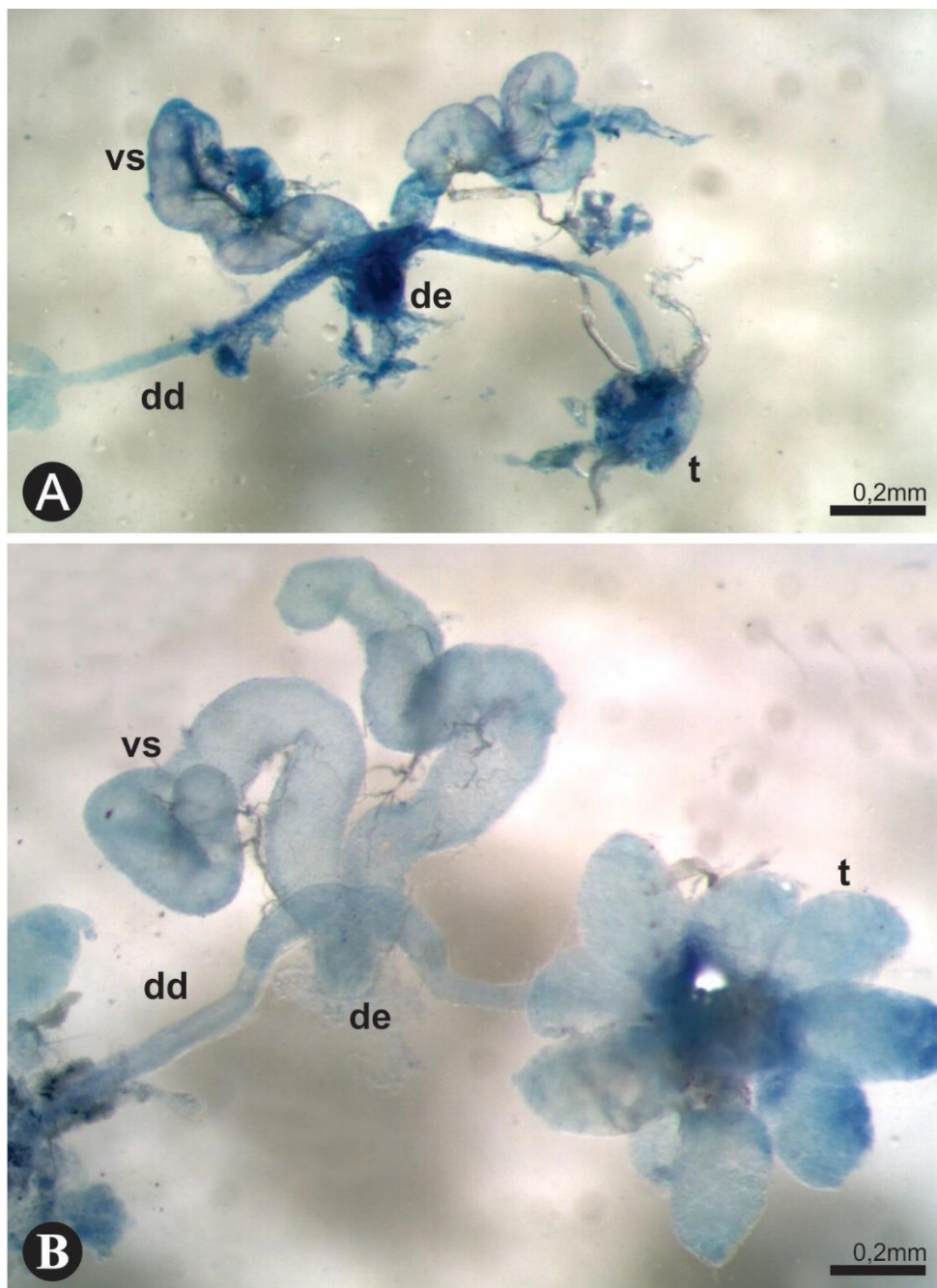


Figura 1. Aparelho reprodutor do macho de *Coptotermes gestroi*. Coloração: azul de metileno. **A.** Imago. **B.** Rei de 6 anos de idade. **dd**, duto deferente; **de**, duto ejaculatório; **t**, testículo; **vs**, vesícula seminal.

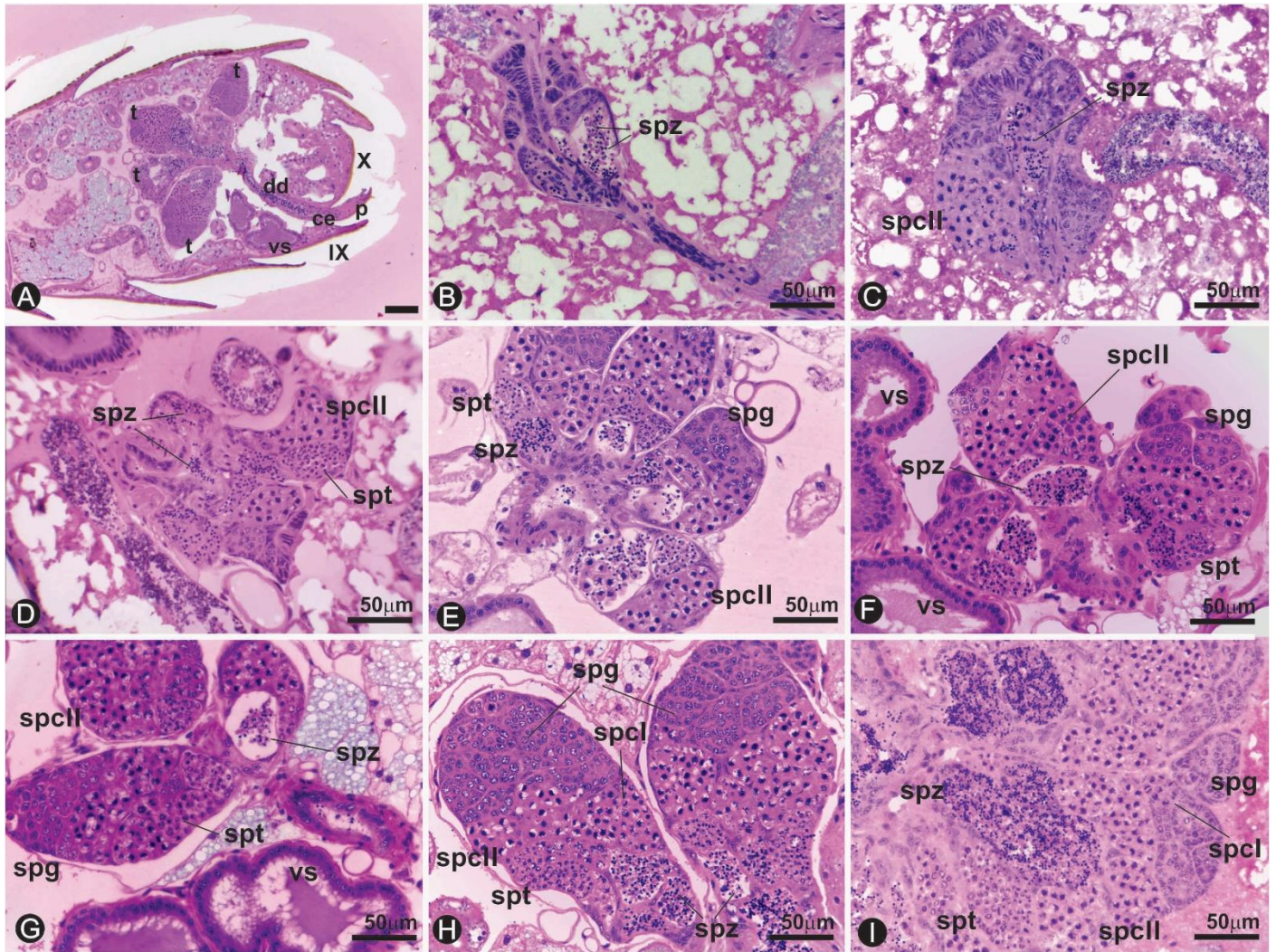


Figura 2. Secção histológica do aparelho reprodutor em machos de *Coptotermes gestroi*, evidenciando as diferentes fases da espermatogênese. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Vista geral do aparelho reprodutor de um rei com 4 anos de idade, mostrando os folículos testiculares (t), o ducto deferente (dd), a vesícula seminal (vs), o canal ejacutório (ce) e um pênis (p). **B.** Detalhe dos túbulos seminíferos de uma ninfa de 3º ínstar com espermatogônias (spg) e espermatozoides (spz). **C.** Detalhe dos lóbulos testiculares de uma ninfa de 5º ínstar mostrando um aumento no tamanho do testículo. **D.** Reprodutor alado. **E.** Rei com 6 meses de idade. **F.** Rei com 1 ano de idade. **G.** Rei com 2 anos de idade. **H.** Detalhe de dois lóbulos testiculares em reis com 4 anos de idade, evidenciando todas as fases da espermatogênese: espermatogônias, (spg); espermatócitos I, (spcl); espermatócitos II, (spcll); espermátides, (spt); espermatozoides, (spz). **I.** Detalhe dos lóbulos testiculares em um reprodutor neotênico. IX, 9º esternito; X, 10º esternito.

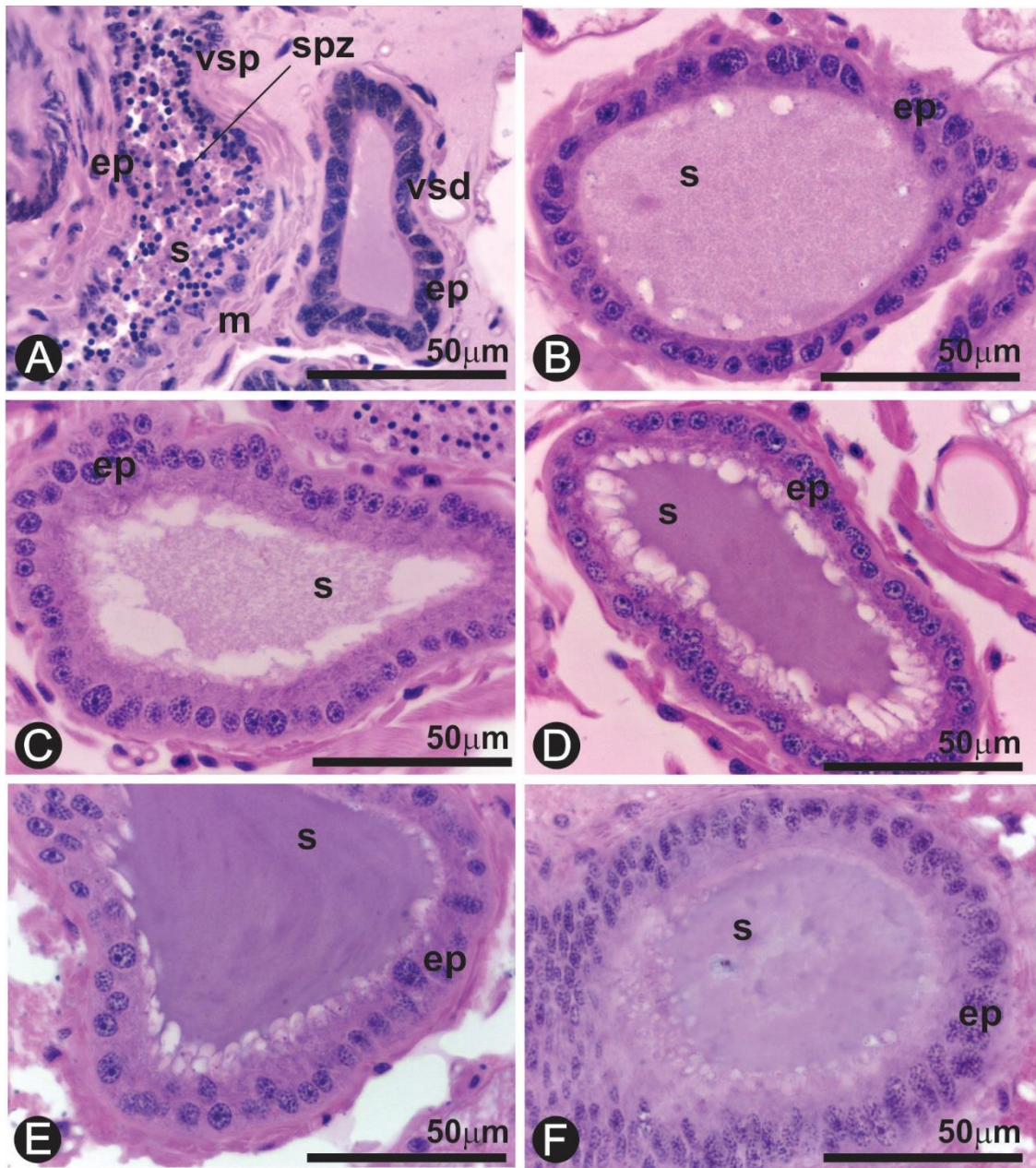


Figura 3. Detalhe das vesículas seminais de machos de *Coptotermes gestroi*. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Porção proximal (**vsp**) contendo espermatozoides (**epz**) e distal (**vsd**) da vesícula seminal de um imago. **B.** Rei com 6 meses de idade. **C.** Rei com 1 ano de idade. **D.** Rei com 2 anos de idade. **E.** Rei com 4 anos de idade. **F.** Reprodutor neotênico. **ep**, epitélio vesicular; **m**, musculatura; **s**, secreção vesicular.

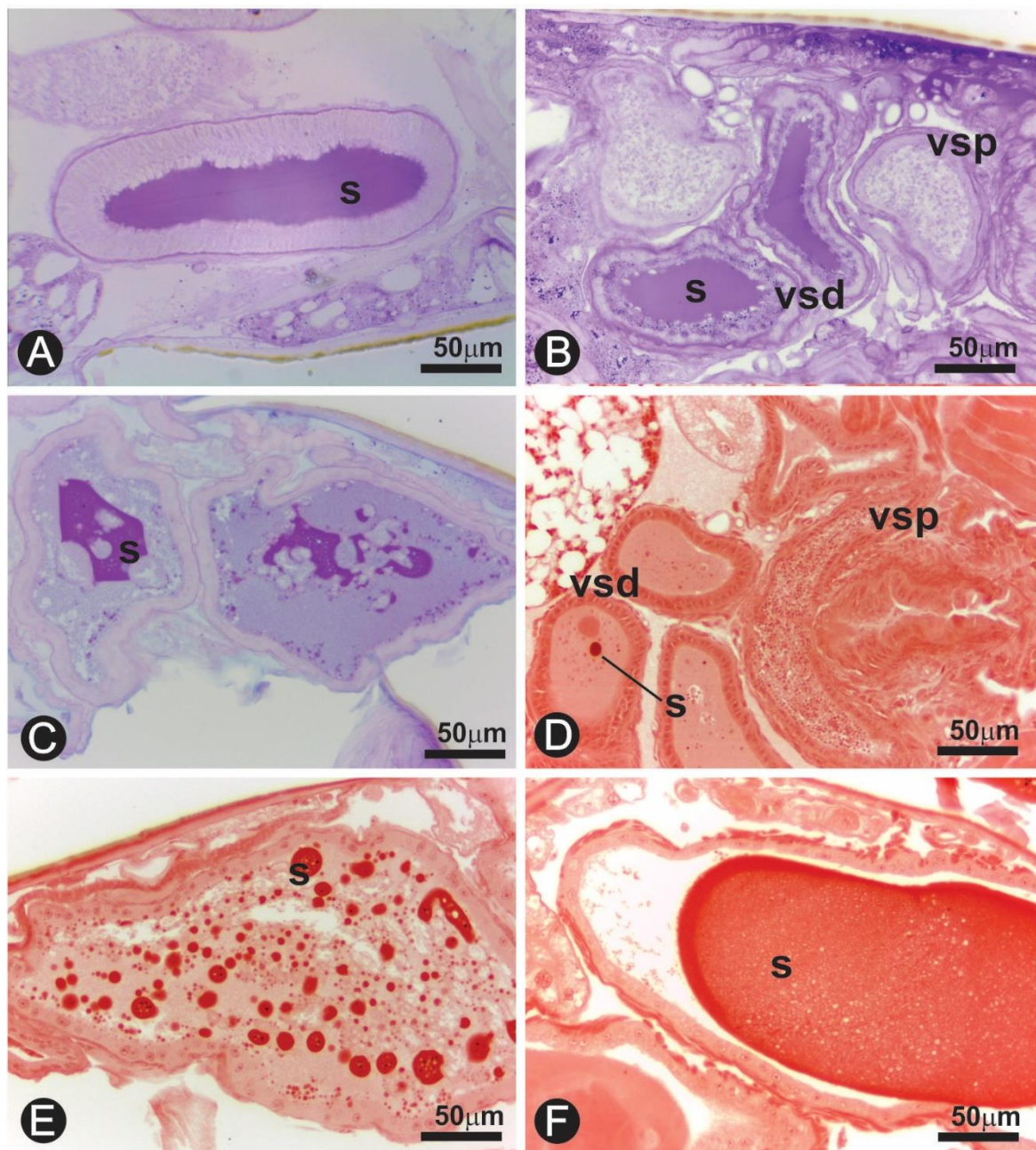


Figura 4. Secções das vesículas seminais dos reprodutores machos de *Coptotermes gestroi*. **A.** Imago. **B.** Rei com 4 anos de idade. **C.** Rei com 6 meses de idade. **D.** Imago. **E.** Rei com 6 meses de idade. **F.** Rei com 1 ano de idade. Colorações: PAS (A-B); PAS/Alcian Blue (C); xylidine-Ponceau (D-F).

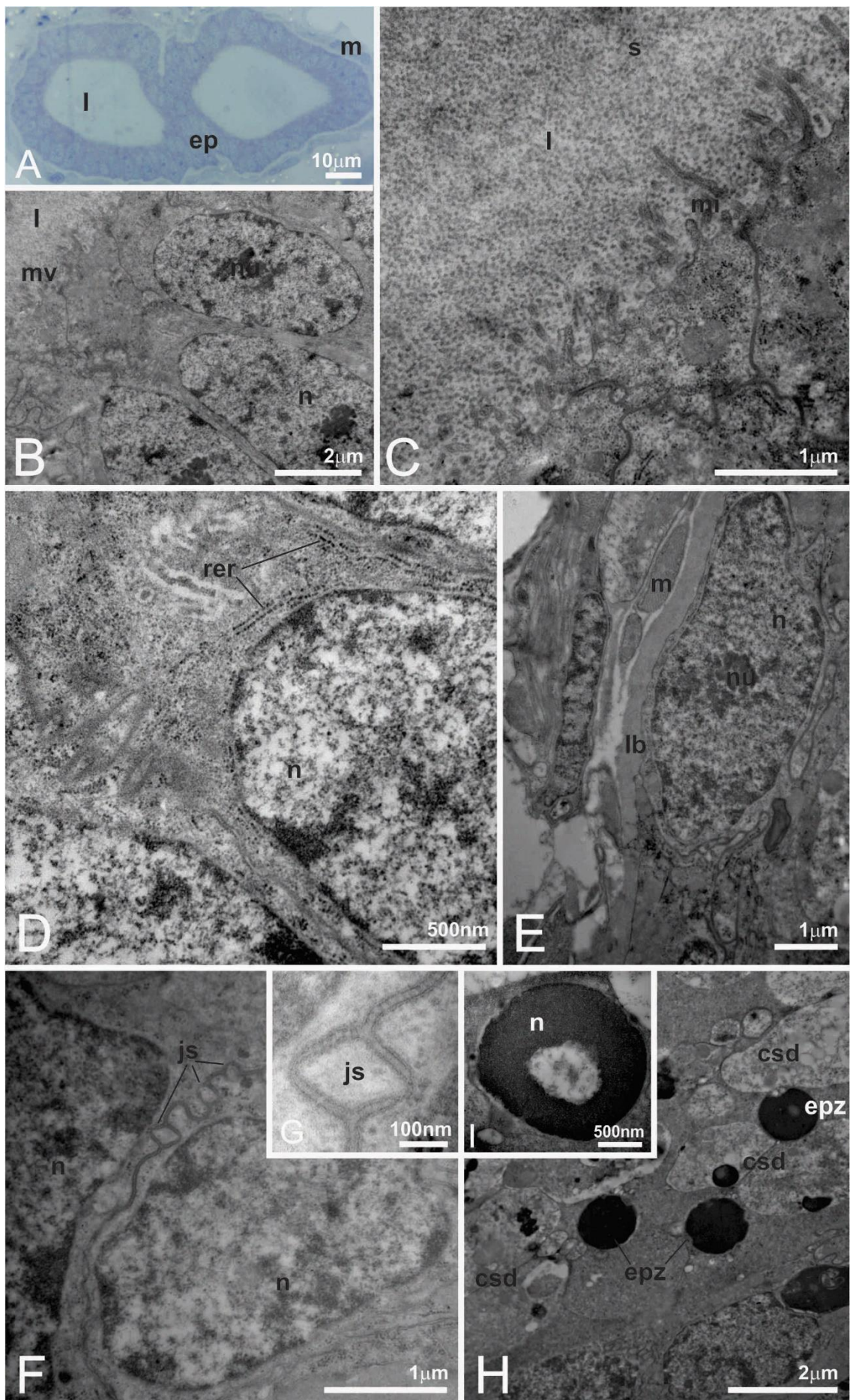


Figura 5. **A.** Secção ultrafina da região distal da vesícula seminal em imagos de *Coptotermes gestroi*. Coloração: Azul de metileno **B.** Ultraestrutura da vesícula seminal de um imago de *C. gestroi*, evidenciando os núcleos (**n**) e nucléolos (**nu**) das células epiteliais e as microvilosidades (**mi**) na região apical destas células. **C.** Detalhe da região apical do epitélio mostrando as microvilosidades (**mi**) e secreção (**s**) floculada na luz (**l**) da vesícula seminal de uma imago. **D.** Perfis de retículo endoplasmático rugoso (**rer**) no citoplasma de uma célula epitelial. **E.** Detalhe da região basal da porção proximal vesícula seminal de rei, mostrando a musculatura (**m**) envolvente. **F.** Porção proximal da vesícula seminal de reis. Observar a junção septada (**js**) entre duas células epiteliais vizinhas. **G.** Detalhe da junção septada. **H.** Vista geral do lúmen da porção proximal da vesícula seminal de rei. Observar os espermatozoides (**epz**) entre as células sexuais degenerativas (**csg**). **I.** Detalhe de um espermatozoide com duas regiões de diferentes eletrondensidades no núcleo (**n**). **ep**, epitélio vesicular; **lb**, lâmina basal; *, região dos centríolos.

4. DISCUSSÃO

A morfologia do sistema reprodutor dos machos de *Coptotermes gestroi* foi similar àquela descrita por Weesner (1969) para o cupim *Reticulitermes hesperus*. O rei primário de *R. hesperus* possui dois testículos, cada um constituído por vários lóbulos testiculares com formato digitiforme, sendo que a região apical destes lóbulos é formada por células em divisão e a região basal contém espermatozoides maduros. Em *C. gestroi*, os lóbulos testiculares apresentaram um crescimento em tamanho desde os ínstaes de ninfas analisados até reprodutores primários com 4 anos de idade, atingindo um ápice nestes últimos. Ye, Jones e Ammar (2009) encontraram o mesmo padrão de desenvolvimento para machos de *R. flavipes*, sendo os órgãos reprodutores de reis com 5 anos de idade muito maiores do que os dos reprodutores alados.

Em *C. gestroi*, os lóbulos testiculares de reis primários parecem estar completamente separados uns dos outros, assim como ocorre em díptera e em alguns ortópteros, nos quais os testículos consistem em estruturas individuais, conectadas ao ducto deferente (CHAPMAN, 1998). Ninfas, reprodutores alados e reprodutores neotênicos não mostraram uma nítida separação dos lóbulos testiculares e esta evidência morfológica é que parece diferenciar reprodutores funcionais de não funcionais em uma colônia de *C. gestroi*. Já a histologia dos túbulos seminíferos mostrou que eles são constituídos por cistos de espermátides/espermatozoides, envolvidos por uma parede própria e separados um do outro por uma bainha de aparência fibrosa. Além disso, pode-se notar que em cada cisto todas as células germinativas encontram-se dispostas em arranjos e estágios de desenvolvimento que diferem de acordo com a fase de vida dos machos e também da região apical para a basal.

No presente trabalho, reis primários de 6 anos de *C. gestroi* apresentaram até 9 lóbulos por testículo. O número de tubos seminíferos é variável entre as espécies e nos cupins inferiores, sendo que, geralmente, ocorrem de 7 a 10 por testículo (WEESNER, 1969). Nos reprodutores

alados estudados, o número de lóbulos testiculares foi de difícil identificação, uma vez que os testículos estavam pouco desenvolvidos nestes reprodutores, com os referidos tubos compactamente agrupados. Contudo, nos reis de *C. gestroi*, os lóbulos encontravam-se perfeitamente separados, em forma de dedos, semelhante aqueles descritos por Springhetti e Oddone (1963) para machos da família Rhinotermitidae.

As vesículas seminais de *C. gestroi* são órgãos individualizados com diferenciações morfológicas e provavelmente funcionais em suas diferentes partes (proximal e distal). De acordo com Chapman (1998), as vesículas seminais são dilatações dos dutos deferentes em muitos insetos, mas em alguns himenópteros elas são apenas dilatações do ducto ejaculatório. Nos insetos ortopteroides, elas não são simples expansões dos dutos, e sim estruturas individualizadas, como foi verificado em *C. gestroi*. Contudo, nos cupins superiores, como *Cubitermes fungifaber*, elas são dilatações dos dutos deferentes (N'DIAYE, 1977), assim como em machos de alguns cupins inferiores, como *Cryptotermes brevis* (Capítulo I). As vesículas seminais de *C. gestroi* apresentaram o lúmen preenchido por uma secreção na sua porção distal além de espermatozoides em sua porção mais proximal. Weesner (1955) também encontrou vesículas seminais bem desenvolvidas e com o lúmen preenchido por uma secreção clara, contendo algumas inclusões e poucos espermatozoides em *R. hesperus*. O espermatozoide de *C. gestroi* é muito semelhante ao observado por Baccetti (1979) em cupins do gênero *Reticulitermes*, ou seja, é esférico e desprovido de microtúbulos. Contudo, *Mastotermes darwiniensis*, *Kalotermes flavicollis* e *Zootermopsis nevadensis* possuem estas estruturas microtubulares (JAMIESON, 1987).

De acordo com Chapman (1998), as células das vesículas seminais são glandulares e provavelmente fornecem nutrição para os espermatozoides. As vesículas seminais também foram descritas para outras espécies de cupins inferiores, como por exemplo, em *Hodotermes mossambicus*, no qual o autor considera um epitélio secretor, formado por células providas de canais e envolvido por uma camada muscular, que também se apresentou mais espessa no segmento proximal. Contudo, como estes canais são cuticulares, o teste do PAS aplicado às vesículas seminais de *C. gestroi* deveria ter corado de magenta os referidos canais, o que não ocorreu, evidenciando que as células epiteliais destas estruturas não são providas de canais neste cupim.

Todos os reprodutores machos, imagos e reis de diferentes idades, mostraram uma secreção fortemente positiva ao PAS na luz das vesículas seminais. Esta positividade ao PAS corrobora com a ideia de que a secreção das vesículas seminais seja constituída por glicoproteínas, uma vez que em muitos insetos estes órgãos produzem proteínas ou peptídeos (SPIEGEL et al., 2013). Os resultados do teste histoquímico de PAS não mostraram polissacarídeos no citoplasma das células epiteliais das vesículas seminais dos reprodutores estudados. Contudo, a positividade observada na região basal do epitélio vesicular foi devido às glicoproteínas presentes na membrana basal. O teste histoquímico de xylidine-Ponceau confirma essa teoria, já que a secreção foi positiva ao teste, aumentando em quantidade com a maturidade dos machos.

A ultraestrutura da vesícula seminal também mostrou uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma das células epiteliais da vesícula seminal dos reprodutores de *C. gestroi*, outro indicativo de uma alta produção proteica nestas células. De acordo com Avila et al. (2011), proteínas encontradas nas vesículas seminais e nas glândulas anexas dos insetos apresentam uma variedade de funções que, em conjunto, servem para melhorar o sucesso reprodutivo do macho. Elas também podem ser produzidas em outras regiões do aparelho reprodutor do macho, tal como os dutos ejaculatórios e, por isso, são conhecidas nos insetos em geral como proteínas do fluido seminal (seminal fluid proteins - SFP). Estas proteínas agem em todas as fases da biologia reprodutiva da fêmea inseminada e possuem diferentes funções, tais como: função antimicrobiana, diminuição da receptividade das fêmeas ou da atratividade das mesmas; melhoria na proteção, estocagem, ativação e competição dos espermatozoides além de induzirem um aumento na ovogênese e oviposição das fêmeas (WOLFNER; 1997; GILLOTT, 2003; AVILA et al., 2011). No caso de *C. gestroi*, é possível que as SFP atuem em todas essas funções; contudo, este é o primeiro relato da ocorrência de proteínas, provavelmente um complexo proteína-polissacarídeo, ou seja, glicoproteínas, em vesículas seminais de Isoptera. Futuros estudos utilizando ferramentas moleculares deverão esclarecer como estas glicoproteínas produzidas no aparelho reprodutor do macho afetam a fisiologia e o comportamento das fêmeas de cupins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINO, E.; COSTA-LEONARDO, A.M. Nymphs in foraging populations of *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Animal Biology**. n.61, p.427-439, 2011.
- AVILA, F.W.; SIROT, L.K.; LaFLAMME, B.B.; RUBINSTEIN, C.D.; WOLFNER, M.F. Insect seminal fluid proteins: identification and function. **Annual Review of Entomology**. n.56, p.21-40, 2011.
- BARSOTTI, R.C.; COSTA-LEONARDO, A.M. The caste system of *Coptotermes gestroi* (Isoptera, Rhinotermitidae). **Sociobiology**. v.46, n.1, p.1-17, 2005.
- CHAPMAN, R. F. **The insects. Structure and function**. Cambridge University Press, Cambridge, 1998. 770p.
- COSTA-LEONARDO, A.M. **Cupins-praga: morfologia, biologia e controle**. Rio Claro, Ana Maria Costa-Leonardo (Ed.), 128p., 2002.
- COSTA-LEONARDO, A.M.; BARSOTTI, R.C. Swarming and incipient colonies of *Coptotermes havilandi* (Isoptera, Rhinotermitidae). **Sociobiology**. Chico, v.31, n., p.131-142, 1998.
- COSTA-LEONARDO, A.M.; ARAB, A. Reproductive strategy of *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**. v.44, n.1, 2004.
- ENGEL, M.S., GRIMALDI, D.A.; KRISHNA, K. 2009. Termites (Isoptera): Their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, 3650: 1–27, 2009.
- GILLOTT, Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**. n.48, p.163-184, 2003.
- GRASSÉ, P.P. **Termitologia**, Tome III. Masson, Paris, 1986.

- HIGA, S. 1981. **Flight, colony foundation and development of the gonads of the primary reproductives of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki.** Ph.D. thesis, University of Hawaii; Honolulu, HI.
- JAMIESON, B.G.M. **The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa.** Cambridge University Press, Cambridge, England. 1987. 320p.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de biologia celular.** Rio de Janeiro: Edgard Blücher Ltda., 1980. 71p.
- N'DIAYE, M.S. Le développement post-embryonnaire de l'appareil génital chez les sexués de *Cuhitermesfungifaber* (Sjöstedt) (Termitidae, Termitinae). **Insectes Sociaux.** n.24, p.37-60, 1977.
- NOIROT, C. Formation os castes in the higher termites. In: KRISHNA, W.; WEESNER, F.M. (Ed.). **Biology of Termites, vol.1.** New York: Academic Press, 1969. P.311-350.
- NOIROT, C. Sexual castes and reproductive strategies in termites. In: ANGELS, W. (Ed.). **Social insects an evolutionary approach to castes and reproduction.** New York: Springer-Verlag, 1990. p.5-35.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied.** 2 ed., London: J & A Churchill ltd., 1960, xiv+998p., 1960.
- RAINA, A.; PARK, Y.I.; FLORANE, C. Behavior and reproductive biology of the primary reproductives of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology.** n.41, p.37-48, 2003.
- ROISIN, Y.; LENZ, M. Caste developmental pathways in colonies of *Coptotermes lacteus* (Froggatt) headed by primary reproductives (Isoptera, Rhinotermitidae). **Insectes Sociaux.** v.46, n.3, p,273-280, 1999.
- SCHMID-HEMPEL, P. 1998. **Parasites in social insects.** Krebs, J.; Clutton-Brock, T.H. (Eds.) Princeton University Press, Princeton. pp.392.

SPIEGEL, C.N.; BRETAS, J.A.C.; PEIXOTO, A.A.; VIGODER, F.M.; BRUNO, R.V.; SORES, M.J. Fine structure of the male reproductive system and reproductive behavior of *Lutzomyia longipalpis* sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLOS ONE**, n.8, v.9, p.1-12, 2013.

SPRINGHETTI, A.D.; ODDONE, P. Sugli organi genitali maschili delle Rhinotermitidæ (isoptera). **Insectes Sociaux**. v.10, n.2, p.143-152, 1963.

SU, N. Y.; SCHEFFRAHN, R. H. 2000. Termites as pests of buiding. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (Ed.). **Termites** : evolution, sociality, symbioses, ecology. London: Kluwer, p437-453.

TAKEMATSU, Y. Biometrical study on the development of the castes in *Reticulitermes speratus* (Isoptera, Rhinotermitidae). **Japanese Journal of Entomological Zoology**. v.60, n.1, p.67-76, 1992.

TAKEMATSU, Y., T. YOSHIMURA, S. YUSUF, Y. YANASE, K. KAMBARA, A. TASHIRO, S. DOI, M. TAKAHASHI, P. SUKARTANA, T. INOUE, et al. 2006. **Termite assemblages in urban areas of south east Asia - diversity and economic impacts**. In: Imamura, Y.; Umezawa, T.; Hata, T. (Eds.). Sustainable development and utilization of tropical forest resources. RISH, Kyoto University, Kyoto, Japan. pp.84-91.

WEESNER, F.M. The reproductive systems of young primary reproductives of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). **Insectes Sociaux**. v.2, n.4, p.323-345, 1955.

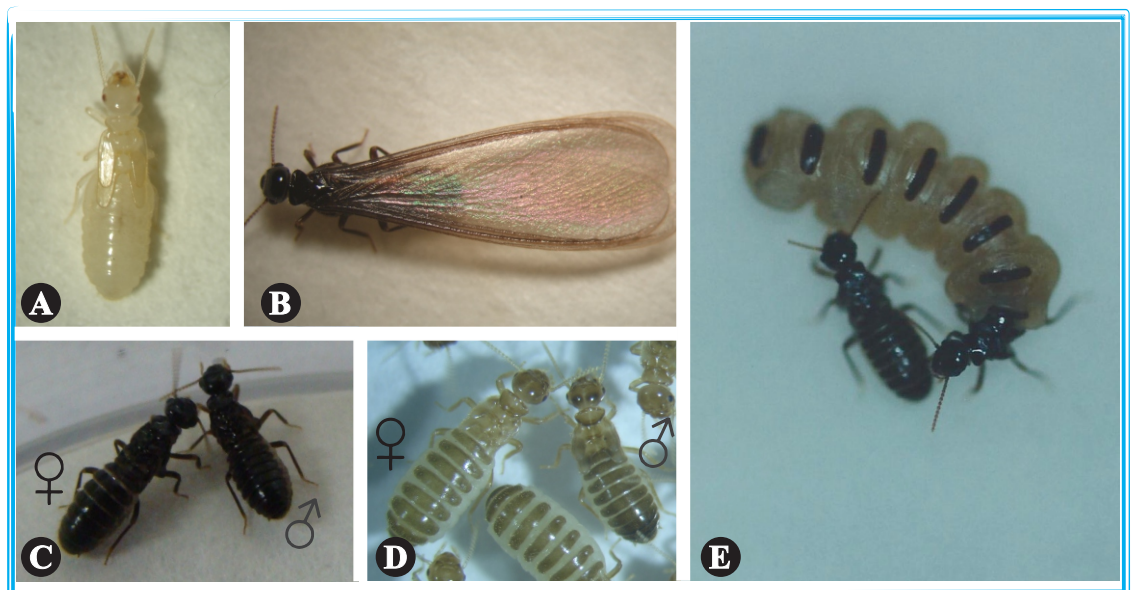
WEESNER, F.M. 1969 External anatomy. In **Biology of termites**, vol.1 (ed. K. Krishna & F. M. Weesner), pp.19-47. New York: Academic Press. 598p.

WOLFNER, M.F. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. n.27, p.179-192, 1997.

YE, Y.; JONES, S.C.; AMMAR, E. Reproductive characteristics of imagos of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**. n.102, p.889-894, 2009.

Capítulo III

Morfologia do sistema reprodutor durante o desenvolvimento do cupim Silvestritermes euamignathus (Isoptera, Termitidae)



RESUMO

A evolução do sistema reprodutor de machos de *Silvestritermes euamignathus* foi acompanhada em ninfas de 1º a 5º instar e em reprodutores alados ou imagos. Adicionalmente, também foram analisadas sob microscopia de luz as gônadas e vesículas seminais de reis primários e reis neotênicos de colônias naturais, assim como de reis com 4 meses de idade, provenientes de colônias de laboratório. Os testículos, já presentes nas ninfas de 1º instar, mostram um desenvolvimento progressivo até atingir um ápice em reis de colônias naturais, caracterizado, tanto pelo tamanho como pela produção de espermatozoides. Apesar da espermatogênese já ter sido observada em ninfas de 3º instar, apenas em ninfas de 5º instar foi verificada a presença de espermatozoides nos testículos e nas vesículas seminais. Os reis primários apresentaram de 7 a 10 lóbulos testiculares completamente separados uns dos outros, contendo espermatozoides arredondados e aflagelados de aproximadamente 2-3 µm de diâmetro. Os testículos dos reprodutores neotênicos são semelhantes ao dos alados e ninfas, nos quais não se observa ainda a individualização dos lóbulos testiculares. Após a fundação das novas colônias e amadurecimento dos reis, ocorre um aumento significativo do aparelho reprodutor, sendo muito evidente que em reis de colônias naturais, os lóbulos testiculares ocupam praticamente todo o abdômen posterior destes indivíduos. Os resultados mostram um amadurecimento precoce do sistema reprodutor dos machos e um aumento da produção de espermatozoides em colônias maduras. As vesículas seminais em todos os machos de *S. euamignathus* se apresentam como porções especializadas e não apenas uma continuação dos dutos deferentes, sendo mais desenvolvidas em reis de colônias naturais do que em reprodutores alados, além de servirem para o armazenamento de espermatozoides a partir de ninfas de 5º instar, nas quais já são encontrados espermatozoides no lúmen das vesículas seminais.

Palavras-chave: sistema reprodutor, vesículas seminais, testículos, morfologia, histologia.

1. INTRODUÇÃO

A infraordem Isoptera é composta por insetos eussociais e reúne mais de 2900 espécies descritas no mundo, abrangendo 9 famílias dentro da Ordem Blattaria, segundo a recente classificação de Krishna et al. (2013). Os cupins são mais conhecidos pelo seu potencial como pragas e por causarem danos expressivos principalmente em centros urbanos (CONSTANTINO, 2002), porém eles apresentam uma enorme importância ecológica, uma vez que conseguem degradar celulose, substância que compõe a maior parte da biomassa do planeta, e que poucos seres vivos são capazes de metabolizar (HIGASHI e ABE, 1997).

Os cupins apresentam uma organização social complexa com especialização dos indivíduos em castas. A diferenciação das castas ocorre durante o desenvolvimento ontogenético dos indivíduos e pode ser influenciada tanto por fatores ambientais (MAO e HENDERSON, 2007) como por determinação genética (HAYASHI et al., 2007; KITADE et al., 2011). As castas dos cupins incluem duas linhagens distintas, a linhagem áptera, composta por operários, soldados e seus precursores, e a linhagem imaginal, que compreende o casal real, rei e rainha, que são os reprodutores primários, os indivíduos alados (imagos) e seus precursores, as ninfas (ROISIN, 2000). Além destes indivíduos, uma colônia de cupins pode apresentar reprodutores de substituição, que são os indivíduos que iniciam suas vidas reprodutivas associados aos companheiros de ninho natal (MYLES, 1999). Reprodutores de substituição são indivíduos que amadureceram o aparelho reprodutor antes de alcançarem a idade adulta e são denominados reprodutores neotênicos. Estes reprodutores podem ser derivados de ínstaes ninfais ou de operários. Nos Termitidae, quando eles são derivados de ninfas, são denominados neotênicos ninfoides e quando derivam de operários recebem o nome de neotênicos ergatoides (KORB e HARTFELDER, 2008).

A região Neotropical abriga mais de 540 espécies de cupins (CONSTANTINO, 2014), distribuídas em 5 famílias. A família Termitidae compõe a maior parte das espécies existentes e é dominante em regiões tropicais (EGGLETON, 2011). Esta família é constituída por 7 subfamílias: Macrotermitinae, Sphaerotermitinae, Foraminitermitinae, Apicotermitinae, Syntermitinae, Termitinae e Nasutitermitinae. *Silvestritermes euamignathus* é uma espécie pertencente à subfamília Syntermitinae, que abrange 18 gêneros de cupins, dos quais 15 ocorrem no cerrado e são comumente denominados de “nasutos mandibulados” (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012; CONSTANTINO, 2015). *S. euamignathus* se caracteriza por construir ninhos em montículo, comuns em áreas de Cerrado (MATHEWS, 1977; DOMINGOS, 1985). Este cupim forma reprodutores neotênicos do tipo ninfoides, como reprodutores de substituição. Reprodutores deste tipo foram observados em ninhos coletados no campo (NOIROT, 1956; ARAUJO, 1958; NOIROT, 1969; GRASSÉ, 1982; COSTA-LEONARDO; BARSOTTI, SOARES, 1996; 1999) e após a retirada experimental da rainha (COSTA-LEONARDO; SOARES; BARSOTTI, 1998).

Os cupins da família Termitidae apresentam um padrão de desenvolvimento pós-embrionário do tipo bifurcado, no qual a partir do ovo emerge uma larva de 1º instar que ao sofrer muda pode originar uma larva de 2º instar que irá se desenvolver em um operário ou em um pré-soldado e posteriormente em soldado (linhagem áptera); ou pode originar uma ninfa de 1º instar que posteriormente irá sofrer mudas sucessivas e originar um reprodutor alado (linhagem imaginal) (MOURA et al., 2011; BARBOSA et al., 2012). De acordo com Haifig (comunicação pessoal), a espécie *S. euamignathus* apresenta 5 instares ninfais e 2 instares larvais, o mesmo padrão observado em *Silvestritermes holmgreni* (BARBOSA et al., 2012) e *Constrictotermes cyphergaster* (MOURA et al., 2011), ambos da família Termitidae.

A biologia reprodutiva dos insetos sociais tem sido muito estudada ao longo dos últimos anos, pois o modo de reprodução é um dos fatores que define as relações entre as castas dentro de uma mesma colônia (HARTKE e BAER, 2011). Contudo, os detalhes fisiológicos que envolvem a produção, transferência e estocagem de espermatozoides nos cupins têm recebido pouca atenção (DEAN e GOLD, 2004; RAINA et al., 2007; YE; JONES; AMMAR, 2009). Nas colônias de Isoptera os reis permanecem com a rainha e a cópula ocorre intermitentemente, sendo que em algumas espécies ocorrem ciclos de oviposição. A habilidade que os reis desses cupins têm em fornecer grandes quantidades de espermatozoides viáveis à rainha, ao longo de décadas é tão importante quanto o fato das fêmeas de alguns himenópteros serem capazes de

estocar espermatozoides do seu falecido par por um período de tempo similar (HARTKE e BAER, 2011). Contudo, apesar disso, o sistema reprodutor dos machos tem sido negligenciado quando comparado com aquele das rainhas.

Em vista do exposto, e visando compreender a participação dos diferentes machos na reprodução de *S. euamignathus* este estudo focou em uma detalhada análise morfológica e histoquímica das gônadas em machos reprodutores e seus precursores, a fim de elucidar o desenvolvimento do sistema reprodutor nesses insetos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cupins: neste estudo foram utilizados reprodutores alados (imagos), coletados em revoada, reis primários com 4 meses de idade obtidos de colônias de laboratório; reis primários e reis neotênicos ninfoides coletados de ninhos naturais de *Silvestritermes euamignathus* (Silvestri, 1901). Ninfas desta espécie foram coletadas de ninhos na natureza e classificadas em 5 instares, de acordo com análises morfométricas realizadas no laboratório de cupins (UNESP/Rio Claro). Estes reis neotênicos foram provenientes de um ninho desprovido de casal real primário e liderado por 31 fêmeas e 30 machos.

2.2. Formação de colônias no laboratório: reprodutores alados de *S. euamignathus* foram obtidos a partir de revoada de ninhos coletados na natureza e mantidos em laboratório. Estes indivíduos foram sexados sob estereomicroscópio e pareados para formação de colônias. Um total de 862 colônias foram iniciadas e mantidas em laboratório para obtenção de reis funcionais.

2.3. Morfologia do aparelho reprodutor: reprodutores alados de *S. euamignathus* foram dissecados em solução fisiológica para insetos e tiveram os órgãos genitais isolados sob estereomicroscópio. A seguir, cada órgão genital foi colocado individualmente em lâmina histológica, corado com uma solução aquosa de azul de metileno 1% e fotografado sob estereomicroscópio, com o auxílio do software Motic Image Plus 2.0 ML.

2.4. Histologia e histoquímica: as porções finais dos abdômens dos cinco diferentes instares de ninfas (N1-N5), dos reprodutores alados machos, dos reis de colônias laboratoriais com 4 meses de idade, dos reis primários de colônias naturais e dos reis neotênicos de *S. euamignathus* foram fixadas inteiras em FAA (álcool absoluto, ácido acético glacial, formoldeído 40%, na

proporção 3:1:1) por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, todos os materiais foram colocados em álcool e desidratados em uma bateria crescente de etanol (70 a 95%) tendo, cada banho, duração de 60 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de resina (Leica) de infiltração e mantidas por 7 dias em geladeira. Após essa etapa, os abdômens foram incluídos lateralmente em moldes especiais e preenchidos com historesina Leica® mais catalisador, para polimerização em estufa a 37° C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura com navalhas de tungstênio em micrótomo (Leica RM2245). As secções histológicas depois de coradas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio (Leica DM500/Leica ICC50), com o auxílio do software LAS v4.0 (Leica Application Suite v4). A tabela a seguir mostra as técnicas de coloração histológica e histoquímicas utilizadas para os diferentes machos analisados:

Tabela 1. Colorações utilizadas para observação do sistema reprodutor em *S. euamignathus*.

Reprodutores machos	Colorações		
	HE	PAS	XP
Ninfas	x		
Reprodutor alado	x	x	x
Rei 4 meses	x	x	x
Rei colônia natural	x	x	
Rei neotênico	x	x	x

*HE, hematoxilina-eosina; PAS, ácido periódico de Schiff; XP, xylidine-Ponceau; x, técnica desenvolvida.

- **Coloração com hematoxilina-eosina (HE):** as secções histológicas foram lavadas em água destilada por 1 minuto e posteriormente coradas com hematoxilina por 10 minutos. Em seguida, estas secções foram colocadas para reagir em água parada por 4 minutos e posteriormente coradas com eosina por 5 minutos (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Após este procedimento, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após secagem, as lâminas foram montadas em bálsamo e fotografadas em fotomicroscópio.

- **Identificação de polissacarídeos neutros com a coloração de ácido periódico de Schiff (PAS):** as secções histológicas foram banhadas em ácido periódico 0,4% por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada por cerca de 1 minuto e, posteriormente, coradas com reativo de Schiff por 60 minutos em local escuro. Após esse procedimento, as secções histológicas foram submetidas a três banhos de água sulfurosa por cerca de 3 minutos cada. Em

seguida, foram lavadas em água corrente por 20 minutos e as lâminas secas à temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram montadas em bálsamo e documentadas em fotomicroscópio. Este método evidencia os polissacarídeos neutros e as glicoproteínas, os quais se coram intensamente de vermelho-magenta e as glicosaminoglicanas, que aparecem coradas em púrpura (PEARSE, 1960; MELLO e VIDAL, 1980).

- **Deteção de proteínas totais (ácidas e básicas) com a coloração de xylidine-Ponceau (XP):** as secções histológicas foram coradas com xylidine-Ponceau por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram colocadas em tampão acetato de sódio (pH = 2,6) por 1 minuto, lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram montadas em bálsamo e posteriormente analisadas. Por este método, as proteínas coram-se em vermelho alaranjado (MELLO e VIDAL, 1980).

2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): os abdômens dos alados machos foram fixados em glutaraldeído 2,5%, pós-fixados em OsO₄ 1% e embebidos em resina epon Araldite. Os materiais foram incluídos em resina Epon pura e polimerizados a 60°C por 72 horas. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

3. RESULTADOS

O aparelho reprodutor em imagos machos de *Silvestritermes euamignathus* é constituído por dois testículos, dos quais partem dutos deferentes que, por sua vez, desembocam em um duto ejaculatório único (Figura 1). Os dutos deferentes, antes de alcançarem o canal ejaculatório, apresentam uma dilatação discreta que constitui as vesículas seminais (Figura 1B). O canal ejaculatório termina em um órgão copulador rudimentar, o pênis, que é projetado para o exterior pelo poro genital ou gonóporo. Este poro está localizado na membrana intersegmentar ventral, que fica entre o 9º e o 10º segmento abdominal.

Em todos os instares de ninfas, bem como nos alados e reis foi observado um par de testículos lobulados, localizados lateralmente ao tubo digestório na região dorsal do abdômen (Figura 2). Nas ninfas de 5º instar e nos reprodutores alados, os lóbulos testiculares, dutos deferentes e vesículas seminais são muito semelhantes em tamanho e desenvolvimento (Figuras 2A e 2B). Já nos reis neotênicos e nos reis primários de colônias naturais, o desenvolvimento dos testículos é bem mais evidente, ocupando praticamente todo o abdômen nestes últimos (Figuras 2C e 2D). Tanto nas ninfas, como em reprodutores alados e reis, os lóbulos testiculares são constituídos por um conjunto de túbulos seminíferos, os quais são mantidos juntos por uma cápsula envolvente, a bainha peritoneal (Figura 3).

Nos reprodutores alados, assim como nas ninfas de todos os instares, foi difícil a contagem do número de lóbulos testiculares, uma vez que os testículos estavam pouco desenvolvidos e os túbulos compactamente agrupados (Figuras 3A-F). Apesar disso, pôde-se observar que gradativamente os túbulos vão se descompactando com a evolução dos instares ninfais (Figuras 3A-E). Os três reprodutores funcionais de *S. euamignathus* mostraram diferenças no desenvolvimento do aparelho reprodutor quando foram comparados entre si, ou seja, reis primários provenientes de colônias de laboratório em relação aos reis primários e reis neotênicos, ambos coletados na natureza (Figuras 3G-I). Nos reis de 4 meses, os lóbulos ainda

se assemelham aos dos reprodutores alados, não sendo possível distinguir o número de lóbulos em cada testículo, já que ainda se apresentaram muito compactados (Figura 3G). Contudo, nos reis primários de colônias naturais (Figura 3H) e nos reis neotênicos, também de colônias naturais (Figura 3I), os lóbulos estavam perfeitamente separados, maiores e em forma de dedos, sendo possível observar de 7 a 10 lóbulos nas secções histológicas dos primeiros.

Cada lóbulo testicular, do ápice à base, é formado por uma série de zonas nas quais, as células germinativas arranjadas em grupos ou cistos estão em estágios progressivos de desenvolvimento, de espermatogônia a espermatozoide e separados um do outro pela bainha peritoneal. Além disso, pode-se notar que em cada cisto todas as células germinativas encontram-se num mesmo estágio de desenvolvimento e que diferem de acordo com a fase de vida dos machos (Figura 3). Nos cistos de reprodutores alados machos e reis primários, bem como de ninfas a partir do 3º ínstar, pode-se observar diferentes fases da espermatogênese (Figuras 3C-I). Nos reis primários e neotênicos (Figura 3H e 3I), os lóbulos de tamanho avantajado permitiram uma boa visualização das fases da espermatogênese.

Na região apical dos túbulos seminíferos dos reprodutores machos pode ser vista uma massa de células pequenas, irregulares, geralmente achatadas, entre as quais podem ser observadas células se dividindo com frequência (Figura 3F). A aparência geral dessa região pode ser comparada ao germário das fêmeas e abaixo da referida região podem ser observadas células arredondadas com núcleos também redondos, que estão arranjadas em grupos ou cistos e apresentam um estágio de desenvolvimento semelhante, como pode ser observado com facilidade nos reprodutores neotênicos (Figura 3I). Já na região basal, são observadas células cuja cromatina apresentou arranjos típicos de divisão meiótica, além de espermatozoides (Figura 3H). Em *S. euamignathus*, os espermatozoides são arredondados, não flagelados e apresentam um diâmetro médio de 2-3 µm.

Nos cupins ocorre um significativo aumento dos testículos após a maturidade, fato este que pode ser observado acompanhando o desenvolvimento dos testículos nas ninfas de diferentes instares (Figuras 3A-E) e quando se observam os testículos de reprodutores alados e reis (Figuras 3F-I).

Além do aumento dos testículos, o aparelho reprodutor de *S. euamignathus* como um todo sofre um aumento de tamanho desde a ninfa de 1º ínstar até a de 5º ínstar (Figuras 3A-E). A diferenciação dos túbulos seminíferos começa a acontecer a partir da ninfa de 3º ínstar, a qual já apresenta um início de diferenciação das células dentro dos cistos, enquanto nas ninfas de 1º e 2º ínstar, são observadas apenas espermatogônias (Figuras 3A e 3B). Nos testículos das ninfas

de 4º e 5º instar puderam ser observados muitos cistos com células em diferentes fases da espermatogênese em seu interior, especialmente nas ninfas de 5º instar (Figuras 3D e 3E). Além disso, estas ninfas de 5º instar já apresentavam a espermatogênese completa, podendo ser observados espermatozoides no interior de alguns cistos, ainda que em pequena quantidade (Figura 3E).

Partindo dos testículos em direção ao ducto ejaculatório, encontram-se os ductos deferentes, que em reprodutores alados de *S. euamignathus* apresentaram-se curtos e calibrosos, tendo em média 0,57 mm de comprimento e 0,07 mm de largura. Os ductos deferentes de reprodutores alados de *S. euamignathus* correspondem a tubos formados por um tecido epitelial colunar simples, circundados por uma camada externa de musculatura. Os ductos deferentes são pares e partem dos testículos lateralmente no sentido dorso-ventral até a base do 9º esternito.

Continuando em direção ao ducto ejaculatório observam-se as vesículas seminais, que nesta espécie correspondem a dilatações da porção final dos ductos deferentes (Figura 4). Internamente, as vesículas são revestidas por um epitélio simples colunar com bordo em escova e, externamente, também são estruturas revestidas por musculatura. Este é o padrão histológico encontrado nas vesículas seminais desde ninfas até reis mais velhos, contudo, o que muda é a quantidade de espermatozoides encontrada no interior destas estruturas, que em reis de colônias naturais era abundante, enquanto apenas uns poucos espermatozoides podem ser observados em ninfas de 5º instar. Nas ninfas de 1º a 4º instar (Figuras 4A e 4B), as vesículas seminais estão num estágio inicial de desenvolvimento, com uma luz muito diminuta ou quase inexistente. Já as ninfas de 5º instar, apesar de apresentarem uma luz vesicular ainda pequena em comparação aos reprodutores, já mostram alguns espermatozoides dispersos no lúmen (Figura 4C). Contudo, reis provenientes de colônias naturais apresentaram uma quantidade imensa de espermatozoides no lúmen de suas vesículas seminais (Figuras 4F), enquanto nos alados e reis de laboratório essa quantidade foi um pouco menor (Figuras 4D e 4E) e nos reis neotênicos, menor ainda (Figura 4G).

A análise das secções histológicas após o teste histoquímico de PAS não mostrou marcação no lúmen das vesículas seminais em nenhum dos reprodutores analisados, o que sugere que a secreção dessa estrutura não contém polissacarídeos neutros (Figuras 5A-D). Adicionalmente, o teste histoquímico de xylydine-Ponceau mostrou uma secreção proteica presente em vesículas seminais de reprodutores alados, enquanto em reis de 4 meses de idade, foram observados apenas espermatozoides no lúmen das vesículas (Figuras 5E-F).

Nos reprodutores estudados de *S. euamignathus*, o canal ejaculatório apresentou uma camada simples de células epiteliais envolta por uma camada muscular (Figura 6). O canal ejaculatório é formado pela junção dos dois dutos deferentes em um ducto mediano e sua parte terminal forma um pênis membranoso. O pênis dos reprodutores de *S. euamignathus* estudados é um órgão retrátil, de tamanho reduzido e formado, como já relatado, pela porção final do canal ejaculatório (Figura 6A).

A ultraestrutura do testículo mostrou um cisto contendo espermatócitos I (Figura 7A). Estes espermatócitos mostraram numerosas mitocôndrias localizadas no pólo apical e muitos ribossomos livres dispersos no citoplasma, bem como estruturas multilamelares similares a lisossomos (Figura 7B). Uma visão geral da vesícula seminal mostrou o epitélio simples envolvido por uma musculatura visceral espessa (Figura 7C). Além disso, as células epiteliais apresentaram envoltório nuclear com superfície irregular, bem como junções septadas aderindo células vizinhas (Figuras 7D e 7E). No lúmen da vesícula seminal dos reprodutores alados podem ser observados espermatozoides e células sexuais degenerativas, provenientes dos testículos (Figura 7F). Os espermatozoides são esféricos, fortemente eletrondensos e podem apresentar regiões eletronlúcidas no núcleo, o qual também é esférico (Figura 7F). As células sexuais degenerativas são maiores em tamanho do que os espermatozoides e sempre apresentam um núcleo eletrondenso circundado por regiões eletronlúcidas (Figura 7F).

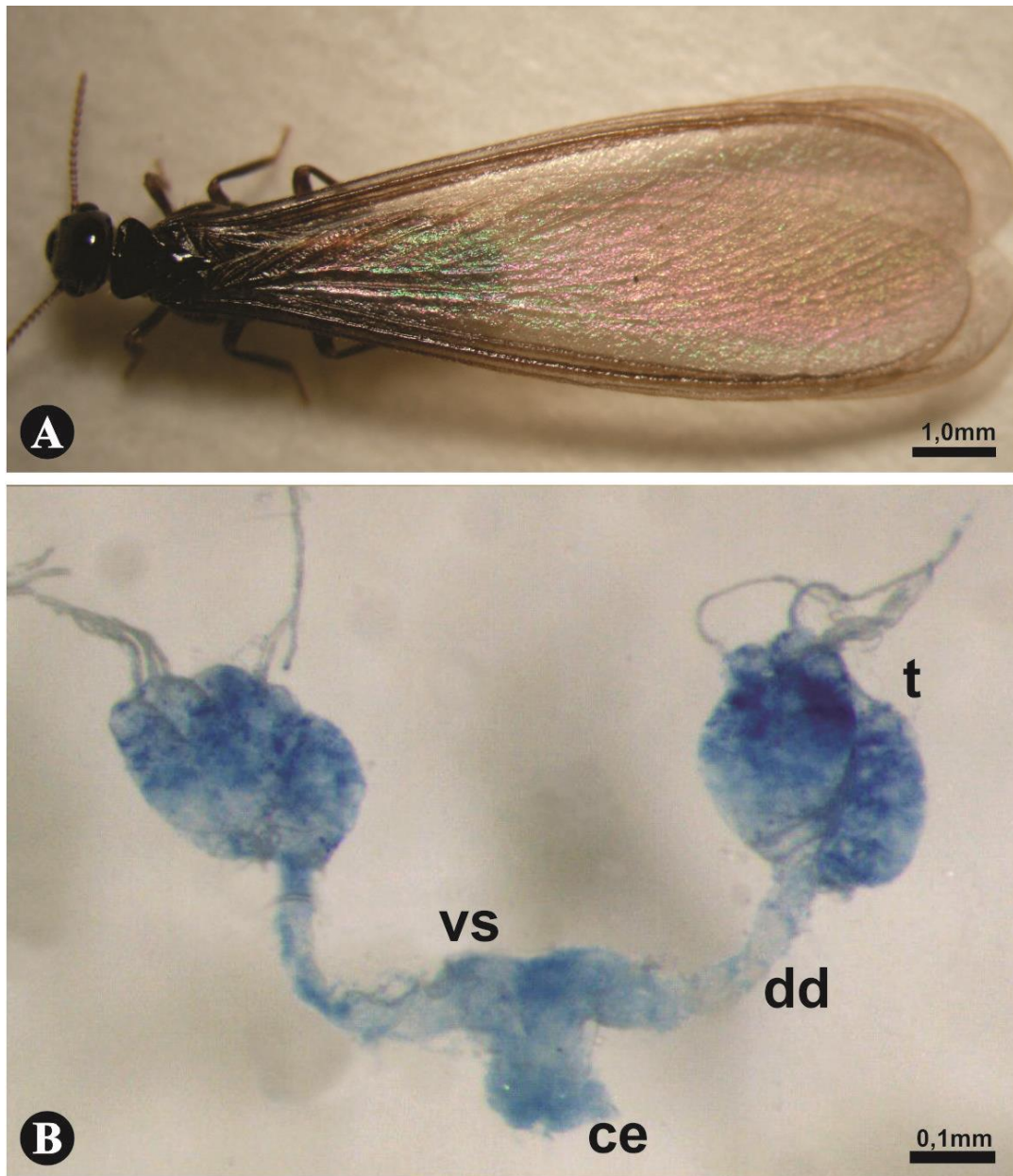


Figura 1. A. Imago macho (reprodutor alado) de *Silvestritermes euamignathus*. B. Aparelho reprodutor de um imago macho de *S. euamignathus*. Coloração: azul de metileno. **ce**, canal ejaculatório; **dd**, ducto deferente; **t**, lóbulos testiculares; **vs**, vesícula seminal.

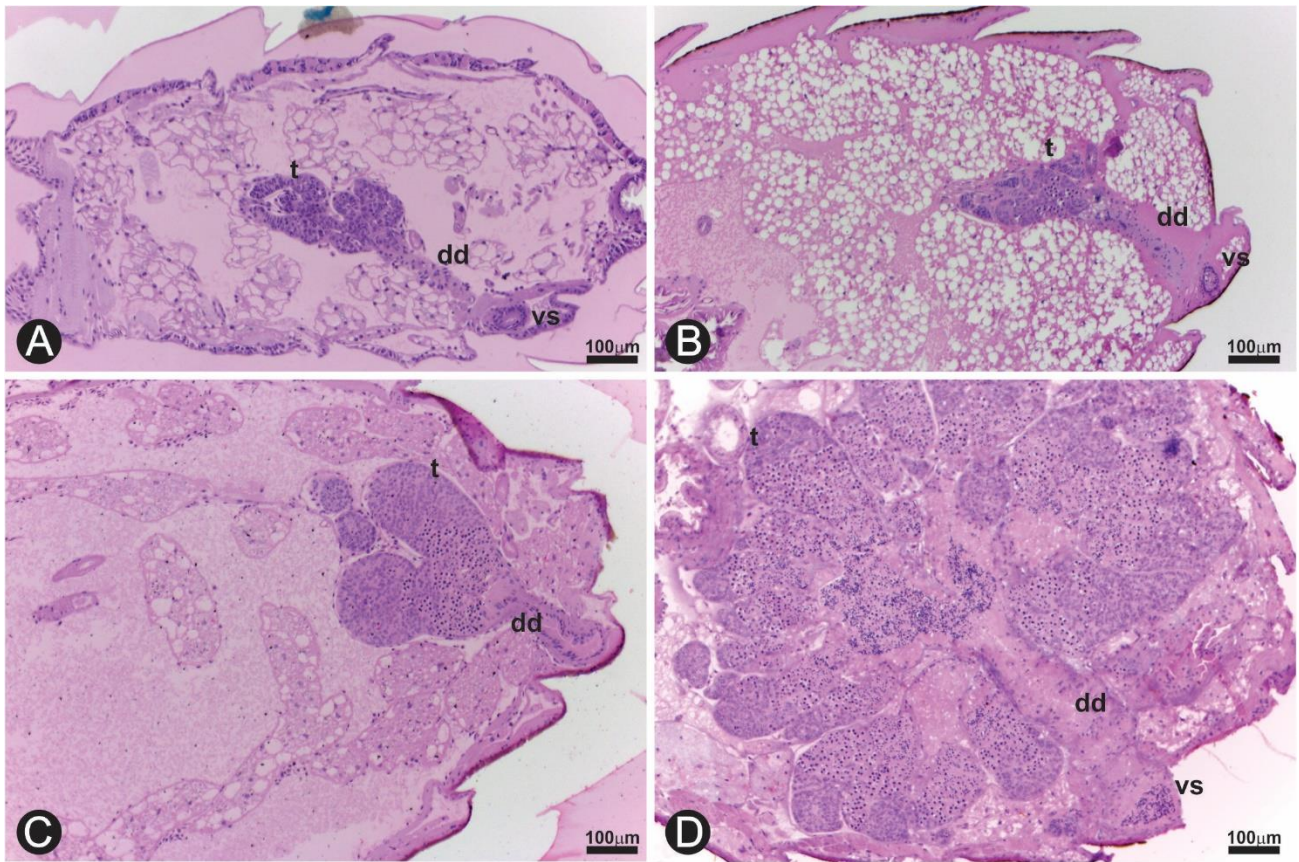


Figura 2. Vista geral do aparelho reprodutor em machos de *Silvestritermes euamignathus* em secção longitudinal lateral. **A.** Ninfa macho de 5º instar. **B.** Reprodutor alado (imago). **C.** Rei neotênico. **D.** Rei primário proveniente de uma colônia natural. Coloração: hematoxilina-eosina. **dd**, ducto deferente; **t**, lóbulos testiculares; **vs**, vesícula seminal.

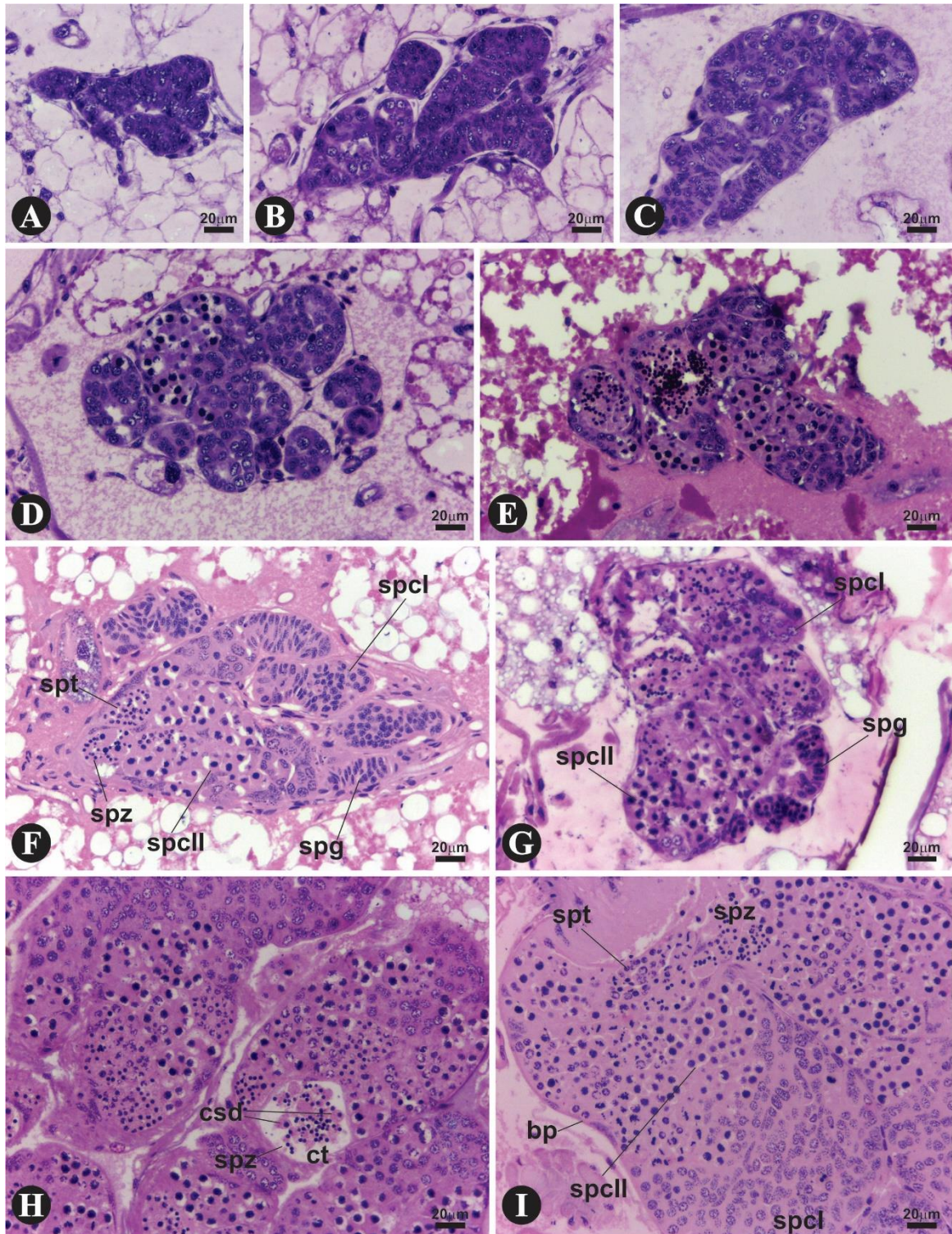


Figura 3. Lóbulos testiculares em machos de *Silvestritermes euamignathus*. **A.** Ninfa de 1º ínstar. **B.** Ninfa de 2º ínstar. **C.** Ninfa de 3º ínstar. **D.** Ninfa de 4º ínstar. **E.** Ninfa de 5º ínstar. **F.** Reprodutor alado (imago). **G.** Rei primário com 4 meses de idade (colônia de laboratório). **H.** Rei primário de colônia natural. **I.** Rei neotênico de colônia natural. Coloração: hematoxilina-eosina. **bp**, bainha peritoneal; **csd**, células sexuais degenerativas; **ct**, câmara terminal; **spg**, espermatogônias; **spcl**, espermatócito I; **spcll**, espermatócito II; **spt**, spermátide; **spz**, espermatozoides.

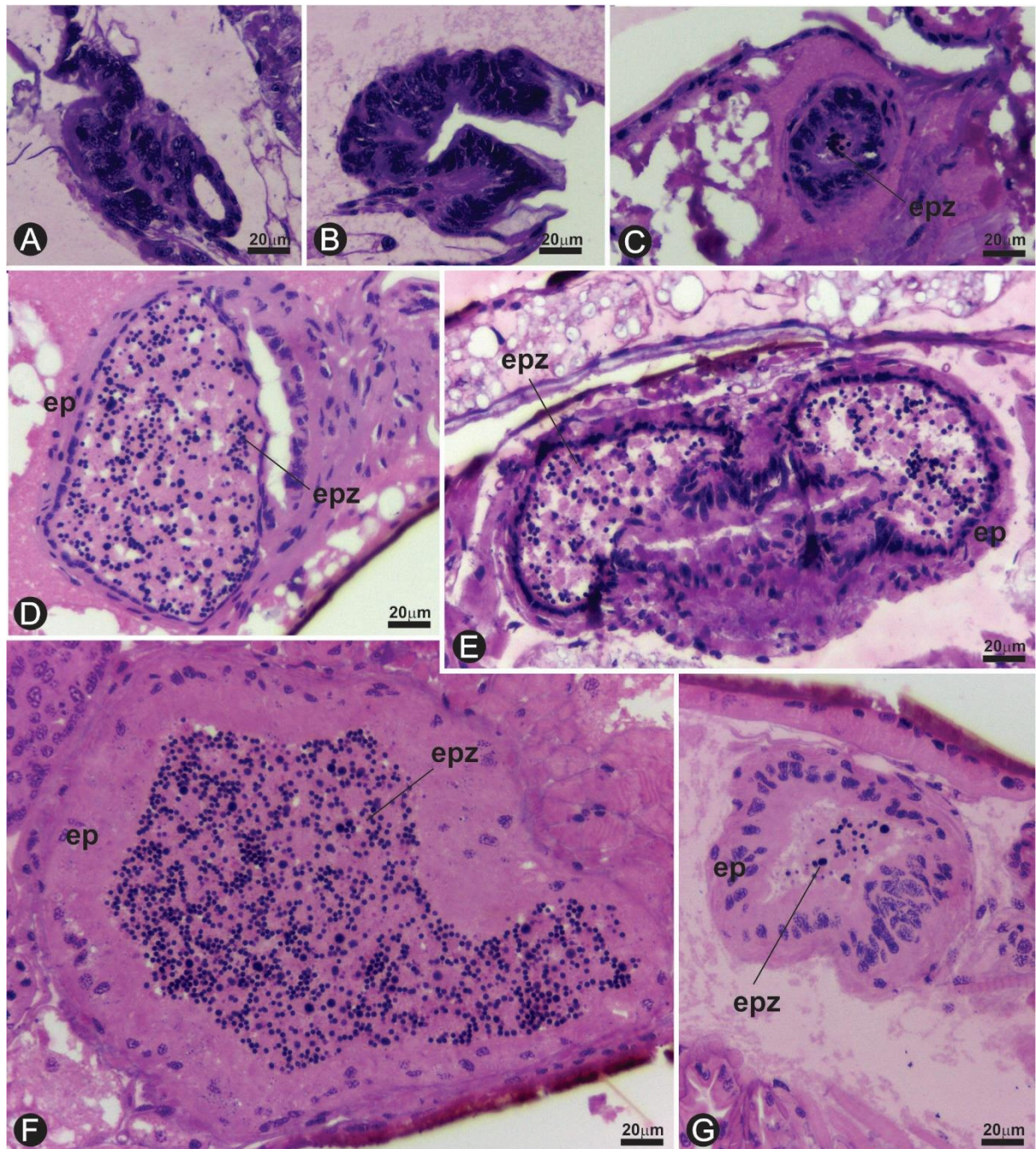


Figura 4. Vista geral da vesícula seminal em machos de *Silvestritermes euamignathus*. **A.** Ninfa de 2º instar. **B.** Ninfa de 3º instar. **C.** Ninfa de 5º instar. **D.** Reprodutor alado (imago). **E.** Rei primário com 4 meses de idade (colônia de laboratório). **F.** Rei primário de colônia natural. **G.** Rei neotênico de colônia natural. Coloração: hematoxilina-eosina. **ep**, epitélio vesicular; **epz**, espermatozoides.

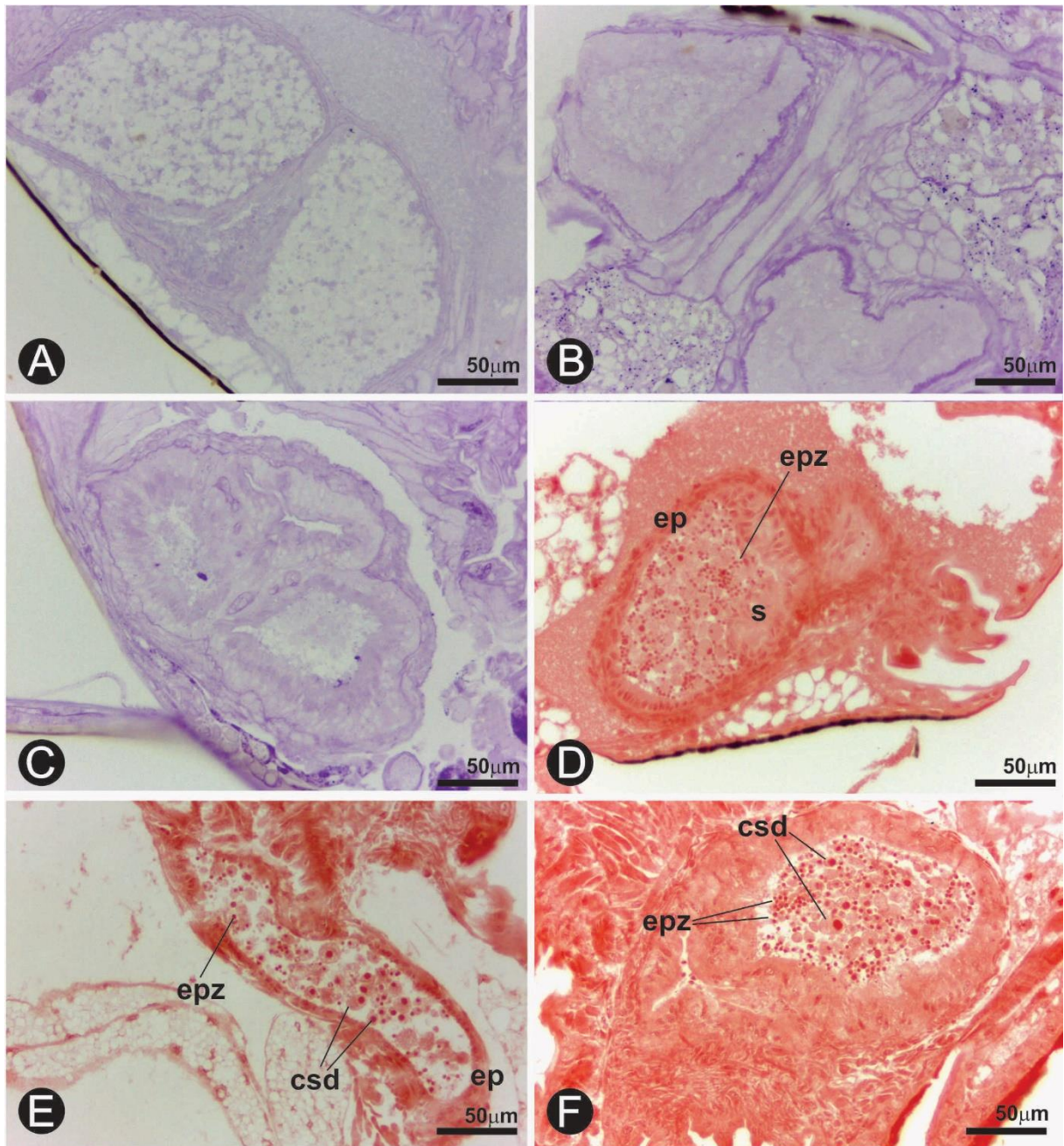


Figura 5. Vesículas seminais em machos de *Silvestritermes euamignathus*. **A.** Reprodutor alado (imago). **B.** Rei primário de colônia natural. **C.** Rei neotênico de colônia natural. Coloração: PAS. **D.** Reprodutor alado. **E.** Rei primário com 4 meses de idade (colônia de laboratório). **F.** Rei neotênico de colônia natural. Coloração: XP. **csd**, células sexuais degenerativas; **ep**, epitélio vesicular; **epz**, espermatozoides; **s**, secreção vesicular.

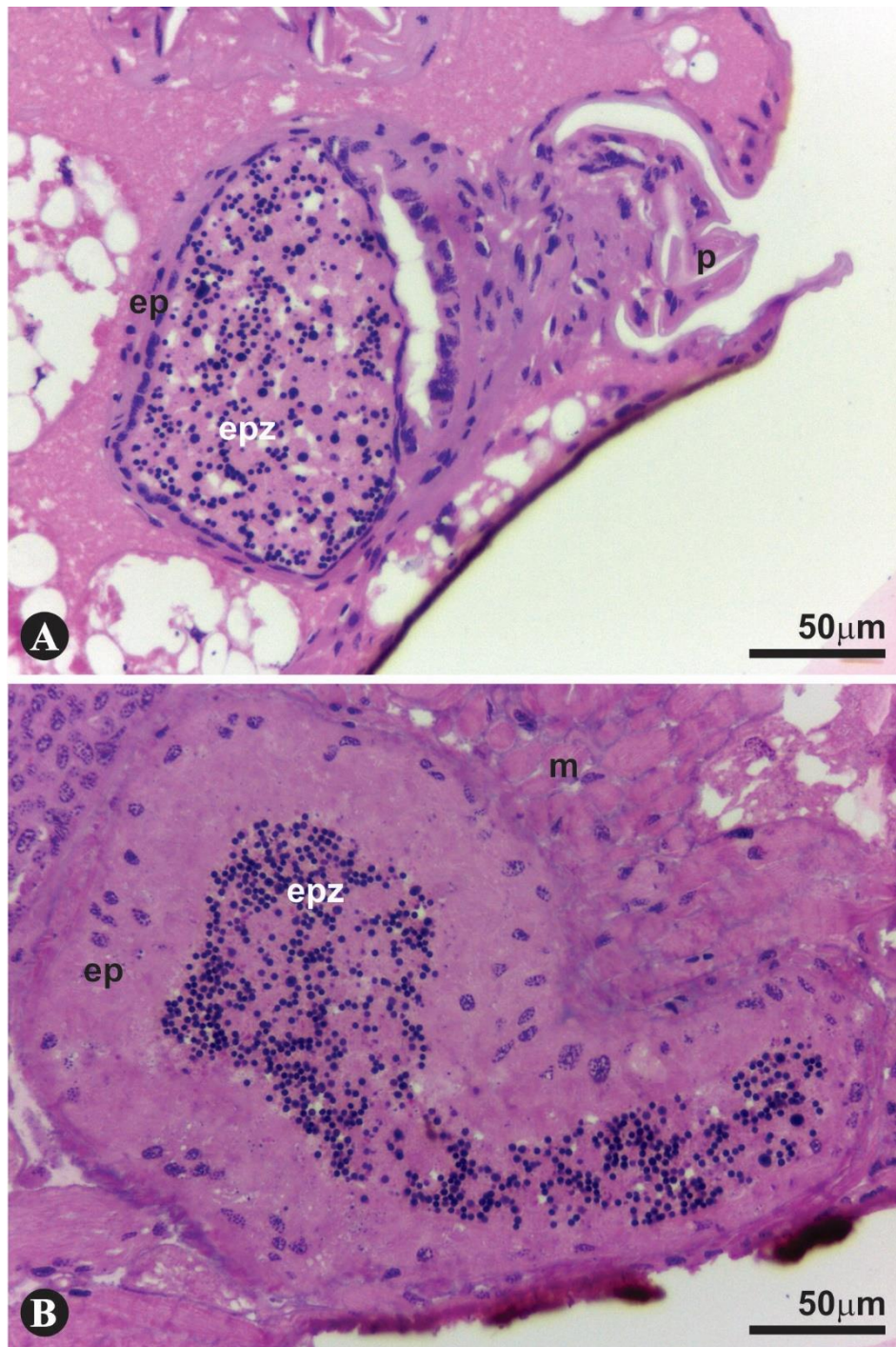


Figura 6. Vista geral do canal ejaculatório em machos de *Silvestritermes euamignathus*. **A.** Reprodutor alado (imago); **B.** Rei primário de colônia natural. Coloração: hematoxilina-eosina. **ep**, epitélio do canal ejaculatório; **epz**, espermatozoides; **p**, pênis.

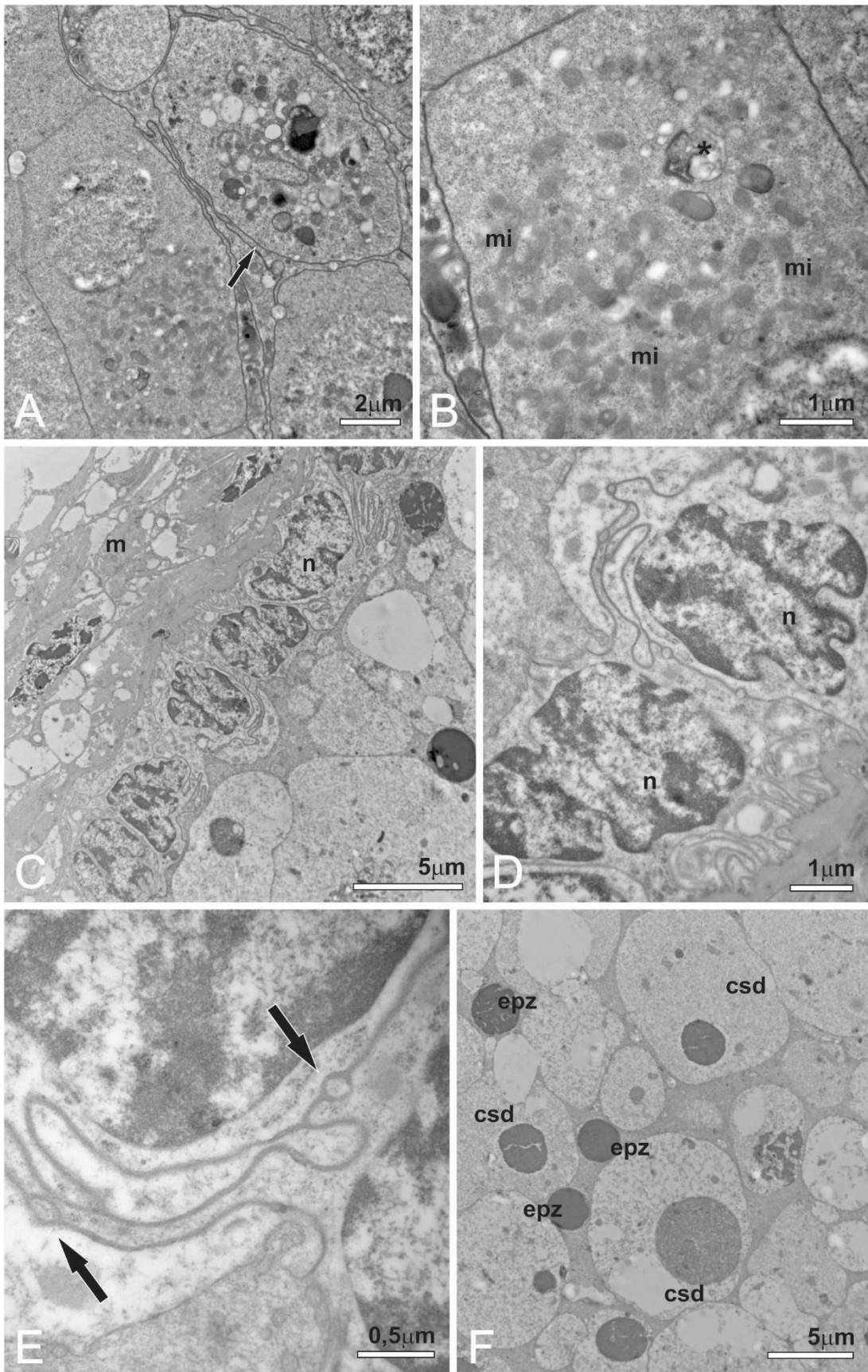


Figura 7. Ultraestrutura dos testículos e vesícula seminal de *Silvestritermes euamignathus*. **A.** Espermátocitos I envolvidos por bainha peritoneal (**seta**). **B.** Observar muitas mitocôndrias (**mi**) dispersas no citoplasma de um espermátocito I e uma estrutura multilamelar (*) similar a um lisossomo. **C.** Vesícula seminal evidenciando um epitélio simples envolvido por musculatura (**m**) visceral espessa. **D.** Núcleos (**n**) de duas células epiteliais. Observar o envoltório nuclear com uma superfície irregular. **E.** Junções septadas (**setas**) entre duas células epiteliais. **F.** Lúmen da vesícula seminal contendo células sexuais degenerativas (**csd**) e espermatozoides (**epz**).

4. DISCUSSÃO

De uma maneira geral, o sistema reprodutor do macho de um reprodutor funcional de cupim é comparável aquele dos himenópteros (ALFORD, 1975; HÖLLDOBLER e BARTZ, 1985; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; DUVOISIN; BAER; SCHMID-HEMPEL, 1999; BAER, 2005) e de outros insetos sociais (SIMMONS, 2001). As principais funções do aparelho reprodutor do macho são a produção e estocagem de espermatozoides e o transporte destes em um estado viável para o aparelho reprodutor feminino. Em reis de *Silvestritermes euamignathus* foram observados de 7 a 10 lóbulos por testículos, número correspondente ao encontrado por outros autores para espécies da família Termitidae. Godoy e Torales (2000) encontraram de 6 a 10 lóbulos testiculares em machos de *Termes saltans*, enquanto Weesner (1955) contou de 6 a 8 lóbulos para os machos de *Tenuirostritermes tenuirostris* e N'Diaye (1977) reportou ter observado de 4 a 12 lóbulos nos machos de *Cubitermes fungifaber*. Além disso, *S. euamignathus* segue um padrão de formação do ducto ejaculatório e pênis, semelhante ao descrito para o cupim *C. fungifaber*, sendo que ninfas de 3º instar já mostram células diferenciadas nos lóbulos testiculares. Porém, diferentemente do que acontece com a maioria dos machos de Hymenoptera cujos testículos atrofiam após atingirem a idade adulta (HÖLLDOBLER e BARTZ, 1985), nos machos de cupins o aparelho reprodutor apresenta um desenvolvimento progressivo em tamanho e número de espermatozoides produzidos (SIEBER e LEUTHOLD, 1982), atingindo seu ápice em reis de *S. euamignathus* de colônias naturais com idade avançada.

Sieber e Leuthold (1982), com base na análise do conteúdo intestinal, sugeriram que durante a transformação dos reis, os machos passam por uma mudança na alimentação que influenciaria o crescimento dos testículos, até a sua hipertrofia, no caso de colônias maduras. Isto porque no início da colônia, os reprodutores se alimentam sozinhos e em colônias maduras recebem apenas saliva dos operários. Além disso, de acordo com a idade da colônia, a

quantidade de esperma necessária para a fertilização dos ovos que são depositados pelas rainhas pode variar.

Em *S. euamignathus*, os lóbulos testiculares tanto de ninfas, como de reprodutores alados ou reis, parecem estar completamente separados uns dos outros, assim como ocorre em díptera e em alguns ortópteros, nos quais os testículos consistem de estruturas individuais, conectadas ao ducto deferente (CHAPMAN, 1998). De acordo com Weesner (1969), na porção apical dos lóbulos testiculares podem ser observadas as espermatogônias, células geralmente achatadas que estão em divisão. Logo abaixo dessa região, também são observadas células arredondadas, com material genético começando a se condensar, que são conhecidas como espermatócitos I e, na região basal, estão as células com núcleos típicos de divisão celular, os espermatócitos II. Na ultraestrutura, os espermatócitos I são caracterizados pela grande quantidade de corpos multivesiculares e multilamelares eletrondenso, além de muitos agrupamentos mitocondriais. Estas características também foram observadas por Grandi (1992) em *Kaloterme flavicollis*. Os espermatócitos II originam as espermatídes, que por sua vez, vão originar os espermatozoides. Em *S. euamignathus*, os espermatozoides são arredondados e não são flagelados. A ocorrência de espermatozoides não flagelados é comum na maioria dos cupins, como por exemplo na espécie *K. flavicollis* e *Reticulitermes lucifugus* (BACCETTI et al., 1974), enquanto nos cupins mais basais como *Mastoterme darwiniensis*, ocorrem espermatozoides móveis e com flagelo único (BACCETTI e DALLAI, 1978; DALLAI, 2014).

A vesícula seminal de *S. euamignathus* é de fato uma vesícula seminal e não apenas uma porção do ducto deferente, como questionado. Ela emerge da região final dos ductos deferentes, mas se caracteriza como uma estrutura que em reis de colônias naturais é mais desenvolvida do que nos reprodutores alados, além de possuir uma quantidade muito superior de espermatozoides em seu lúmen. Os resultados obtidos para *S. euamignathus* mostraram que a secreção das vesículas seminais não contém polissacarídeos neutros em nenhum dos reprodutores avaliados, mas mostraram uma secreção proteica em reprodutores alados que desapareceu em reprodutores primários e reis neotênicos. Provavelmente esta mudança na secreção vesicular esteja relacionada à produção de espermatozoides pelos reis funcionais, mostrando a importância das vesículas seminais durante o período que antecede a reprodução na colônia, ou seja, nos imagos (ARAÚJO et al., 2005). A ultraestrutura da vesícula mostrou um epitélio com alta atividade secretora uma vez que os núcleos apresentaram muitas invaginações e uma luz preenchida por espermatozoides esféricos, similares aos encontrados em *Reticulitermes* (BACCETTI, 1979) e *Coptoterme gestroi* (Capítulo II). Baccetti et al.

(1981) examinou várias espécies de Termitidae, entre elas: *Macroteres sp.* e *Trinervitermes dispar*. Estes dados mostram que as famílias Rhinotermitidae e Termitidae apresentam a mesma estrutura de espermatozoide, como sugerido por Baccetti et al. (1981).

Em geral, as descrições do sistema reprodutor do macho em Termitidae são limitadas aos imagos. Godoy e Torales (2000) descreveram para os reis de *T. saltans* um notável alargamento dos órgãos reprodutivos, fato observado também nos reis de *S. euamignathus*. Esta constituição básica do aparelho reprodutor masculino em *S. euamignathus* é a mesma dos insetos em geral, com exceção, que para a maioria deles, ocorrem ainda glândulas acessórias que variam em número e que se abrem nos dutos deferentes ou no ducto ejaculatório (CHAPMAN, 1998). Em *Apis mellifera* essas glândulas correspondem às glândulas de muco, originadas por divertículos dos dutos deferentes, tendo a função de obliterar o trato genital feminino, impedindo o refluxo de sêmen (CRUZ-LANDIM, 2008). Assim como na maioria dos himenópteros, a fundação da colônia nos cupins ocorre após a dispersão dos reprodutores alados (NUTTING, 1969). Contudo, enquanto na maioria dos himenópteros sociais recém inseminados as fêmeas fundam novas colônias sozinhas, os cupins iniciam uma nova colônia com um casal real, o rei e a rainha, conhecidos como reprodutores primários. Estes reprodutores permanecem juntos dentro da colônia e se acasalam várias vezes no decorrer da vida destes indivíduos (NUTTING, 1969; SIEBER e LEUTHOLD, 1982). Durante este período, a rainha sofre fisogastria, passando por uma série de transformações importantes, das quais uma das principais modificações é o crescimento do sistema reprodutor (BORDEREAU 1982; GODOY e TORALES, 1994).

As modificações sofridas pelos machos desde a revoada até a maturidade são menos notáveis e os estudos atualmente disponíveis são escassos e incompletos, principalmente no que diz respeito aos reis neotênicos. Os dados morfológicos e histoquímicos permitem inferir que as vesículas seminais de reis de *S. euamignathus* funcionam mais como órgão de armazenamento de espermatozoides do que estruturas secretoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, D.V. 1975. **Bumblebees**. London: Davis-Poynter.

ARAÚJO, R.L. Contribuição à biogeografia dos térmitas de São Paulo, Brasil. Insecta-Isoptera. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, n.25, p.185-217, 1958.

ARAÚJO, V.A.; ZAMA, U.; NEVES, C.A.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Braz J Morphol Sci**. n.22, p.193-201, 2005.

BAER, B. Sexual selection in *Apis* bees. **Apidologie**. n.36, p.187-200, 2005.

BACCETTI, B.; DALLAI, R.; ROSATI, F.; GIUSTI, F.; BERNINI, F.; SELMI, G. The spermatozoon of Arthropoda. XXVI. The spermatozoon of Isoptera, Embioptera and Dermaptera. **Journal of Microscopie**. n.21, p.159-172, 1974.

BACCETTI B., DALLAI R.. The spermatozoon of Arthropoda XXIX. The multiflagelated spermatozoon in the termite *Mastotermes darwiniensis*. **Journal of Cell Biology**, n.76, p.569-576, 1978.

BARBOSA, J.R.C.; MOURA, F.M.S.; BANDEIRA, A.G.; VASCONCELLOS, A. Caste Differentiation Pathways in the Neotropical Termite *Armitermes holmgreni* (Isoptera: Termitidae). **Zoological Science**. v.29, n.11, p.738-742, 2012.

BORDEREAU, C. Ultrastructure of the fat body of the reproductive pair in higher térmites. **Journal of Morphology**. v.172, n.3, 313-322, 1982.

CHAPMAN, R.F. **The insects. Structure and function**. Cambridge University press, Cambridge, 770p., 1998

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **Journal of Applied Entomology**. n.126, p.355-365, 2002.

CONSTANTINO, R. **On-line Termites Database**. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.htm>>. Acesso em 15 dez 2014.

- CONSTANTINO, R. 2015. **Cupins do Cerrado**. Constantino, R. (1.ed). Rio de Janeiro, RJ. Technical Books Editora. 167pp.
- COSTA-LEONARDO, A.M.; BARSOTTI, R.C.; SOARES, H.X. Multiple nymphoid reproductives in the nests of the Neotropical termite, *Armitermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Sociobiology**, Chico, v.28, n.2, p.197-205, 1996.
- COSTA-LEONARDO, A. M.; SOARES, H. X.; BASORTTI, R. C. Response to orphaning in two Neotropical termites: *Armitermes euamignathus* and *Embiratermes festivellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n. 88, p. 109-114, 1998.
- COSTA-LEONARDO, A.M.; BARSOTTI, R.C.; SOARES, H.X. Morphology of the nymphoid replacement reproductives in the Neotropical termite *Armitermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Journal of Morphology**, Nova York, v. 239, n.2, p. 131-141, 1999.
- CRUZ-LANDIM, C. 2008. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. ed. São Paulo: Editora UNESP, v.1. 408 p.
- DALLAI, R. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. **Arthropod Structure & Development**. n.43, p. 257-290, 2014.
- DEAN, S.; GOLD, R. Sex ratios and development of the reproductive system in castes of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**. n.97, p.147-152, 2004.
- DOMINGOS, D.J. Densidade e distribuição espacial de ninhos de duas espécies de *Armitermes* (Isoptera, Termitidae) em cinco formações vegetais de cerrado. *Revista Brasileira de Biologia*. v.45, n.3, p.233-240, 1985.
- DUVOISIN, N.; BAER, B.; SCHMID-HEMPEL, P. Sperm transfer and male competition in a bumblebee. **Animal Behaviour**. n.58, p.743-749, 1999.
- EGGLETON, P. 2011. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. In: **Biology of Termites: A Modern Synthesis**. Bignell, D.E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds), Springer Press, Heidelberg, p.1-26.

GODOY, M.C.; TORALES, G.J.. Aportes al conocimiento del sistema reproductor de imagos y reinas de Termitidae Neotropicales (Isoptera: Nasutitermitinae y Termitinae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.39, n.2, p.3 – 27, 1994.

GODOY, M.C.; TORALES, G.J. Reproductive system of young male imagoes and kings of *Termes saltans* (Isoptera, Termitidae). **Sociobiology**. v.35, n.1, p.141-148, 2000.

GRASSÉ, P.P. **Termitologia**, Tome I. Masson, Paris, 1982

HARTKE, T.R.; BAER, B. The mating biology of termites: a comparative review. **Animal Behaviour**. v.82, n.5, 927-936, 2011.

HAYASHI, Y.; LO, N.; MIYATA, H.; KITADE, O. Sex-linked genetic influence on caste determination in a termite. **Science**. 318, 985-987, 2007.

HIGASHI, M.; ABE, T. 1997. **Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality**. p.83-112. In: Abe, T., Levin, S.A.; Higashi, M. (Eds.). *Biodeversity-an ecological perspective*. Springer-Verlag.

HÖLLDOBLER, B.; BARTZ, S.H. 1985. **Sociobiology of reproduction in ants**. In: Hölldobler, B.; Lindauer, M. (Eds.). *Experimental Behavioural Ecology and Sociobiology*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp.237–257

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. 1990. **The Ants**. Hölldobler, B.; Wilson, E.O. (Eds.). Springer Verlag, Berlin.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

KITADE, O.; HOSHI, M.; ODAIRA, S.; ASANO, A.; SHIMIZU, M.; HAYASHI, Y.; LO, N. Evidence for genetically influenced caste determination in phylogenetically diverse species of the termite genus *Reticulitermes*. **Biology Letters**, n. 7, p. 257-260, 2011.

KORB, J.; HARTFELDER, K. Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. **Biological Reviews**, n. 83, p. 295-313, 2008.

KRISHNA, K.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M. S. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 377, p. 2704, 2013.

- MAO, L.; HENDERSON, G. A case for a free-running circannual rhythm in soldier developmental time of Formosan subterranean termites. **Insectes Sociaux**. Paris, v.54, p.388-392, 2007.
- MATHEWS, A.G.A. 1977. **Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 267pp.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de biologia celular**. Rio de Janeiro: Edgard Blücher Ltda., 1980. 71p.
- MOURA, F.M.S.; VASCONCELLOS, A.; SILVA, N.B.; BANDEIRA, A.G. Caste development systems of the Neotropical termite *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae). **Insectes Sociaux**. n.58, p.169-175, 2011.
- MYLES, T.G. 1999. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. **Sociobiology**, Chico, v. 33, n. 1, p. 1-91, 1999.
- N'DIAYE, M.S. Le développement post-embryonnaire de l'appareil genital chez les sexués de *Cubitermes fungifaber* (Sjostedt) (Termitidae, Termitinae). **Insectes Sociaux**. v.24, n.1, p.37-60, 1977.
- NOIROT, C. Les sexués of remplacement chez les termites supérieurs (Termitidae). **Insectes Sociaux**. n.3, p.145-158, 1956.
- NOIROT, C. Glands and Secretions. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. (Eds.), **Biology of the Termites**, New York: Academic Press, v.1, p.89-123, 1969.
- NUTTING. 1969. **Flight and colony foundation**. In: Krishna, K.; Weesner, F. (Eds). **Biology of Termites**, vol. 1, pp. 233-282. Academic Press, New York.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 2 ed., London: J & A Churchill ltd., 1960, xiv+998p., 1960.
- RAINA, A.; MURPHY, C.; FLORANE, C.; WILLIAMS, K.; YONG IHL, P.; INGBER, B. Structure of spermatheca, sperm dynamics, and associated bacteria in Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, p.418-424, 2007.

ROCHA, M.M.; CANCELLO, E.M.; CARRIJO, T.F. Neotropical termites: revision of *Armitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae) and phylogeny of the Syntermitinae. **Systematic Entomology**. n.37, p.793-827, 2012.

ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T., BIGNELL, D. E., HIGASHI, M. (Eds.). **Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology**. London: Kluwer Academic Press, 2000. p. 95-119.

SIEBER, R.; LEUTHOLD, R.H. Development of physogastry in the queen of the fungus-growing termite *Macrotermes michaelseni* (Isoptera: Macrotermitinae). **Journal of Insect Physiology**. v.28, n.12, p.979-985, 1982.

SIMMONS, L.W. 2001. **Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insects**. Simmons, L.W. (Ed.) Princeton University Press, Oxford.

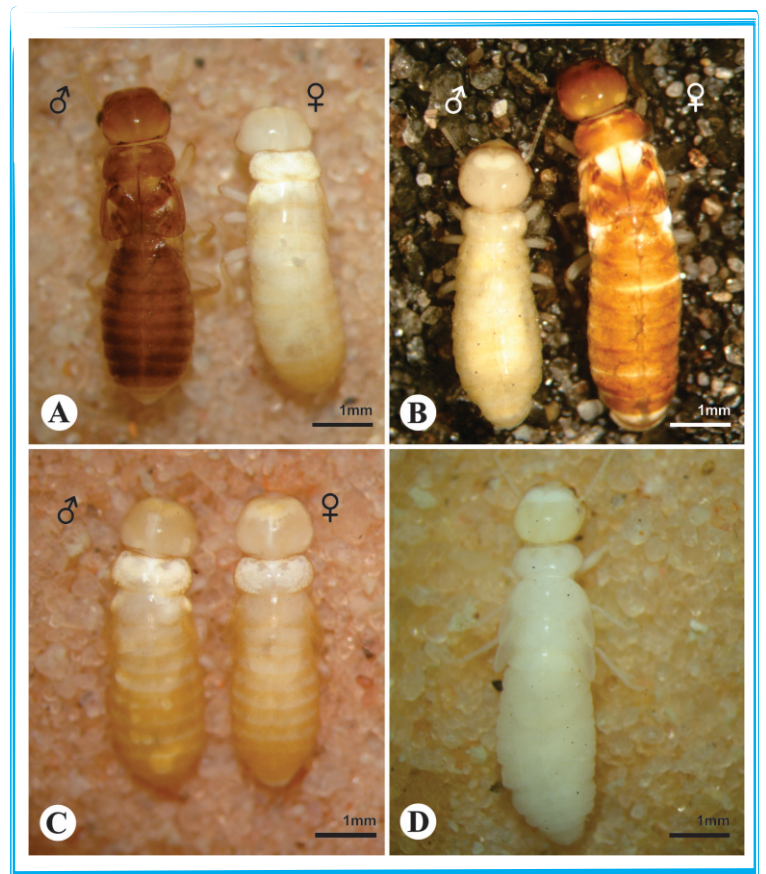
WEESNER, F.M. The reproductive systems of young primary reproductives of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). **Insectes Sociaux**. v.2, n.4, p.323-345, 1955.

WEESNER, F.M. 1969 External anatomy. In **Biology of termites**, vol.1 (ed. K. Krishna & F. M. Weesner), pp.19-47. New York: Academic Press. 598p.

YE, Y.; JONES, S.C.; AMMAR, E. Reproductive characteristics of imagos of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**. n.102, p.889-894, 2009.

Capítulo IV

Status reprodutivo e desenvolvimento do sistema reprodutor em neotênicos de Cryptotermes brevis (Isoptera, Kalotermitidae)



RESUMO

Os cupins da família Kalotermitidae são conhecidos como cupins de madeira seca e são caracterizados por formarem pequenas colônias no interior de madeiras que lhes servem de alimento e abrigo. Estes cupins apresentam um desenvolvimento muito flexível, no qual os falsos operários são totipotentes e podem originar reprodutores. O desenvolvimento pós-embrionário da linhagem imaginal dos Kalotermitidae geralmente é linear com 4 instares larvais e 3 ninfais. Neste estudo foram utilizadas três colônias de *Cryptotermes brevis* que apresentaram reprodutores neotênicos: colônia A com rei primário e rainha neotênica; Colônia B com rainha primária e rei neotênico; e colônia C, com rei e rainha neotênicos. Tanto o rei primário da colônia A e como o rei neotênico da colônia B, apresentaram um aparelho reprodutor bem desenvolvido, com lóbulos testiculares conspícuos e com cistos contendo espermatozoides, os quais também foram observados nas vesículas seminais de ambos os reprodutores. A rainha neotênica da colônia A e a rainha primária da colônia B possuíam ovários com ovócitos em vários estágios de desenvolvimento iniciais e alguns já vitelogênicos terminais. Os ovócitos vitelogênicos sugerem atividade poedeira, contudo o número e o tamanho dos ovócitos terminais na rainha neotênica foram superiores aqueles observados na rainha primária. No entanto, ambas apresentaram espermateca com luz repleta de espermatozoides e de tamanho similar. Já na colônia C, a rainha apresentou ovócitos vitelogênicos, porém não terminais e, na luz da espermateca, não foram observados espermatozoides e nem qualquer tipo de secreção. Já o rei neotênico, apesar de apresentar um aparelho reprodutor semelhante ao do rei neotênico da colônia B, não foram observados espermatozoides nas vesículas seminais e entre os testículos foi observado um ovócito em estágio II de desenvolvimento; mostrando que este indivíduo era um intersexo. Feminização em artrópodos pode ser explicada pela infestação de bactérias do gênero *Wolbachia*. Futuros estudos envolvendo técnicas moleculares poderão confirmar se a feminização ocorrida nestes kalotermitídeos podem ser resultantes da presença de *Wolbachia* conforme hipotetizado no presente estudo.

Palavras-chave: reprodutores neotênicos, intersexo, espermateca, vesícula seminal, *Wolbachia*.

1. INTRODUÇÃO

Na dispersão das espécies, as colônias maduras de cupins liberam reprodutores alados que vão fundar novas colônias. Estes novos ninhos são estabelecidos por um par de reprodutores alados que, após encontrarem um local adequado, dão início ao desenvolvimento da nova colônia. Estes reprodutores, ex-alados, que fundam esta nova colônia são conhecidos como reprodutores primários (NUTTING, 1969; COSTA-LEONARDO; BARSOTTI; SOARES, 1999).

Em Isoptera existe uma linhagem imaginal e uma linhagem áptera. A linhagem imaginal origina os reprodutores alados ou imagos e a linhagem áptera os operários e soldados. Dados da literatura disponíveis para a família Kalotermitidae mostram que o desenvolvimento pós-embrionário é linear, sendo que geralmente 3 instares ninfais são precedidos por 4 instares larvais em *Cryptotermes dudleyi* (NEOH e LEE, 2011); *Kalotermes flavicollis* (MAISTRELLO, OCETE, LÓPEZ, 2010); *Neotermes papua* (ROISIN e PASTEELS, 1991) e *Incisitermes schwarzi* (LUYKX, 1986).

Muitas espécies de cupins formam reprodutores de substituição após a morte ou senescência dos reprodutores primários. Os novos reprodutores se desenvolvem a partir de indivíduos que apresentam potenciais de desenvolvimento dentro de uma colônia, fato este, que garante a longevidade da colônia e aumenta o tempo de vida destes indivíduos (THORNE, 1984; 1985; ROISIN, 1990; LENZ e RUNKO, 1993). Estes reprodutores de substituição são denominados reprodutores neotênicos, pois chegam a fase reprodutiva sem passar pelo estágio de adulto alado (imago) e este fenômeno é conhecido como neotenia (GRASSÉ, 1982).

Nos “cupins superiores”, que incluem todos os representantes da família Termitidae, quando os neotênicos são derivados de ninfas, recebem o nome de ninfoides e, quando derivam de operários, são chamados de ergatoides. Já nos “cupins inferiores”, que englobam as demais famílias de Isoptera, os neotênicos são conhecidos como braquípteros quando se originam de ínstaes ninfais, ou ápteros, quando derivados de ínstaes larvais (KORB e HARTFELDER, 2008). Essa denominação de cupins “inferiores” ou “superiores” é uma classificação tradicional alternativa que se baseia no tipo de simbionte associado ao trato digestório desses insetos. Os cupins ditos superiores apresentam apenas bactérias como simbioses e constituem a família Termitidae, enquanto os cupins inferiores possuem bactérias e protozoários associados ao seu trato digestório e estão distribuídos nas outras oito famílias de Isoptera (THORNE, 1996; KORB e HARTFELDER, 2008).

Enquanto algumas colônias de Isoptera produzem apenas reprodutores de substituição no caso da morte da rainha e do rei primários, outras produzem grande quantidade de reprodutores suplementares, que também são neotênicos e complementam as atividades de reprodução do casal primário. Estes reprodutores suplementares são neotênicos que coabitam o ninho junto com o casal primário e geralmente assumem a reprodução nas estruturas conhecidas como ninhos satélites que estão ligados ao ninho principal. Desta forma, os neotênicos constituem um passo intermediário na substituição dos reprodutores (ROISIN, 2000). Roisin (1990) discute que os reprodutores de reposição correspondem a um sistema disponível mas com garantias de funcionalidade desconhecidas em relação àquelas dos reprodutores primários. Isto porque faltam avaliações das potencialidades e do “status reprodutivo” destes indivíduos, nas colônias para a maioria das espécies de Isoptera.

De acordo com Myles (1999), reprodutores neotênicos que estão sexualmente ativos dentro do ninho parental são encontrados em cerca de 62,7% dos gêneros de “cupins inferiores” enquanto nos “cupins superiores” esta porcentagem cai para 13,4%. Segundo Roisin e Pasteels (1990), apesar do potencial de vantagens, a ocorrência de neotenia é altamente variável entre os Isoptera e esta complexidade pode ser explicada em parte pela diversidade das estratégias para dispersão e reprodução das colônias e em parte pela delimitação evolutiva da neotenia em cupins “inferiores” e “superiores”.

Nos Kalotermitídeos não ocorrem operários verdadeiros e sim falsos operários ou “pseudergates”, que são um desvio no padrão de desenvolvimento linear ovo-imago, por meio

de mudas sucessivas, estacionárias ou regressivas, sendo este último tipo de muda exclusivo dos Isopetra (KORB e HARTFELDER, 2008). De acordo com Thorne (1996), ninfas de Kalotermitidae podem ser bastante flexíveis no seu desenvolvimento, mesmo os ínstares tardios e se diferenciam dos falsos operários por apresentarem broto alar, cujo tamanho varia de acordo com o instar ninfal. Em Termopsidae e Kalotermitidae, as ninfas realizam tarefas na colônia, enquanto em grupos que apresentam operários verdadeiros, elas trabalham pouco ou não trabalham (NOIROT e PASTEELS, 1987).

Espécies de Kalotermitidae possuem um desenvolvimento altamente flexível em respostas às condições ambientais e condições da colônia (ROISIN, 2000; KORB e LENZ, 2004; NEOH e LEE, 2011). Estudos experimentais com cupins desta família revelaram que a fusão de colônias vizinhas causa a morte dos reprodutores primários (rei e rainha) permitindo aos falsos operários a oportunidade de herdarem o ninho por meio do seu desenvolvimento em reprodutores de substituição neotênicos (KORB, 2011; LUCHETTI et al., 2013a). No kalotermitídeo *K. flavicollis*, Luchetti et al. (2013a) encontraram uma mistura genética extrema indicando que nesta espécie as famílias são mistas e constituídas por uma descendência de múltiplas rainhas neotênicas. Estes achados originam importantes questões sobre o modo de formação destas famílias mistas e do potencial reprodutivo dos diversos tipos de reprodutores.

De acordo com o número e a origem dos reprodutores presentes nas colônias de cupins, elas podem ser classificadas em três tipos: (1) famílias simples que apresentam um único par de reprodutores monogâmicos; (2) famílias estendidas, que possuem múltiplos neotênicos se reproduzindo, sendo que todos descendem do mesmo par real que iniciou a colônia e (3) famílias mistas, formadas por múltiplos neotênicos não aparentados, oriundos de mais de dois reprodutores primários diferentes (BULMER; ADAMS; TRANIELLO, 2001).

Como estudos sobre reprodutores neotênicos são escassos na literatura de Isoptera e com o intuito de suprir esta lacuna, o presente estudo objetivou comparar três diferentes colônias lideradas por pelo menos um reprodutor de substituição neotênico no kalotermitídeo *Cryptotermes brevis*, dando ênfase à morfologia do aparelho reprodutor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Colônias de laboratório: após a retirada de um dos reprodutores primários, as colônias de *Cryptotermes brevis* (Walker, 1853) coletadas em móveis infestados foram colocadas em cilindros (3,5 cm de diâmetro e 0,8 cm de altura) escavados em placas de madeira compensada de *Pinus* sp (11 x 11 x 0,4 cm). Após 3 meses, três colônias com reprodutores neotênicos foram escolhidas para o presente estudo (Tabela 1). Assim, estas colônias tiveram suas populações fixadas em FAA e, posteriormente, os reprodutores foram processados para histologia.

2.2. Histologia: os três casais de reprodutores de *C. brevis* foram fixados em FAA (álcool absoluto, ácido acético glacial, formoldeído 40%, na proporção 3:1:1) por 24 horas e desidratados em uma bateria de etanol (70, 80, 90 e 95%) tendo, cada banho, duração de 60 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de historesina Leica® de infiltração onde foram mantidas por 7 dias em geladeira. Após essa etapa, os abdômens destes insetos foram incluídos lateralmente em moldes especiais, preenchidos com historesina Leica® mais catalisador, para polimerização em estufa a 37° C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura com navalhas de tungstênio, em micrótomo (Leica RM 2245) e as secções histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). De acordo com a descrição a seguir:

- **Coloração com hematoxilina-eosina (HE):** As secções histológicas do abdômen dos reprodutores foram lavadas em água destilada por 1 minuto e posteriormente coradas com hematoxilina por 10 minutos. Em seguida, estas secções foram colocadas para reagir em água parada por 4 minutos e posteriormente coradas com eosina por 5 minutos (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Após este procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente e

mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após secagem, as lâminas foram montadas em bálsamo e as secções histológicas examinadas e fotografadas em fotomicroscópio (Leica DM500/Leica ICC50), com o auxílio do software LAS v4.0 (Leica Application Suite v4).

3. RESULTADOS

Os resultados do censo populacional das três colônias de *Cryptotermes brevis* (A, B e C) lideradas por pelo menos um reprodutor neotênico estão dispostos na tabela 1. As colônias A e B conservaram um dos reprodutores primários originais e produziram um único reprodutor de substituição. Estes reprodutores eram neotênicos braquípteros com sexo diferente do reprodutor original que foi conservado. Contudo, na colônia C, ambos os reprodutores de substituição eram neotênicos braquípteros. Estes reprodutores neotênicos braquípteros, derivados de ninfas, caracterizam-se externamente por apresentarem brotos alares e pigmentação diferenciada. Enquanto ninfas são indivíduos esbranquiçados, os reprodutores neotênicos de *C. brevis* são identificados por apresentarem o corpo amarelado e mandíbulas esclerotizadas (Figura 1). Adicionalmente, a análise do censo populacional das colônias mostrou que tanto a colônia A quanto a colônia B continham mais falsos operários do que ninfas, além de larvas e ovos, enquanto a colônia C, apesar de apresentar um número ligeiramente maior de ninfas, não possuía larvas e ovos, demonstrando que estes reprodutores estavam inativos na reprodução (Tabela 1).

Tabela 1. Censo populacional das colônias de *Cryptotermes brevis* lideradas por pelo menos um reprodutor neotênico.

Colônia	Reprodutor neotênico Nº/sexo	Rei/Rainha primários Nº/sexo	Reprodutores alados	Soldados	Falsos operários	Ninfas	Larvas	Ovos
A	01/♀	01/♂	0	01	50	04	03	04
B	01/♂	01/♀	0	01	44	02	02	01
C	02/♀/♂	0	0	0	27	06	0	0

Após a histologia do abdômen dos diferentes reprodutores foi constatado que tanto o rei primário da colônia A, como o rei neotênico da colônia B, tinham um aparelho reprodutor bem desenvolvido (Figuras 2A e 2B). Em ambos os reprodutores, os lóbulos testiculares estavam conspicuos e continham cistos com espermatozoides (Figuras 2C e 2D), os quais também estavam presentes nas vesículas seminais de ambos os reprodutores (Figuras 2E e 2F). Além dos espermatozoides, também foi observada na luz das vesículas seminais desses machos uma secreção de caráter básico e células sexuais degenerativas. Estas células se caracterizam por apresentarem um núcleo picnótico fortemente corado pela hematoxilina e um citoplasma com coloração levemente rosada, bastante clara.

A rainha neotênica da colônia A e a primária da colônia B tinham ovários com ovócitos em vários estágios de desenvolvimento iniciais e alguns já vitelogênicos (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D). Em ambas as rainhas foi possível observar ovócitos terminais, sugerindo atividade poedeira das mesmas nas respectivas colônias (Figuras 3C e 3D). Porém, na rainha neotênica, o número de ovariolos e o tamanho dos ovócitos terminais foram superiores aqueles observados na rainha primária. No entanto, as espermatecas de ambas as rainhas apresentaram um tamanho semelhante e sua luz estava repleta de espermatozoides e de uma secreção com aparência similar (Figuras 3E e 3F).

Na colônia C, que possuía dois reprodutores neotênicos, a rainha neotênica apresentou ovócitos vitelogênicos porém ainda não terminais (Figuras 4A e 4C). Na luz da espermateca desta fêmea não foram encontrados espermatozoides e nem observado qualquer tipo secreção (Figura 4E). O rei neotênico da colônia C apresentou um aparelho reprodutor com tamanho semelhante àquele do rei neotênico da colônia B (Figura 4B), com lóbulos testiculares bem desenvolvidos e contendo espermatozoides (Figura 4D). Contudo, por entre os lóbulos testiculares do rei neotênico da colônia C foi observada a presença de um ovócito no estágio II de desenvolvimento (Figura 5). Além disso, as vesículas seminais deste rei neotênico não continham espermatozoides (Figura 4F). Este indivíduo portanto foi considerado intersexo.

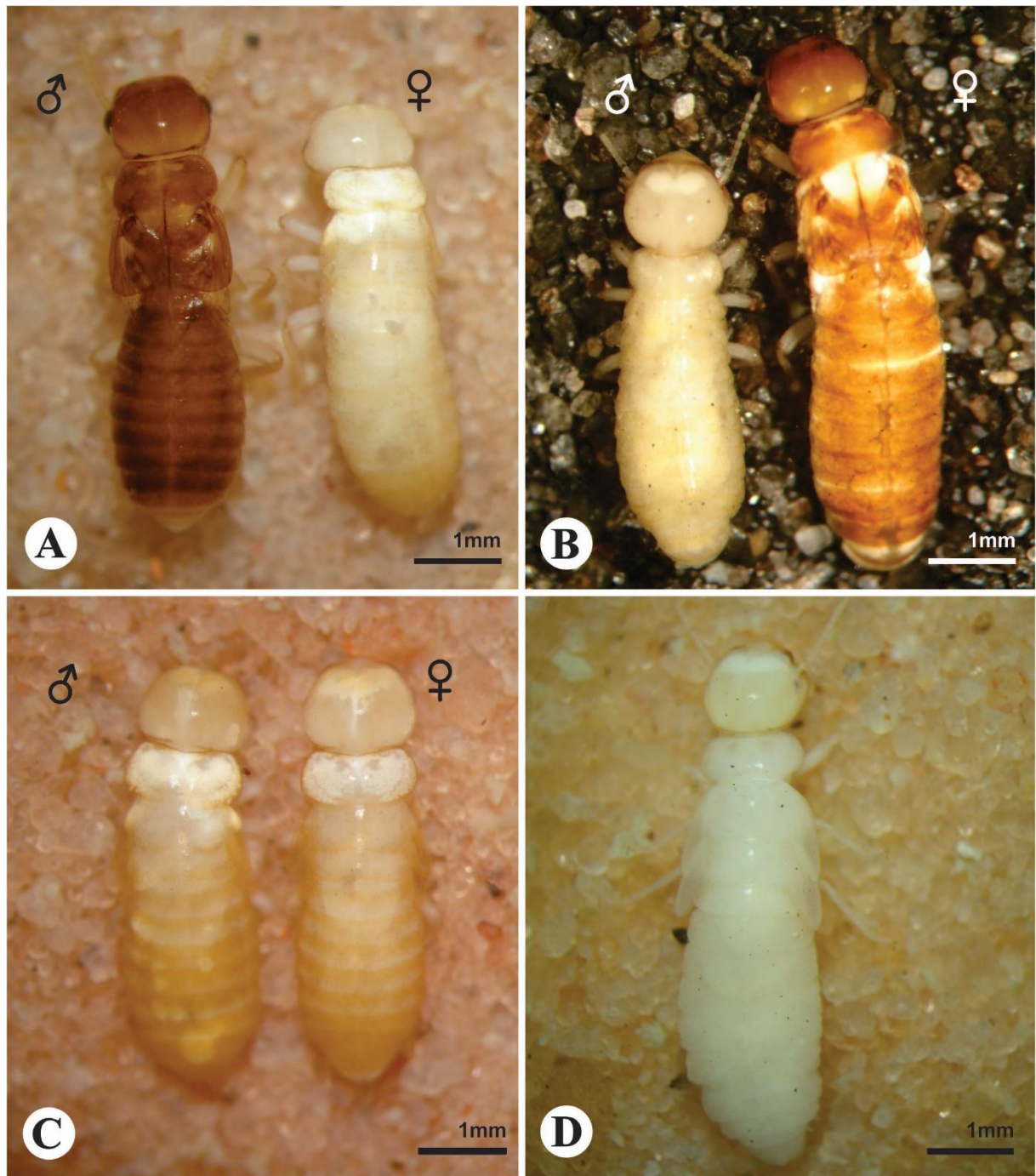


Figura 1. Ínstares e castas reprodutivas de *Cryptotermes brevis*. **A.** Rei primário e rainha neotênica da colônia A. **B.** Rainha primária e rei neotênico da colônia B. **C.** Rei e rainha neotênicos da colônia C. **D.** Ninfa macho de uma colônia coletada de madeira infestada.

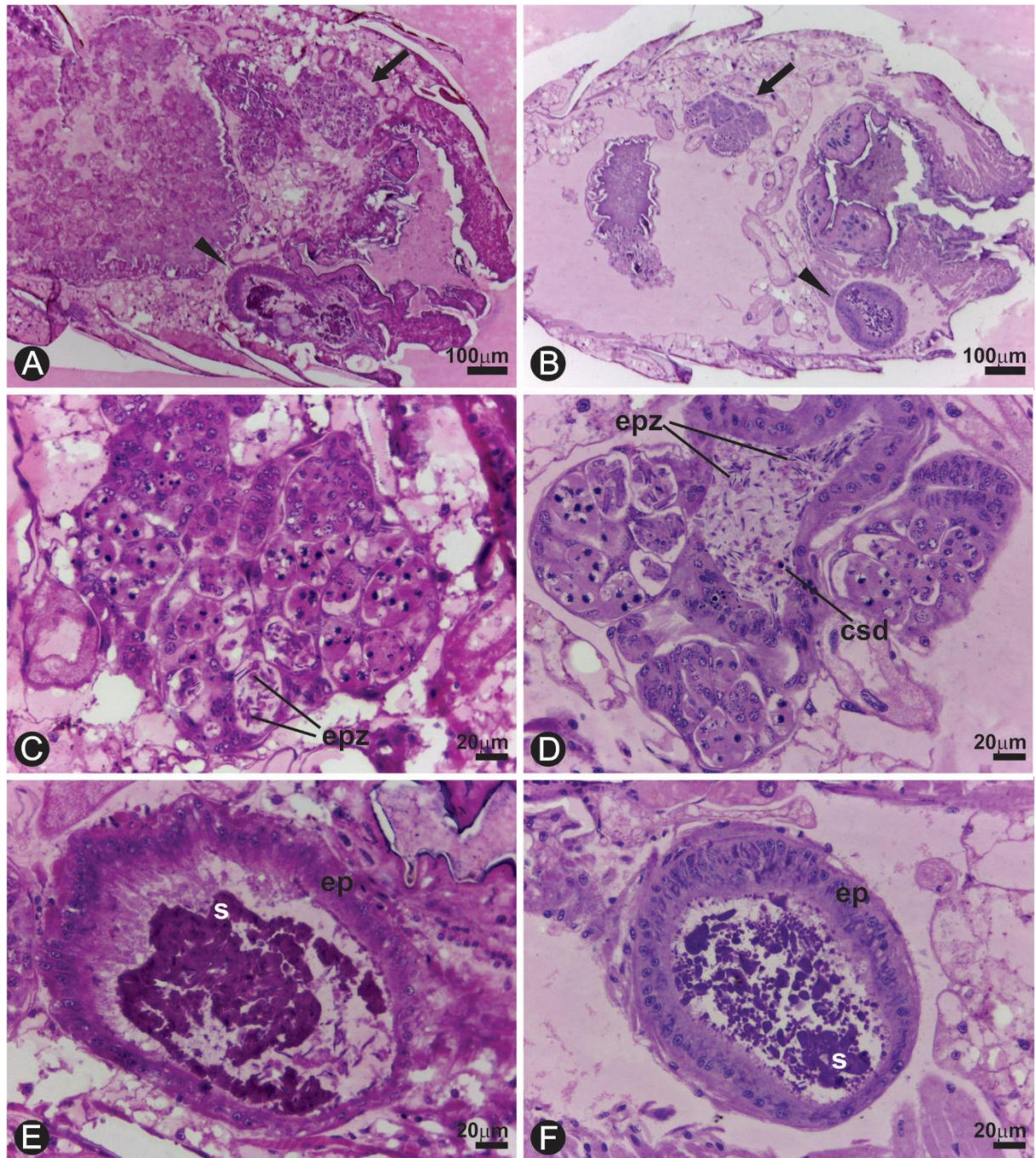


Figura 2. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen de machos de *Cryptotermes brevis*. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Vista geral do sistema reprodutor do rei primário da colônia A. **B.** Vista geral do sistema reprodutor do rei neotênico da colônia B. **C.** Detalhe dos lóbulos testiculares do rei primário. **D.** Detalhe dos lóbulos testiculares do rei neotênico. **E.** Detalhe da vesícula seminal do rei primário. **F.** Detalhe da vesícula seminal do rei neotênico. As setas indicam os lóbulos testiculares e as cabeças de seta, as vesículas seminais. **csd**, células sexuais degenerativas do testículo; **ep**, epitélio da vesícula; **epz**, espermatozoide; **s**, secreção.

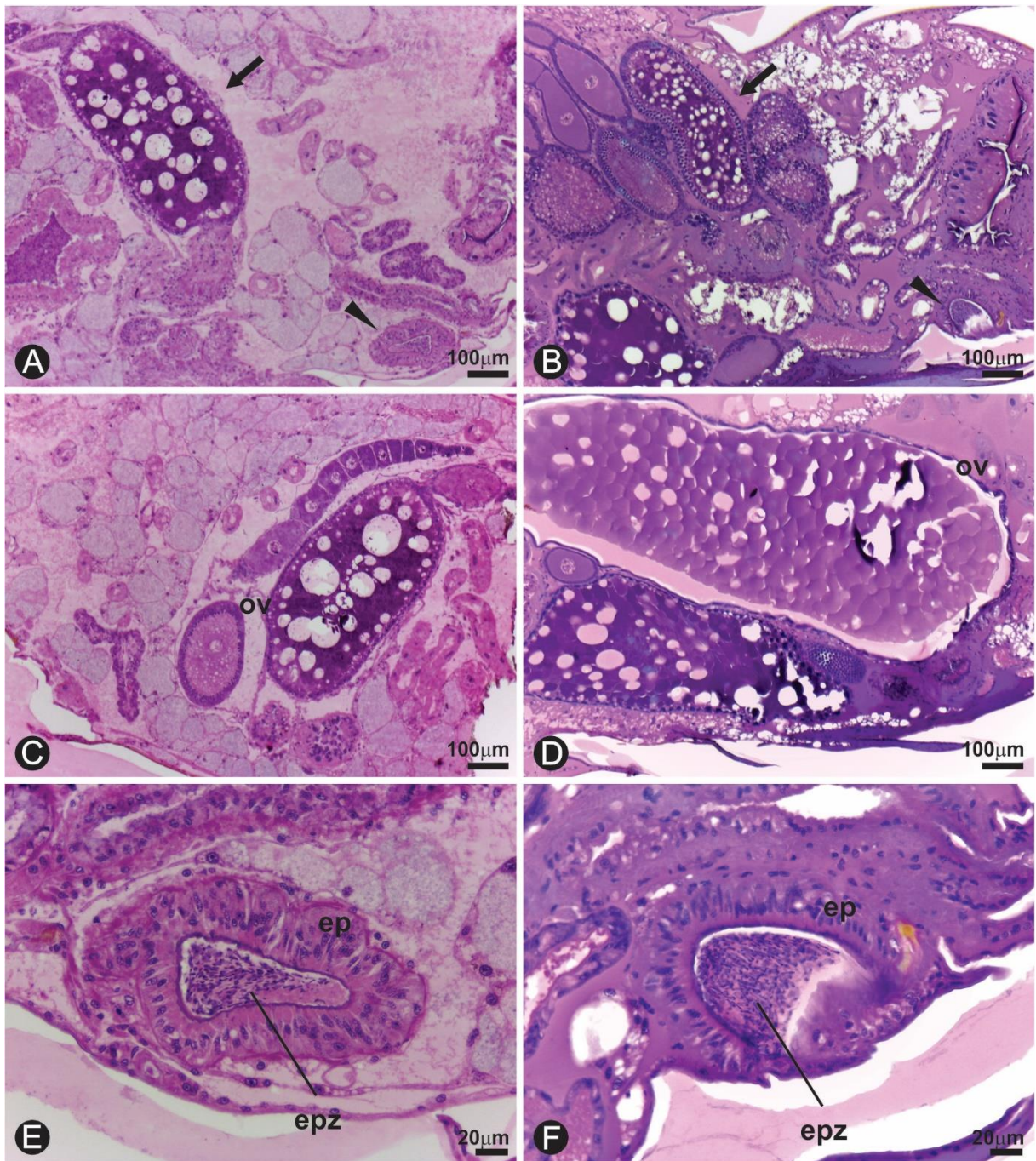


Figura 3. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen de fêmeas de *Cryptotermes brevis*. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Vista geral do sistema reprodutor da rainha primária da colônia. **B.** Vista geral do sistema reprodutor da rainha neotênica da colônia. **C.** Detalhe dos ovócitos da rainha primária. **D.** Detalhe dos ovócitos da rainha neotênica. **E.** Detalhe da espermateca da rainha primária. **F.** Detalhe da espermateca da rainha neotênica. As setas indicam os ovócitos e as cabeças de seta, as espermatecas. **ep**, epitélio da espermateca; **epz**, espermatozoide; **ov**, ovócito.

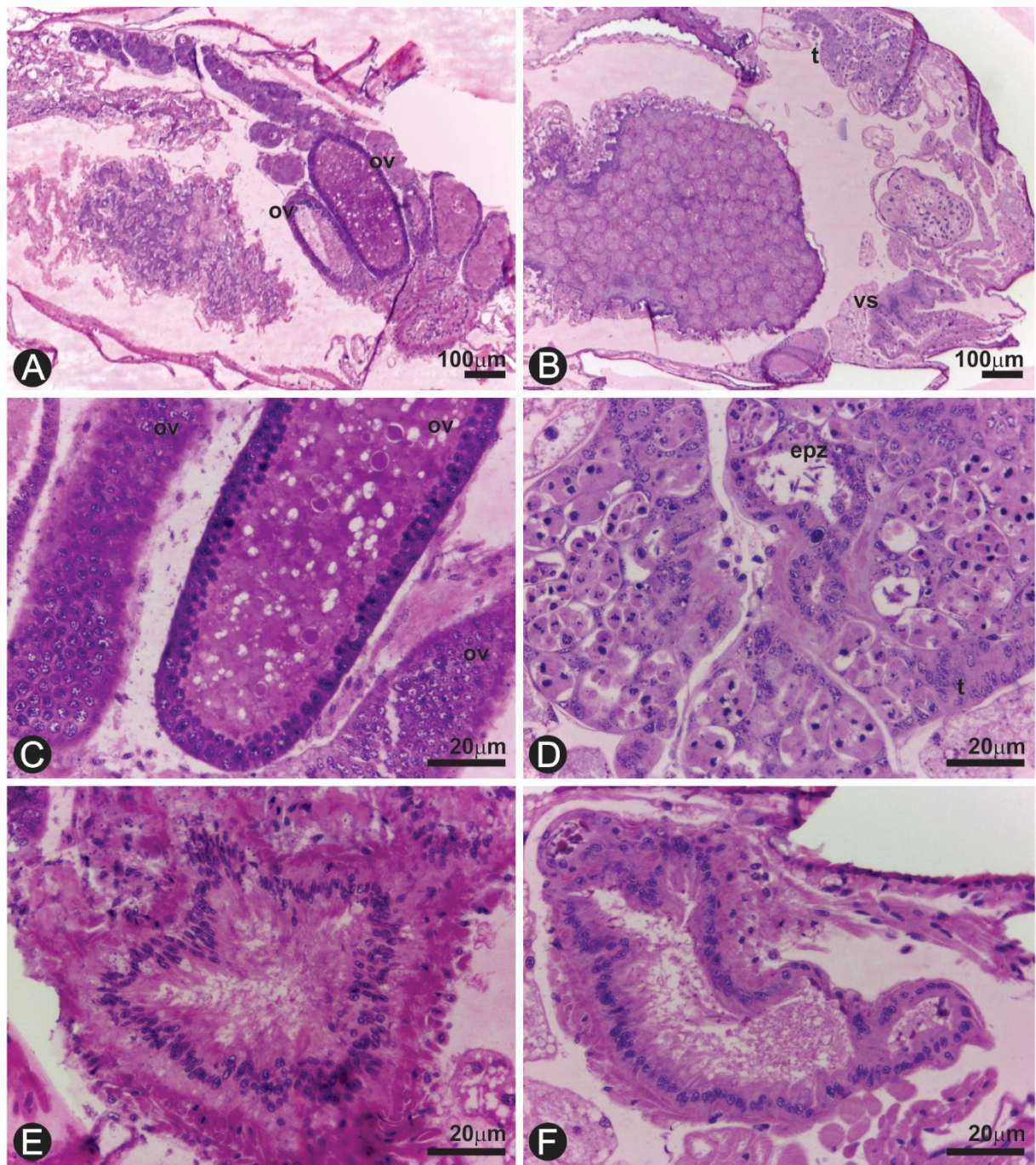


Figura 4. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen de reprodutores neotênicos de *Cryptotermes brevis* da colônia C. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Vista geral do sistema reprodutor da rainha neotênica. **B.** Vista geral do sistema reprodutor do rei neotênico. **C.** Detalhe dos ovócitos da rainha neotênica. **D.** Detalhe dos lóbulos testiculares do rei neotênico. **E.** Detalhe da espermateca da rainha neotênica. **F.** Detalhe da vesícula seminal do rei neotênico. epz, espermatozoide; ov, ovócito; t, lóbulos testiculares.

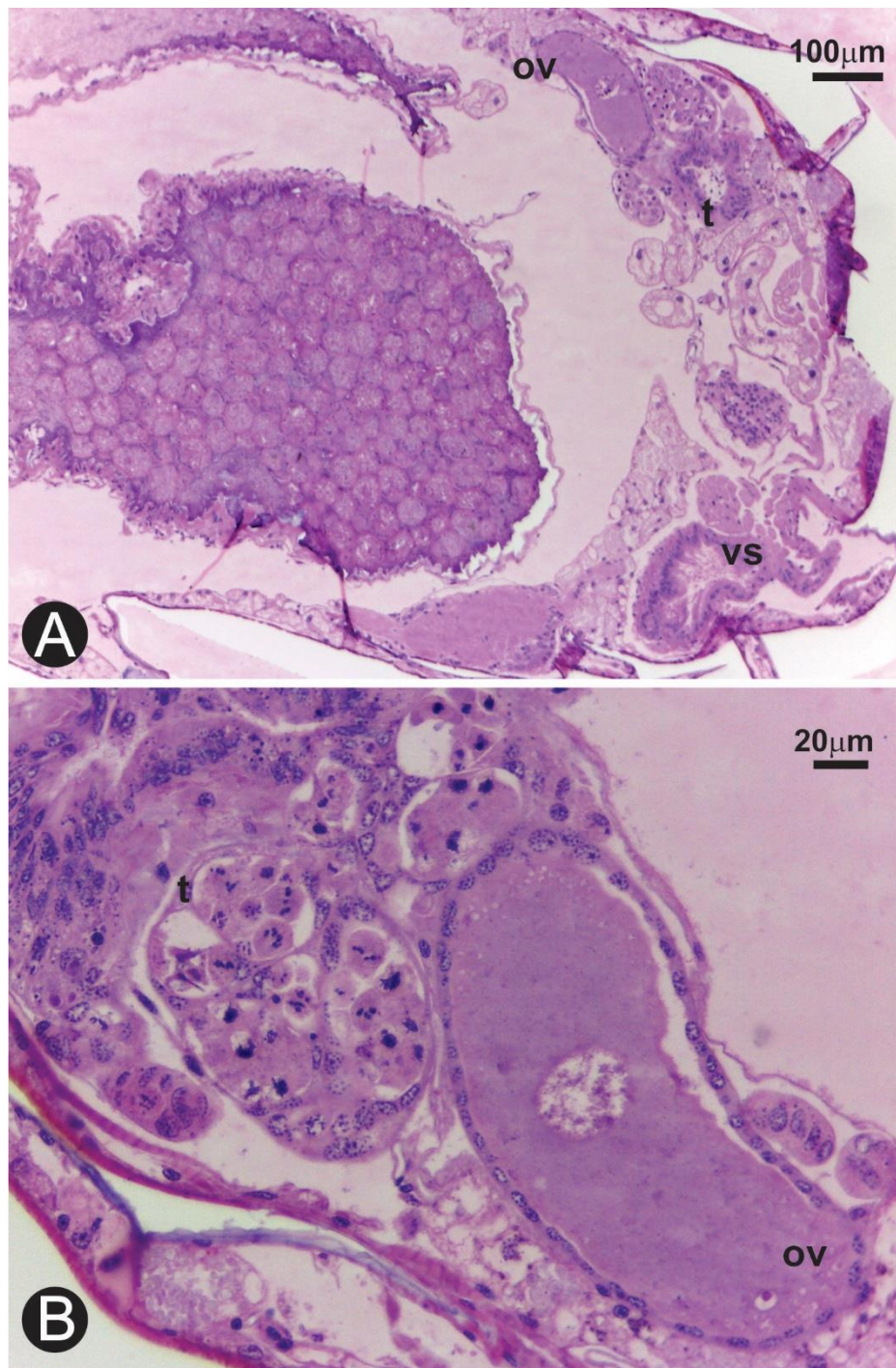


Figura 5. Secção histológica longitudinal-lateral do abdômen do rei neotênico da colônia C. Coloração: hematoxilina-eosina. **A.** Vista geral do sistema reprodutor. **B.** Detalhe dos lóbulos testiculares contendo um ovócito. **ov**, ovócito; **t**, lóbulos testiculares; **vs**, vesícula seminal.

4. DISCUSSÃO

Reprodutores neotênicos podem ser ápteros, quando se desenvolvem a partir de um ínstar larval, ou braquípteros, quando se desenvolvem a partir de ninfas. Todos os reprodutores encontrados no presente estudo eram braquípteros e, portanto, tinham brotos alares. Estes brotos estavam menos desenvolvidos que os presentes em ninfas de último ínstar, fato também observado por Costa-Leonardo, Barsotti e Soares (1999) no termitídeo *Silvestritermes euamignathus*. De acordo com Hayashi et al. (2007), a diferenciação de castas nos cupins é um dos exemplos mais conspícuos de polifenismo facultativo em animais, no qual indivíduos mostram vários fenótipos apesar de possuírem a mesma bagagem genética.

Cryptotermes brevis é um cupim que apresenta um desenvolvimento muito plástico no qual os falsos operários são totipotentes e podem se desenvolver em todas as castas (ROISIN, 2000; ROISIN e KORB, 2011). Um falso operário pode permanecer como falso operário após uma muda estacionária ou pode sofrer muda e originar um soldado; ou ainda, por meio de um desenvolvimento progressivo via vários ínstares ninfais, originar em um reprodutor alado (imago) que vai se dispersar e fundar novas colônias como reprodutor primário. Outra opção de desenvolvimento para estes falsos operários é sofrer muda e originar reprodutores neotênicos, que vão permanecer no ninho e dar origem a uma prole endogâmica (LUCHETTI et al, 2013a). A formação de reprodutores neotênicos já foi estudada em *C. brevis* e parece sofrer influência da composição do grupo, da origem geográfica dos cupins e condições de manutenção em laboratório (LENZ; MCMAHAN; WILLIANS, 1982). Outra diferenciação observada por estes autores foi no tempo requerido de resposta à orfandade. Portanto, parece que fatores externos e internos da colônia controlam o aparecimento dos reprodutores neotênicos. No presente caso, a retirada dos reprodutores primários ocasionou o aparecimento desses reprodutores de substituição.

Estudos recentes de Luchetti et al. (2013a) mostraram que no kalotermitídeo *K. flavicollis*, a fusão de colônias vizinhas causa, frequentemente, a morte dos reprodutores primários. Este fato dá aos falsos operários a possibilidade de herdarem o ninho ao se desenvolverem em reprodutores neotênicos. Estes mesmos autores, encontraram que das onze famílias de *K. flavicollis* analisadas, nove eram mistas enquanto as outras duas eram estendidas. Famílias mistas também já foram encontradas tanto em cupins inferiores (DEHEER e VARGO, 2004, 2008; HAYASHI et al., 2005; PERDEREAU et al., 2010; GOODISMAN e CROZIER, 2002; ALDRICH e KAMBHAMPATI, 2007; BOOTH et al., 2012; LUCHETTI et al., 2013b) como em cupins superiores (ATKINSON e ADAMS, 1997; HACKER et al., 2005; ADAMS; ATKINSON; BULMER, 2007). Provavelmente em colônias de *C. brevis* também ocorra este fenômeno, devido à proximidade das colônias e ocorrência da mesma plasticidade de desenvolvimento que existe em *K. flavicollis*.

Considerações teóricas desenvolvidas inicialmente para entender a formação de “reprodução cooperativa” em grupos de vertebrados (BROWN, 1987) foram aplicadas aos cupins (THORNE, 1997; SHELLMAN-REEVE, 1997; ROISIN, 1999). De acordo com essa teoria, um indivíduo pode ter um potencial reprodutivo maior ao permanecer no ninho natal do que ao se dispersar quando as condições ecológicas diminuem a probabilidade de sucesso reprodutivo independente (LUCHETTI et al., 2013a). Além disso, um indivíduo que permanece no ninho pode aumentar indiretamente o seu potencial reprodutivo ao assistir os companheiros da colônia natal.

Os resultados da análise do aparelho reprodutor da fêmea neotênica da colônia A e do macho neotênico da colônia B mostraram que o aparelho reprodutor destes indivíduos estava em fase ativa de reprodução, o que foi confirmado pela postura de ovos nestas colônias. Adicionalmente, a fêmea neotênica da colônia A mostrou um maior número de ovariolos funcionais e isso corrobora com o número de ovos encontrados na colônia A, que foi superior ao observado na colônia B (Tabela 1).

Na colônia C, liderada pelo casal de reprodutores neotênicos, não foram encontrados ovos e nem larvas. Além disso, ficou claro que o rei era um indivíduo intersexual e portanto estéril. Uma revisão detalhada da literatura do aparelho reprodutor na família Kalotermitidae mostrou que na espécie *Neotermes zuluensis* também foi observada a presença de ovócitos entre os lóbulos testiculares de alguns machos de reprodutores alados e de reprodutores neotênicos.

Neste caso, esta ocorrência foi interpretada erroneamente como hermafroditismo (GEYER, 1951). De acordo com Narita et al. (2010), intersexos são indivíduos caracterizados por possuírem uma genética uniforme, ou seja, um genótipo tipicamente masculino ou feminino, mas com algumas partes do corpo apresentando um fenótipo oposto ao sexo genético do indivíduo, como resultado de um erro durante o processo de determinação e diferenciação sexual. Portanto, este é o primeiro relato de intersexo entre os Isoptera, apesar do fenômeno ter sido verificado anteriormente no cupim *N. zuluensis*. Contudo, ainda não está claro o fator responsável pela ocorrência do referido fenômeno em Isoptera.

Uma explicação para a ocorrência de intersexos em Isoptera seria a infestação por *Wolbachia*. Em vários insetos, intersexos são causados pela presença de bactérias endossimbionéticas do gênero *Wolbachia*. Estas bactérias já foram descritas em muitas espécies de cupins e parecem abranger várias linhagens (LO e EVANS, 2007). Adicionalmente, os mesmos autores demonstraram a ocorrência de *Wolbachia* em *Cryptotermes secundus*, *Neotermes luykxi*, *Neotermes jouteli* e *K. flavicollis*, quatro espécies pertencentes à família Kalotermitidae. Dados atuais da literatura mostram que bactérias do gênero *Wolbachia* têm a capacidade de causar feminização nos seus insetos hospedeiros (NARITA et al., 2010). A determinação de sexo no isópodo *Armadillidium vulgare* é genética, porém é sabido que os machos sofrem feminização pela ocorrência de *Wolbachia* (RIGAUD, 1997). Os machos da borboleta *Eurema madarina* infectados por *Wolbachia* resultam em intersexos (NARITA et al., 2007). Por outro lado, na mariposa *Ostrinia scapularis* e *Ostrinia furnacalis*, a ocorrência de *Wolbachia* mata todos os machos (KAGEYAMA e TRAUT, 2004; SAKAMOTO et al., 2008). Não é sabido como a *Wolbachia* interfere com o sistema de determinação de sexo dos insetos, no entanto, é sugerido que a modificação epigenética tem um importante papel na cigarrinha *Zyginidia pullula*, na qual a ocorrência natural de *Wolbachia* causa feminização parcial dos indivíduos geneticamente machos (NEGRI et al., 2006; 2009). De acordo com Stouthamer, Breeuner e Hurst (1999), a *Wolbachia* é uma bactéria intracelular transmitida via citoplasma apenas pelas fêmeas dos insetos e outros artrópodos, de modo que da perspectiva do simbiote, o macho é um “desperdício”, podendo ser eliminado ou feminizado. Resumindo, uma infestação por *Wolbachia* em artrópodes pode resultar em morte de machos, feminização de machos genéticos, partenogênese e incompatibilidade citoplasmática (BANDI; TREES; BRATTIG, 2001), o que explicaria os presentes resultados.

Estudos futuros envolvendo técnicas moleculares poderão confirmar se a feminização presente nestes representantes de Kalotermitidae podem ser resultantes da presença de *Wolbachia* conforme hipótese sugerida no presente artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E. S.; ATKINSON, L.; BULMER, M. S. Relatedness, recognition errors, and colony fusion in the termite *Nasutitermes corniger*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, p. 1195-1201, 2007.

ALDRICH, B. T.; KAMBHAMPATI, S. Population structure and colony composition of two *Zootermopsis nevadensis* subspecies. **Heredity**, n. 99, p. 443-45, 2007.

ATKINSON, L., ADAMS, E. S. The origins and relatedness of multiple reproductives in colonies of the termite *Nasutitermes corniger*. Proceedings of the Royal Society of London B, **Biological Sciences**, n. 264, p. 1131-1136, 1997.

BANDI, C.; TREES, A. J.; BRATTIG, N. W.; *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. **Veterinary Parasitology**, n. 98, p. 215-238, 2001.

BOOTH, W.; BRENT, C. S.; CALLERI, D. V.; ROSENGAUS, R. B.; TRANIELLO, J. F. A.; VARGO, E. Population genetic structure and colony breeding system in dampwood termites (*Zootermopsis angusticollis* and *Z. nevadensis nuttingi*). **Insectes Sociaux**, n. 59, p. 127-137, 2012.

BROWN, J. L. **Helping and Communal Breeding in Birds: ecology and evolution**. Princeton: Princeton University Press, 1987.

BULMER, M. S.; ADAMS, E. S.; TRANIELLO, J. F. A. Variation in colony structure in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. **Behavioural Ecology and Sociobiology**, n. 49, p. 236-243, 2001.

COSTA-LEONARDO, A. M.; BARSOTTI, R. C.; SOARES, H. X. Morphology of the nymphoid replacement reproductives in the Neotropical termite *Armitermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Journal of Morphology**, v. 239, n. 2, p. 131-141, 1999.

DEHEER, C. J.; VARGO, E. L. Colony genetic organization and colony fusion in the termite *Reticulitermes flavipes* as revealed by foraging patterns over time and space. **Molecular Ecology**, n. 13, p. 431-441, 2004.

DEHEER, C. J.; VARGO, E. L. Strong mitochondrial DNA similarity but low relatedness at microsatellite loci among families within fused colonies of the termite *Reticulitermes flavipes*. **Insectes Sociaux**, n. 55, p. 190-199, 2008.

GEYER, J. W. C. The reproductive organs of certain termites, with notes on the hermaphrodites of neoterms. **Entomology Memoirs**, v. 9, n. 2, p. 233-325, 1951.

GOODISMAN, M. A. D.; CROZIER, R. H. Population and colony genetic structure of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. **Evolution**, n. 56, p. 70-83, 2002.

GRASSÉ, P. P. **Termitologia**, Tome 1: Anatomie, Physiologie, Reproduction des Termites. Masson: Paris, 1982.

HACKER, M.; KAIB, M.; BAGINE, R. K. N.; EPPLEN J. T.; BRANDL, R. Unrelated queens coexist in colonies of the termite *Macrotermes michaelseni*. **Molecular Ecology**, n. 14, p. 1527-1532, 2005.

HAYASHI, Y.; KITADE, O.; GONDA, M.; KONDO, T.; MIYATA, H., URAYAMA, K. Diverse colony genetic structures in the Japanese subterranean termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**, n. 46, p. 175-184, 2005.

HAYASHI, Y.; LO, N.; MIYATA, H.; KITADE, O. Sex-linked genetic influence on caste determination in a termite. **Science**, n. 318, p. 985-987, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

KAGEYAMA, D.; TRAUT, W. Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with sex determination of its host *Ostrinia scapularis*. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, n. 271, p. 251-258, 2004.

KORB, J.; HARTFELDER, K. Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. **Biological Reviews**, n. 83, p. 295-313, 2008.

KORB, J.; LENZ, M. Reproductive decision-making in the termite, *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae), under variable food conditions. **Behavioral Ecology**, n. 15, p. 390-395, 2004.

KORB, J. 2011. Termite mound architecture, from function to construction. In: BIGNELL, D.E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Ed.). **Biology of Termites: A Modern Synthesis**. Heidelberg: Springer Press, p. 349-374.

LENZ, M.; RUNKO, S. Long-term impact of orphaning on field colonies of *Coptotermes lacteus* (Froggatt) (Isoptera: Rhinotermitidae). **Insectes Sociaux**, n. 40, p. 439-456, 1993.

LENZ, M., MCMAHAN, E. A.; WILLIAMS, E. R. Neotenic production in *Cryptotermes brevis* (Walker): influence of geographical origin, group composition, and maintenance conditions (Isoptera: Kalotermitidae). **Insectes Sociaux**, n. 29, p. 148-163, 1982.

LO, N.; EVANS, T. Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 44, p. 461-466, 2007.

LUCHETTI, A.; DEDEINE, F.; VELONÀ, A.; MANTOVANI, B. Extreme genetic mixing within colonies of the wood-dwelling termite *Kalotermes flavicollis* (Isoptera, Kalotermitidae). **Molecular Ecology**, n. 22, p. 3391-3402, 2013a.

LUCHETTI, A.; VELONÀ, A.; MUELLER, M.; MANTOVANI, B. Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). **Insectes Sociaux**, n.60, p.203-211, 2013b.

LUYKX, P. Termite colony dynamics as revealed by the sex- and caste-ratios of whole colonies of *Incisitermes schwarzi* banks (Isoptera: Kalotermitidae). **Insectes Sociaux**, n. 33, p. 221-248, 1986.

MAISTRELLO, L.; OCETE, R.; LÓPEZ, M. A. Seasonal trends in the social composition and inside-trunk distribution of *Kalotermes flavicollis* (Isoptera: Kalotermitidae) colonizing grapevines. **Environmental Entomology**, n. 39, p. 295-302, 2010.

MYLES, T. G. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. **Sociobiology**, v. 33, n. 1, p. 1-91, 1999.

NARITA, S.; KAGEYAMA, D.; NOMURA, M.; FUKATSU, T. Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 73, p. 4332-4341, 2007.

NARITA, S.; PEREIRA, R. A. S.; KJELLBERG, F.; KAGEYAMA, D. Gynandromorphs and intersexes: potential to understand the mechanism of sex determination in arthropods. **Terrestrial Arthropod Reviews**, n. 3, p. 63-96, 2010.

NEGRI, I.; PELLECCIA, M.; MAZZOGLIO, P. J.; PATETTA, A.; ALMA, A. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, n. 273, p. 2409-2416, 2006.

NEGRI, I.; FRANCHINI, A.; GONELLA, E.; DAFFONCHIO, D.; MAZZOGLIO, P. J.; MANDRIOLI, M.; ALMA, A. Unravelling the *Wolbachia* evolutionary role: the reprogramming of the host genomic imprinting. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, n. 276, p. 2485-2491, 2009.

NEOH, K. B.; LEE, C. Y. Developmental stages and caste composition of a mature and incipient colony of the drywood termite, *Cryptotermes dudleyi* (Isoptera: Kalotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, n. 104, v. 2, p. 622-628, 2011.

NOIROT, C.; PASTEELS, J. M. Ontogenetic development and the evolution of the worker caste in termites. **Experientia**, n. 43, p. 851-860, 1987.

NUTTING, W. L. Flight and colony foundation. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. (Ed.). **Biology of Termites**, vol. 1, New York: Academic Press, 1969. p. 233-282.

PERDEREAU, E.; BAGNÈRES, A. G.; DUPONT, S.; DEDEINE, F. High occurrence of colony fusion in a European population of the American termite *Reticulitermes flavipes*. **Insectes Sociaux**, n. 57, p. 393-402, 2010.

RIGAUD, T. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. In: O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A.A.; WERREN, J.H. (Ed.). **Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction**. New York: Oxford University Press, 1997. p.81-101.

ROISIN, Y. Reversibility of regressive molts in the termite *Neotermes papuan*. **Die Naturwissenschaften**. n. 77, p. 246-247, 1990.

ROISIN, Y. Philopatric reproduction, a prime mover in the evolution of eusociality? **Insectes Sociaux**, n. 46, p. 297-305, 1999.

ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (Ed.). **Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology**. London: Kluwer Academic Press, 2000. p. 95-119.

ROISIN, Y.; PASTEELS, J. M. Evolutionary trends in neoteny and secondary reproduction in termites. In: VEERESH, G. K.; MALIK, B.; VIRAKTAMATH, C. A. (Ed.). **Social insects and the environment**. New Delhi: Westview Press, Oxford & IBH Publishing Co., 1990. p. 33-34.

ROISIN, Y.; PASTEELS, J. M. Polymorphism in the giant cocoa termite, *Neotermes papua* (Desneux). **Insectes Sociaux**, n. 38, p. 263-272, 1991.

ROISIN, Y.; KORB, J. Social organisation and the status of workers in termites. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Ed.). **Biology of Termites: A Modern Synthesis**. Heidelberg: Springer Press, 2011. p.133-164.

SAKAMOTO, H.; KAGEYAMA, D.; HOSHIZAKI, S.; ISHIKAWA, Y. Heat treatment of *Wolbachia*-infected *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae) gives rise to sexually mosaic offspring. **Journal of Insect Science**, v. 8, n. 67, p. 1-5, 2008.

SHELLMAN-REEVE, J. S. The spectrum of eusociality in termites. In: CHOE, J. C.; CRESPI, B. J. (Ed.). **The Evolution of Social Behaviour in Insects and Arachnids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 52-93.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A.; HURST, G. D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, n. 53, p. 71-102, 1999.

THORNE, B. L. Polygyny in the Neotropical termite *Nasutitermes corniger*. Life history consequences of queen mutualismo. **Behavioral ecology and sociobiology**, n. 14, p. 117-136, 1984.

THORNE, B. L. Termite polygyny: the ecological dynamics of queen mutualismo. In: HÖLLDOBLER, B.; LINDAUER, M. (Ed.). **Experimental behavioral ecology and sociobiology**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1985. p.325-342.

THORNE, B. L. Termite Terminology. **Sociobiology**, v. 28, n. 3, p. 253-263, 1996.

THORNE, B. L. Evolution of Eusociality in Termites. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 28, p. 27-54, 1997.

Considerações Finais



3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nas três espécies estudadas, *Cryptotermes brevis*, *Coptotermes gestroi* e *Silvestritermes euamignathus* ocorreu um aumento significativo dos testículos após a maturidade, fato facilmente observado quando se compara ninfas, alados e reis.
- A largura dos dutos deferentes em reprodutores alados de *C. brevis*, *C. gestroi* e *S. euamignathus* foi inversamente proporcional ao seu comprimento, sendo maior nos alados de *C. brevis* e mais larga nos alados de *S. euamignathus* (ver Apêndice A).
- Espermatozoides foram observados nos testículos, dutos deferentes e vesículas seminais dos reprodutores alados e reis funcionais de todas as espécies estudadas, dado ainda não registrado na literatura de Isoptera. Nos reprodutores alados e reis analisados também foi encontrada uma grande quantidade de espermatozoides ao longo de toda a extensão do canal ejaculatório e na porção terminal da vesícula seminal. Nas ninfas de 5º ínstar de *C. gestroi* e de *S. euamignathus* e, nas ninfas de último ínstar de *C. brevis*, já existem espermatozoides nos túbulos seminíferos.
- As vesículas seminais de *C. brevis* são dilatações da porção final dos dutos deferentes. Estas estruturas se apresentam em par e são formadas por um epitélio simples colunar envolto por uma espessa camada de musculatura visceral.
- As vesículas seminais de *C. gestroi* são pares e individualizadas. Nesta espécie, as vesículas seminais se projetam a partir da porção final dos dutos deferentes e aparecem como tubos retorcidos. As vesículas seminais em *C. gestroi* são formadas, na sua porção mais distal, por uma região secretora, constituída por um epitélio simples colunar

envolvido por musculatura visceral e na sua porção proximal, área de estocagem de espermatozoides, por um epitélio simples cúbico, também circundado por musculatura. A musculatura da parte proximal é mais espessa do que a presente na porção distal.

- As vesículas seminais de *S. euamignathus* são estruturas pares, formadas por dilatações na porção final dos dutos deferentes. Internamente, as vesículas seminais são revestidas por um epitélio simples colunar com bordo em escova e, externamente, também são estruturas revestidas por musculatura visceral. Além disso, nesta espécie, os resultados indicam que ela funciona mais como um órgão de armazenamento e espermatozoides do que como um órgão secretor.
- De um modo geral, as vesículas seminais dos cupins desempenham um importante papel no armazenamento e na nutrição dos espermatozoides. A presença de um desenvolvimento precoce do aparelho nos machos dos cupins, caso das ninfas, mostra a preparação destes indivíduos para a rápida substituição dos reprodutores imaginiais, caso de colônias orfanadas. Este fato corrobora com dinâmica de castas na sociedade destes insetos e contribui para a estabilização da colônia.
- A secreção das vesículas dos reis primários funcionais respondeu diferentemente ao teste histoquímico de PAS (Ácido periódico de Schiff) e de XP (xylidine-Ponceau) nos cupins inferiores e superiores. A secreção das vesículas seminais de *C. brevis* e *C. gestroi* detectou a presença de polissacarídeos e proteínas, enquanto em *S. euamignathus* não foi possível identificar estes compostos. Estes resultados indicam uma divergência funcional no sistema reprodutor de cupins mais basais (cupins inferiores) e cupins mais derivados (cupins superiores) (ver Apêndice B).
- Nas três espécies estudadas, o canal ejaculatório apresenta uma camada simples de células epiteliais envolta por uma camada muscular e é formado pela junção dos dois dutos deferentes em um ducto mediano e sua parte terminal se transforma em um pênis membranoso.

Referências



Bibliográficas



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, R. L. Contribuição à biogeografia dos térmitas de São Paulo, Brasil. Insecta-Isoptera. **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 25, p. 185-217, 1958.

ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; NEVES, C. A.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, n. 22, p. 193-201, 2005.

ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the Male Reproductive System of the Social Wasp, *Polistes Versicolor Versicolor*, with Phylogenetic Implications. **Journal of Insect Sciences**, v. 10, n. 71, p. 1-10, 2010.

BACCETTI, B.; BAIRATI, A. Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinale maschili in *Dacus oleae* Gmel ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera). **Redia**, n. 49, p. 1-29, 1964.

BACCETTI B., DALLAI R. The spermatozoon of Arthropoda XXIX. The degenerated axoneme of Aleyrodids. **Journal of Ultrastructure Research**, n. 61, p. 260-270, 1977.

BACCETTI, B.; DALLAI, R.; CALLAINI, G. The spermatozoon of arthropoda. 32. *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, n. 3, p. 87-99, 1981.

BAER, B. Sexual selection in *Apis* bees. **Apidologie**, n. 36, p. 187-200, 2005.

BAER, B.; ARMITAGE, S. A. O.; BOOMSMA, J. J. Sperm storage induces an immunity cost in ants. **Nature**, n. 441, p. 872-875, 2006.

BALL, D. E.; VINSON, S. B. Anatomy and histology of the male reproductive system of the fire ant, *Sonelopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). **International Journal Morphology and Embriology**, v. 13, n. 4, p. 283-294, 1984.

BANERJEE, B. Chromosome morphology during the spermatogenesis of *Odontotermes redemanni* (Wasmann). **Caryologia**, n. 14, p. 155-158, 1961.

BELYAEVA, N. V.; DOVGOBROD, I. G. The Genitalia of Termites (Isoptera): Possibilities of Using in Taxonomy. **Zoologicheskii Zhurnal**, v. 85, n. 4, p. 462-469, 2006.

BILHA, J. K. **Morfologia dos testículos de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae), durante o desenvolvimento pós-embriônico**. 2008. 37 f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2008.

BUGNION, E.; POPOFF, N. Anatomie de la reine et du roi-termite (*Termes redemanni, obscuriceps ethorni*). **Memoires de la Societe Zoologique de France**, n.25, p.210-231, 1912.

CAETANO, F. H. Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Atta capiguara* and *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). **Naturalia**, n. 5, p. 105-111, 1980.

CHAPMAN, R. F. **The insects. Structure and function**. Cambridge University Press, Cambridge, 1998. 770p.

CHILD, H. J. The internal anatomy of térmites and the histology of the digestive tract. In: KOFOID, C. A. (Ed.). **Termites and Termite Control**. 2 ed. University of California Press, Berkeley, California, 1934. p. 58-88.

CONSTANTINO, R. **On-line Termites Database**. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.htm/>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

CONSTANTINO, R. **Cupins do Cerrado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2015, 167 p.

COSTA-LEONARDO, A. M. **Cupins-praga: morfologia, biologia e controle**. 1 ed. Rio Claro, 2002. 128 p.

COSTA-LEONARDO, A. M.; BARSOTTI, R. C. Amputação antenal e aspectos da revoada do cupim *Coptotermes havilandi* (Isoptera, Rhinotermitidae) na cidade de Rio Claro. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 1998, Rio de Janeiro. **Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Entomologia**. Rio de Janeiro, 1998. v. 2. p. 1010.

COSTA-LEONARDO, A. M.; CAMARGO-DIETRICH, C. R. R. Território e população de forrageamento de uma colônia de *Coptotermes havilandi* (Isoptera: Rhinotermitidae) em meio urbano. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, n. 2, p. 99-105, 1999.

COSTA-LEONARDO, A. M.; BARSOTTI, R. C.; SOARES, H. X. Multiple nymphoid reproductives in the nests of the Neotropical termite, *Armitermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Sociobiology**, v. 28, n. 2, p. 197-205, 1996.

COSTA-LEONARDO, A. M.; SOARES, H. X.; BASORTTI, R. C. Response to orphaning in two Neotropical termites: *Armitermes euamignathus* and *Embiratermes festivellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n. 88, p. 109-114, 1998.

COSTA-LEONARDO, A. M.; BARSOTTI, R. C.; SOARES, H. X. Morphology of the nymphoid replacement reproductives in the Neotropical termite *Armitermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Journal of Morphology**, v. 239, n. 2, p. 131-141, 1999.

CROSLAND, M. W. J.; SU, N. Y. Work allocation among castes in a Rhinotermitidae Termite (Isoptera) – Are nymphs a working caste? **Sociobiology**, v. 48, n. 2, p. 585-598, 2006.

CRUZ-LANDIM, C. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. **Iheringia**, v. 91, p. 183-189, 2001.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. 1 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008. 407 p.

DALLACQUA, R. P.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, p. 276-281, 2003.

DEAN, S.; GOLD, R. Sex ratios and development of the reproductive system in castes of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**, n. 97, p. 147-152, 2004.

DOMINGOS, D. J. Densidade e distribuição espacial de ninhos de duas espécies de *Armitermes* (Isoptera, Termitidae) em cinco formações vegetais de cerrado. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 45, n. 3, p. 233-240, 1985.

EBERHARD, W. G. **Sexual selection and animal genitalia**. Cambridge: Harvard University Press, 1985. 407 p.

EBERHARD, W. G. **Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice**. Princeton: Princeton University Press, 1996. 472 p.

ENGEL, M. S.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): Their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, n. 3650, p. 1-27, 2009.

FITZPATRICK, J. L.; BAER, B. Polyandry reduces sperm length variation in social insects. **Evolution**, n. 65, p. 3006-3012, 2006.

FONTES, L. R.; ARAÚJO, R. L. Os cupins. In: MARICONI, F. A. M. (Coord.). **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 35-90.

GAY, F. J. **A world review of introduced species of térmites**. Bulletin n. 286. Melbourne: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 1967. 88 p.

GELMETTI, B. L. Sul contenuto delle vescicole seminali di *Kaloterme flavicollis*. **Symposium on Genetics and Biology of Italy**, n. 6, p. 48-54, 1958.

GEYER, J. W. C. The reproductive organs of certain termites, with notes on the hermaphrodites of neoterme. **Entomology Memoirs**, v. 9, n. 2, p. 233-325, 1951.

GODOY, M. C.; TORALES, G. J. Reproductive system of young male imagoes and kings of *Termes saltans* (Isoptera, Termitidae). **Sociobiology**, v. 35, n. 1, p. 141-148, 2000.

GRANDCOLAS, P. The phylogeny of cockroach families: a cladistic appraisal of morpho-anatomical data. **Canadian Journal of Zoology**, n. 74, p. 508-527, 1996.

GRANDI, G. Ultrastructural study of testis development and spermatogenesis in *Kaloterme flavicollis* (Fabr.) (Isoptera, Kalotermitidae). **Bollettino di Zoologia**, n. 59, p. 225-238, 1992.

GRASSÉ P. P. La Spermogenese aberrante des Metatermitides. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. n. 204, p. 1677-1679, 1937.

GRASSÉ, P. P. Ordre des Isoptères ou termites. In: _____. (Ed.). **Traité de zoologie v. 9**, Masson: Paris, 1949. p. 408-544.

GRASSÉ, P. P. **Termitologia**, Tome 1: Anatomie, Physiologie, Reproduction des Termites. Masson: Paris, 1982.

GRASSÉ, P. P.; BONNEVILLE, P. Les sexués inutilisés ou achrestogonimes des Protermitides. **Bulletin biologique de la France et de la Belgique**, n. 69, p. 474-491, 1936.

GRASSI, B.; SANDIAS, A. Costituzione e sviluppo della società dei Termitidi. Appendice I. Protozoa parassiti dei termitidi. **Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania**, n. 7, p. 45-59, 1893.

HAYASHI, Y.; LO, N.; MIYATA, H.; KITADE, O. Sex-linked genetic influence on caste determination in a termite. **Science**, n. 318, p. 985-987, 2007.

HIGA, S. **Flight, colony foundation and development of the gonads of the primary reproductives of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki** Ph.D. dissertation, 1981. University of Hawaii; Honolulu, HI.

HOLMGREN, N. Termitenstudien. I. Anatomische untersuchungen. Kgl. **Svegnska Vetenskapsakad. Handl**, v. 3, n. 44, p. 1-215, 1909.

IMMS, A. D. On the structure and biology of *Archotermopsis* together with description of new species of intestinal Protozoa and general observations on the Isoptera. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, n. 209, p. 75-108, 1919.

IMMS, A. D. 1948. **General Textbook of Entomology**, 7 ed. Dutton: New York.

INWARD, D.; BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. **Biology Letters**, v. 3, p. 331-335, 2007.

JAMIESON, B. G. M. **The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 320 p.

JUCCI, C. Sulla differenziazione delle caste nella società dei Termitidi. I. Neotenici (Reali veri e neotenici - l'escrezione nei reali neotenici - la fisiologia e la biologia). **Accademia**

Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali, n. 14, p. 267-500, 1924.

KELLER, L.; GENOUD, M. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. **Nature**, n. 389, p. 958-960, 1997.

KING, M.; EUBEL, H.; MILLAR, A. H.; BAER, B. Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 3, p. 409-414, 2011.

KITADE, O.; HOSHI, M.; ODAIRA, S.; ASANO, A.; SHIMIZU, M.; HAYASHI, Y.; LO, N. Evidence for genetically influenced caste determination in phylogenetically diverse species of the termite genus *Reticulitermes*. **Biology Letters**, n. 7, p. 257-260, 2011.

KLASS, K. D. The male abdomen of the relict termite *Mastotermes darwiniensis* (Dictyoptera: Isoptera: Mastotermitidae). **Zoologischer Anzeiger**, n. 239, p. 231-262, 2000.

KLASS, K. D.; THORNE, B. L.; LENZ, M. The male postabdomen of *Stolotermes inopinus*: a termite with unusually well-developed external genitalia (Dictyoptera: Isoptera: Stolotermitinae). **Acta Zoologica**, n. 81, p. 121-130, 2000.

KORB, J. Workers of a drywood termite do not work. **Frontiers in Zoology**, n. 4, p. 1-7, 2007.

KORB, J.; LENZ, M. Reproductive decision-making in the termite, *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae), under variable food conditions. **Behavioral Ecology**, n. 15, p. 390-395, 2004.

KORB, J.; SCHMIDINGER, S. Help or reproduce? The influence of food availability on kin-based altruism in the drywood termite *Cryptotermes secundus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, n. 56, p. 89-95, 2004.

KORB, J.; HARTFELDER, K. Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. **Biological Reviews**, n. 83, p. 295-313, 2008.

KRISHNA, K. Introduction. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. M. (Ed.). **Biology of termites**. New York: Academic Press, 1969, v. 1, p. 1-17.

KRISHNA, K.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M. S. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 377, p. 2704, 2013.

LENZ, M., MCMAHAN, E. A.; WILLIAMS, E. R. Neotenic production in *Cryptotermes brevis* (Walker): influence of geographical origin, group composition, and maintenance conditions (Isoptera: Kalotermitidae). **Insectes Sociaux**, n. 29, p. 148-163, 1982.

LIEBRICH, W. Premeiotic divisions of gonial cells are differently regulated in males in females of *Drosophila*. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**, n. 7, p. 369-371, 1984.

LIGHT, S. F.; WEESNER, F. M. The incipient colony of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). **Insectes Sociaux**, n. 2, p. 135-146, 1955.

LINDSLEY, D. L.; TOKUYASU, K. T. Spermatogenesis. In: ASHBUNER, M.; WRIGHT, T. R. (Ed.). **The genetics and biology of Drosophila**. Academic Press, 1980. p. 225-295.

LINO-NETO, J.; ARAÚJO, V. A.; DOLDER, H. Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). **Sociobiology**, v. 51, n. 1, p. 163-172, 2008.

MAO, L.; HENDERSON, G. A case for a free-running circannual rhythm in soldier developmental time of Formosan subterranean termites. **Insectes Sociaux**, v. 54, p. 388-392, 2007.

MATHEWS, A. G. A. **Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil**. Academia Brasileira de Ciências: Rio de Janeiro, 1977. 267p.

MATSUURA, K.; VARGO, E. L.; KAWATSU, K.; LABADIE, P. E.; NAKANO, H.; YASHIRO, T.; TSUJI, K. Queen succession through asexual reproduction in termites. **Science**, v. 323, p. 1687-1687, 2009.

MILLER, E. M. Caste differentiation in the lower termites. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. M. (Ed.). **Biology of Termites - vol. 1**. New York: Academic Press. 1969. p. 283-310.

NALEPA, C. A. Cockroaches. In: BREED, M. D.; MOORE, J. (Ed.) **Encyclopedia of Animal Behavior – vol. 1**, Oxford: Academic Press, 2010. p. 281-286.

NOIROT, C. Glands and Secretions. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. (Ed.), **Biology of the Termites – vol. 1**, New York: Academic Press, 1969. p. 89-123.

NOIROT, C. Evolution of polymorphism in Isoptera: developmental and environmental. In: **PROCEEDINGS 11th INTERNATIONAL CONGRESS IUSSI**, 1990, Bangalore: Oxford & IBI Publ. Co, New Dehli, 1990. p. 333-334.

NOIROT, C.; DARLINGTON, J. P. E. C. Termites nests: architecture, regulation and defence. In: ABE, T., BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Ed.). **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Kluwer Academics Publishers, 2000. p.121-139.

NUTTING. Flight and colony foundation. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. (Ed.). **Biology of Termites, vol. 1**, New York: Academic Press, 1969. p. 233-282.

OGUMA, Y.; KUROKAWA, H. The least cell number of first spermatocytes per cyst found in *Drosophila kanekoi*. **Japanese Journal of Genetics**, n. 59, p. 263-265, 1984.

PAMILO, P. Evolution of the sterile caste. **Journal of Theoretical Biology**, n. 149, p. 75-95, 1991.

PEARCE, M. J.; WAITE, B. S. A list of termite genera (Isoptera) with comments on taxonomic changes and regional distribution. **Sociobiology**, v. 23, n. 3, p. 247-262, 1994.

PEARCE, M. J. **Termites: Biology and Pest Management**. New York: Cab International, 1997. 169p.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, n. 60, p. 289-310, 2006.

QUICKE, D. L. J; INGRAM, S. N.; BAILLIE, H. S.; GAITENS, P. V. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). **Zoological Scripta**, n. 21, p. 381-402, 1992.

RAINA, A.; PARK, Y. I.; FLORANE, C. Behavior and reproductive biology of the primary reproductives of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**, n. 41, p. 37-48, 2003.

ROCHA, M. M.; CANCELLO, E. M.; CARRIJO, T. F. Neotropical térmites: revision of *Armitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae) and phylogeny of the Syntermitinae. **Systematic Entomology**, n. 37, p. 793-827, 2012.

ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Ed.). **Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology**. London: Kluwer Academic Press, 2000. p. 95-119.

ROISIN, Y.; KORB, J. Social organisation and the status of workers in termites. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Ed.). **Biology of Termites: A Modern Synthesis**, Heidelberg: Springer Press, 2011. p. 133-164.

SPRINGHETTI, A. Le vescicole seminali in *Mastotermes* e in *Macrotermes*. **Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Lettere**, n. 85, p. 1-4, 1952.

SPRINGHETTI, A. Le vesciole seminali in *Zootermopsis* e in *Blatella*. **Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Lettere**, n. 86, p. 48-52, 1953.

SPRINGHETTI, A.; GEOMETTI, L.. Sull'apparato genitale maschile di *Reticulitermes*. **Insectes Sociaux**, n. 7, p. 377-382, 1960.

SPRINGHETTI, A.; ODDONE, P.. Funzionalità dell'apparato genitale maschile in caste diverse di alcune termiti primitive. **Symposium on Genetics and Biology of Italy**, n. 11, p. 311-334, 1963.

STELLA E. Ricerche citologiche sui neutri e sui riproduttori delle termiti italiane (*Kaloterмес flavicollis* e *Reticulitermes lucifugus*). **Atti della Accademia Nazionale dei Lincei . Rendiconti, Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali**, n. 7, p. 1-30, 1938.

STEVENS, N. M. Studies in spermatogenesis with special reference to the accessory chromosomes. **Carnegie Institution of Washington publication**, n. 36, p. 1-32, 1905.

SCHEFFRAHN, R. H.; N.-Y. SU; CHASE, J. A.; MANGOLD, J. R.; GRACE, J. K.; YATES, J. R. First record of *Cryptotermes cynocephalus* Light (Isoptera: Kalotermitidae) and natural woodland infestations of *C. brevis* (Walker) on Oahu, Hawaiian Islands. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, n. 34, p. 141-145, 2000.

SU, N. Y.; SCHEFFRAHN, R. H. Termites as pests of buiding. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Ed.). **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. London: Kluwer, 2000. p. 437-453.

THOMPSON, C. B. The castes of *Termopsis*. **Journal of Morphology**, n. 36, p. 115-132, 1922.

THOMPSON, C. B.; SNYDER, T. E.. The “third form”, the wingless reproductive type of térmites: *Reticulitermes* and *Prorhinotermes*. **Journal of Morphology**, n. 34, p. 591-633, 1920.

THORNE, B. L. Termite Terminology. **Sociobiology**, v. 28, n. 3, p. 253-263, 1996.

VIRKKI, N..Alticial beetles with 128 sperm cell per bundle. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, n. 54, p. 586-587, 1970.

VIRKKI, N. Evolution of sperm cell number per bundle in insects. **Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**, n. 20, p. 23-54, 1973.

WEESNER, F. M. Biology of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux) with emphasis on caste development. **University of California publications. Zoology – Biodiversity**, n. 57, p. 251-302, 1953.

WEESNER, F. M. The reproductive systems of young primary reproductives of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). **Insectes Sociaux**, v. 2, n. 4, p. 323-345, 1956.

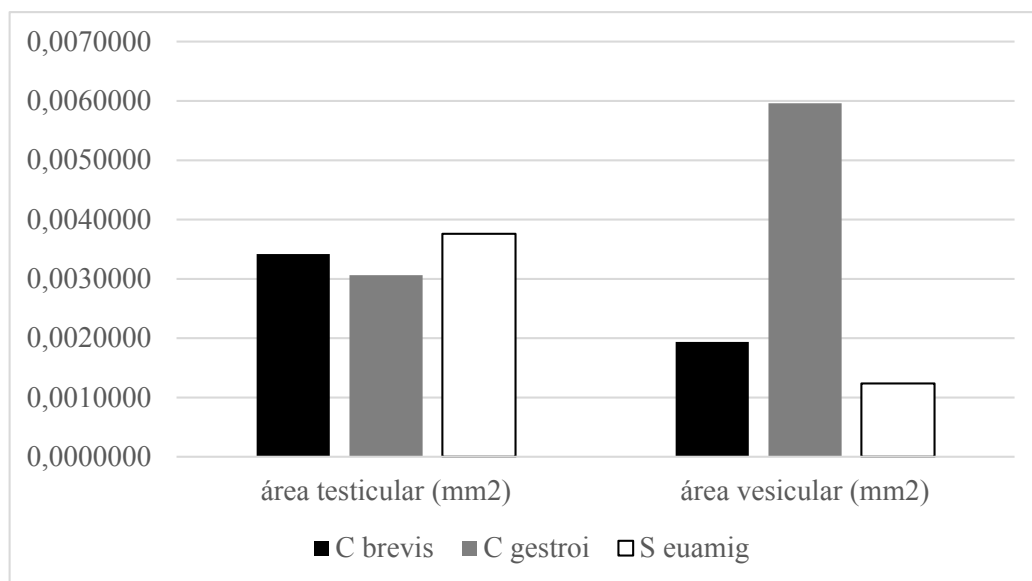
WEESNER, F. M. External anatomy. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F. M. **Biology of Termites - vol. 1**, NewYork: Academic Press, 1969. p. 19-47.

YE, Y.; JONES, S. C.; AMMAR, E. Reproductive characteristics of imagos of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**. n. 102, p. 889-894, 2009.

Apêndice A



Apêndice A – RELAÇÃO DAS ÁREAS VESICULARES E TESTICULAR ENTRE OS REPRODUTORES ALADOS DAS ESPÉCIES ESTUDADAS



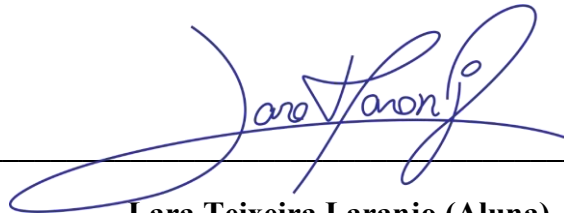
Apêndice B



Apêndice B – RESULTADO GERAL DOS TESTES HISTOQUÍMICOS PARA AS ESPÉCIES ESTUDADAS

Reprodutores machos/ Técnicas	<i>C. brevis</i>		<i>C. gestroi</i>		<i>S. euamignathus</i>	
	A♂	R♂	A♂	R♂	A♂	R♂
PAS	-	++	++	++	-	-
XP	-	++	+	++	+	-

A♂ = alado macho; R♂ = rei primário; - = negativo; + = moderadamente positivo; ++ = fortemente positivo; PAS = ácido periódico de Schiff; XP = xylidine-Ponceau.



Lara Teixeira Laranjo (Aluna)



Ana Maria Costa Leonardo (Orientadora)