

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**ESPERMATOGÊNESE DE *ZAPRIONUS INDIANUS* E  
*ZAPRIONUS SEPSOIDES* (DIPTERA:  
DROSOPHILIDAE): CARACTERIZAÇÃO  
CITOQUÍMICA, ESTRUTURAL E  
ULTRAESTRUTURAL**



Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Genética

Letícia do Nascimento Andrade de Almeida Rego

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**ESPERMATOGÊNESE DE *ZAPRIONUS INDIANUS* E  
*ZAPRIONUS SEPSOIDES* (DIPTERA:  
DROSOPHILIDAE): CARACTERIZAÇÃO  
CITOQUÍMICA, ESTRUTURAL E  
ULTRAESTRUTURAL**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Madi-Ravazzi**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira**

Rego, Letícia do Nascimento Andrade de Almeida.

Espermatogênese de *Zaprionus indianus* e *Zaprionus sepsoides* (Diptera: Drosophilidae): caracterização citoquímica, estrutural e ultraestrutural / Letícia do Nascimento Andrade de Almeida Rego. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

103 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Lilian Madi-Ravazzi

Co-orientador: Maria Tercília Vilela Azeredo-Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Meiose. 2. *Zaprionus indianus*. 3. *Zaprionus sepsoides*. 4. Espermatogênese. 5. Citoquímica. I. Madi-Ravazzi, Lilian. II. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 576.354

**LETÍCIA DO NASCIMENTO ANDRADE DE ALMEIDA REGO**

**Espermatogênese de *Zaprionus indianus* e *Zaprionus sepsoides* (Diptera: Drosophilidae):  
caracterização citoquímica, estrutural e ultraestrutural.**

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

**BANCA EXAMINADORA**

Profª Drª Lilian Madi-Ravazzi  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

---

Profª Drª Blanche Christine Pires de Bitner-Mathé Leal  
Professor Assistente Doutor  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Maria Izabel Camargo Mathias  
Professor Titular  
UNESP – Rio Claro

---

Profª Drª Hermione Elly Melara de Campos Bicudo  
Professor Emérito  
UNESP – São José do Rio Preto

---

Profª Drª Patrícia Vilamaior  
Professor Assistente de Suporte Acadêmico  
UNESP – São José do Rio Preto

---

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de *Drosophila*, no Laboratório de Biologia Celular, no Laboratório Multiusuário de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, UNESP de São José do Rio Preto, e também no Centro de Microscopia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, com auxílio financeiro da CAPES.

Dedico este trabalho,

ao meu avô Zé Francisco (*in memoriam*),

à Olivia minha afilhada,

e ao Gabriel, meu primeiro sobrinho.

## AGRADECIMENTOS

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Madi-Ravazzi pela orientação, por confiar no meu trabalho, pelo incentivo, dedicação, respeito, ajuda incondicional, muita paciência e pelo carinho. Sem sua ajuda não conseguiria ter ido até o fim, uma vez que, tive um doutorado um tanto quanto “conturbado”, com várias “quase-desistências”, momentos difíceis, com troca de orientador, de cidade e de Projetos de Pesquisa. MUITO OBRIGADA LILIAN!*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira por abrir seu laboratório, pelas dicas, sugestões, aprendizado, pelo carinho, generosidade, por confiar em meu trabalho e em meu potencial, por sempre me incentivar e não deixar que eu desistisse de alcançar meus objetivos.*

*À Dr<sup>a</sup> Rosana Silistino de Souza, pois sem ela grande parte prática do trabalho não teria sido realizada e ainda por cima, de maneira muito caprichosa. Obrigada pela paciência, total disposição, aprendizado, incentivo, carinho e apoio incondicional, além das várias boas conversas, científicas ou não, que tivemos ao longo do trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela disponibilidade do Laboratório Multiusuário de Microscopia e Microanálise e ao técnico José Augusto Maulim pelo auxílio na captura de imagens no Centro de Microscopia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Massumi Itoyama por ter sido a primeira a ter me aberto as portas desta Instituição e pelo incentivo, além das sugestões feitas durante meu Exame Geral de Qualificação do Doutorado.*

*Aos membros da banca examinadora, pela contribuição e sugestões para melhorar este trabalho.*

*A todos os funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) e, em particular, aos funcionários do Departamento de Biologia que sempre possibilitam, direta ou indiretamente, a realização das pesquisas científicas. Agradecimentos especiais ao técnico Sebastião Dias Barbosa, à Simone Carvalho Fernandes,*

*à Jucimara Colombo, ao Luís Roberto Faleiros e à Damaris de Freitas por serem sempre muito solícitos. Agradecimentos especiais também aos funcionários da Biblioteca e aos funcionários da Seção de Pós-graduação.*

*Agradeço, também, aos meus amigos de laboratório Emiliyn, Maria Clara, Priscila Paschetto, Ana Letícia, Caio e Leiza por fazerem parte desta jornada.*

*Ao órgão de Fomento CAPES pela bolsa concedida.*

*Aos meus pais, Bimbo e Lila, por todo amor e dedicação. Vocês são meus maiores incentivadores, meus pilares, minha vida. Agradeço por terem batalhado tanto para que pudesse me deixar a melhor herança de todas: a educação e o caráter. Jamais terei palavras suficientes para expressar a minha gratidão e o tamanho do meu amor por vocês, por isso, digo apenas: muito obrigada sempre e por tudo. Saibam que tudo que faço em minha vida é dedicado a vocês. Quero que se orgulhem de mim sempre, e estou em busca disso a todo o momento.*

*Aos meus amados irmãos Felipe, Hugo, Mariana e Vitor pelo amor, carinho, amizade, por serem parceiros, pelos conselhos, por me apoiarem na 'alegria e na tristeza, na saúde e na doença'. Ao Felipe por ser meu conselheiro 'master', meu biólogo preferido, meu irmão mais velho incentivador, meu 'co-orientador' informal, meu orgulho. Ao Hugo por sempre ser tão amável, prestativo, disponível e disposto, também super conselheiro, carinhoso, por me animar sempre e ser um exemplo de generosidade. Ao Vitor meu irmãozinho esebano querido, por ser tão legal, fofo, parceiro e amigo. À Mariana, minha irmã gêmea, meu 'confessionário', literalmente, minha alma gêmea, te amo!*

*À minha primeira orientadora científica, mãezona e incentivadora Sandra Morelli e à Alessandra, minha primeira co-orientadora 'informal' do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).*

*Aos amigos da minha turma de graduação em Biologia da UFU que até hoje mantenho contato e quero ter sempre perto de mim: Ritinha Carneiro, Alexandre Bonder, Clarissa, Letícia Sueiro, Luisa Domingues e Lucas Zimon.*



*Aos amigos de Londrina por, de certa forma, fazerem parte dessa trajetória acadêmica e por serem inesquecíveis: Renata Bottós, Carolzinha Cainelli, Letícia Tartaglia, Lívia Bottura, Priscila Mary, Mariana Nardy, Thiaguim, Thiago Ribers.*

*Aos amigos de Uberlândia, minha cidade natal, Mari Carneiro, Fredão, Deh e Philipim, Dani e Humberto, Ricardo, Tiago, Juninho e principalmente à Stela, minha melhor amiga!*

*Aos amigos de São José do Rio Preto, Priscila Samara, Fabi Guchi, Adalgisa, Zé, Nayara, Maiara, Japa e André.*

*Aos meus familiares queridos de Uberlândia e do Rio de Janeiro, em especial à vovó Placidina e à vovó Marise, Tia Susa e Carol e à madrinha Tia Regina.*

*À minha cunhada querida Deisi e prima/cunhada/comadre também muito querida Beatrix.*

“Science knows no country...

Knowledge belongs to humanity...

It's the torch that illuminates the world.”

Louis Pasteur

## RESUMO

*Zaprionus indianus* é um drosofilídeo nativo da região Afrotropical que colonizou o continente Sul Americano, apresentando uma ampla distribuição geográfica enquanto *Z. sepsoides* é restrita a algumas regiões africanas. As duas espécies diferem em relação ao tamanho dos testículos e dos espermatozoides que é maior em *Z. indianus* do que em *Z. sepsoides*. Com o intuito de conhecer aspectos da biologia e o grau de diferenciação destas espécies, o presente estudo avaliou a espermatogênese de machos de diferentes idades (1, 3, 5 e 8 dias) de ambas as espécies por meio de técnicas de coloração convencional e de ultraestrutura. A espermatogênese e ultraestrutura dos espermatozoides foram semelhantes nas espécies em que foi confirmado o número diploide de cromossomos com  $2n = 12$ . Entretanto, foi observada uma quantidade maior de espermatozoides em machos jovens (1 a 3 dias de idade) em *Z. indianus* do que em *Z. sepsoides*, o qual apresentou maior frequência de estágios iniciais da espermatogênese nestas idades. A porção da cabeça dos espermatozoides foi fortemente marcada nas duas espécies pela coloração por prata (AgNOR), orceína lacto-acética e pela reação de Feulgen. Quando submetidos à reação de P.A.S., os testículos de *Z. sepsoides* e *Z. indianus* apresentaram grânulos de glicogênio. As espécies possuem a mesma ultraestrutura flagelar, em que o axonema mostra um arranjo de 9+9+2 microtúbulos, com a presença de dois derivados mitocondriais de diferentes tamanhos e o número de 64 espermatozoides por feixe, em ambas as espécies. A grande semelhança observada no padrão do arranjo de microtúbulos do axonema e nos derivados mitocondriais com diferentes tamanhos nas espécies de *Zaprionus*, comparadas com outras espécies de *Drosophila*, é indicativa da conservação destas estruturas na família Drosophilidae. As diferenças observadas nos machos jovens de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* quanto a quantidade de espermatozoides e frequência de células em fases iniciais da espermatogênese são características que podem interferir no sucesso reprodutivo e adaptativo destas espécies e estar relacionadas ao maior potencial invasivo de *Z. indianus*.

Palavras-chave: *Zaprionus indianus*, *Zaprionus sepsoides*, espermatogênese, citoquímica, ultraestrutura, meiose.

## ABSTRACT

*Zaprionus indianus* is a drosophilid native to the Afrotropical region that has colonized South America. *Z. indianus* exhibits a wide geographical distribution, whereas *Z. sepsoides* is restricted to certain African regions. The two species differ in the size of their testes, which are larger in *Z. indianus* than in *Z. sepsoides*. To better understand the biology and the degree of differentiation of these species, the current study evaluated spermatogenesis in males of different ages (1, 3, 5 and 8 days old) from both species by conventional staining techniques and ultrastructural analysis. Spermatogenesis and the ultrastructure of spermatozoa were similar in the two species, for which the diploid number was confirmed to be  $2n = 12$  chromosomes. However, a greater number of spermatozoa were observed in young *Z. indianus* males (1-3 days old) than in young *Z. sepsoides* males, which showed a higher frequency of cells at the early stages of spermatogenesis at this age. A portion of the head of the sperm was strongly marked in both species by silver staining (AgNOR), lacto-acetic orcein and the Feulgen reaction. Additionally, when submitted to P.A.S. reaction, the testes of both *Z. sepsoides* and *Z. indianus* exhibited glycogen granules. The two species also presented the same flagellar ultrastructure, in which the axoneme includes a 9+9+2 arrangement of microtubules, two mitochondrial derivatives of different sizes are present and the number of spermatozoa per bundle is 64. The great similarity in the pattern of microtubule arrangement in the axoneme and in the mitochondrial derivatives of the species *Zaprionus*, as compared with other species of *Drosophila*, indicates that these structures are preserved in the family *Drosophilidae*. The differences observed between the young males of *Z. indianus* and *Z. sepsoides*, including the number and frequency of sperm cells in the early stages of spermatogenesis, are features that may interfere with reproductive success and may be related to the invasive potential of *Z. indianus*.

**Keywords:** *Zaprionus indianus*, *Zaprionus sepsoides*, spermatogenesis, cytochemistry, ultrastructure, meiosis.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	Gênero <i>Zaprionus</i>	16
1.2	Aspectos biológicos de <i>Zaprionus indianus</i>	17
1.3	Espermatogênese em Drosophilidae	17
1.4	Morfologia do testículo em Drosophilidae	20
1.5	Evolução do tamanho do espermatozoide e tamanho do testículo	22
1.6	Aspectos citogenéticos e comportamento nucleolar	23
1.7	Aspectos ultraestruturais dos espermatozoides	25
2	<b>OBJETIVOS</b>	28
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	29
4	<b>RESULTADOS</b>	31
5	<b>DISCUSSÃO</b>	55
6	<b>CONCLUSÕES</b>	60
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	62
8	<b>ARTIGO</b> Spermatogenesis of the <i>Zaprionus indianus</i> and <i>Zaprionus sepsoides</i> (Diptera: Drosophilidae): cytochemical, structural and ultrastructural characterization	71

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Zaprionus* é dividido em dois subgêneros biogeograficamente separados: subgênero *Anaprionus* Okada, com cerca de 10 espécies na região Oriental e o subgênero *Zaprionus*, com cerca de 50 espécies na região Afrotropical (OKADA; CARSON, 1983; YASSIN et al., 2008). Filogeneticamente é um gênero muito próximo ao gênero *Drosophila* (YASSIN et al., 2007, 2008, 2010; YASSIN; DAVID, 2010).

A espécie *Zaprionus indianus* (GUPTA, 1970) é original do continente africano e foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1999, sendo considerada uma espécie invasora que tem atacado plantações de figo (VILELA, 1999; TIDON et al., 2003). Após as coletas de 1999, *Z. indianus* foi detectada em diferentes localidades do Brasil (TONI et al., 2001; CASTRO; VALENTE, 2001; SANTOS et al., 2003; KATO et al., 2004; MATTOS-MACHADO et al., 2005; DAVID et al., 2006), no Uruguai (GOÑI et al., 2001) e, em 2005, *Z. indianus* foi registrado na Flórida (EUA) (VAN DER LINDE et al., 2006) e Argentina (SOTO et al., 2006).

Alguns estudos que têm examinado o potencial invasivo de *Z. indianus* incluem o ciclo de vida (AMOUDI et al., 1991; STEIN et al., 2003), competição larval (AMOUDI et al., 1993a) e componentes do valor adaptativo (AMOUDI et al., 1993b; SETTA; CARARETO, 2005) em linhagens de origem da Arábia Saudita. Estudos de aloenzimas indicam que a plasticidade na distribuição da frequência alélica do locus da *Est-3*, também pode ter contribuído para o sucesso da dispersão desta espécie pelo continente americano (GALEGO; CARARETO, 2007, 2010). No entanto, há poucos estudos sobre aspectos da biologia e reprodução (ARARIPE et al., 2004), bem como de outras espécies de *Zaprionus* (YASSIN et al., 2007; YASSIN; DAVID, 2010; YASSIN et al., 2010)

Das 49 espécies do gênero *Zaprionus*, somente três tornaram-se invasivas, *Z. indianus*, *Z. tuberculatus* e *Z. ghesquierei* (CHASSAGNARD; KRAAIJEVELD, 1991). Dentre estas

espécies *Z. indianus* é a que tem se dispersado pelos quatro continentes e é considerado um drosofilídeo com alta diversidade ecológica (YASSIN et al., 2007; YASSIN; DAVID, 2010; YASSIN et al., 2010). O hábito generalista desta espécie pode ser um dos principais fatores do sucesso de ocupação nos quatro continentes (LACHAISE; TSACAS 1983; SCHMITZ et al., 2007). Entretanto, outros fatores da história de vida (traits of life, incluindo aqui aspectos de sua reprodução e da espermatogênese), ecologia e adaptação desta espécie também devem estar envolvidos neste processo de invasão.

Caracteres masculinos que podem influenciar a habilidade competitiva do acasalamento e sucesso da fertilização são parâmetros reprodutivos que também podem interferir no potencial adaptativo das espécies. Assim, o número de espermatozoides e seu período de desenvolvimento também são fatores que podem contribuir para o potencial reprodutivo da espécie (GARCIA-GONZÁLEZ; SIMMONS, 2007; AMITIN; PITNICK, 2007).

O estudo da espermatogênese efetuado no presente trabalho, de duas espécies com dinâmica ecológica bem diferenciada, uma invasora, *Z. indianus*, a outra com distribuição restrita, *Z. sepsoides*, com morfologia testicular e tamanho de espermatozoides diferentes, evidenciou diferenças na fase de maturação dos espermatozoides, entre estas espécies, as quais poderiam causar uma diferenciação adaptativa favorecendo *Z. indianus* a explorar novos ambientes. Assim, o presente trabalho analisou a espermatogênese e a ultraestrutura dos espermatozoides de uma linhagem geográfica de *Z. indianus* e uma de *Zaprionus sepsoides* (DUDA, 1939). *Z. sepsoides* é restrita a algumas regiões do leste africano e não é considerada uma espécie invasora; além disto, apresenta tamanho testicular e do espermatozoide diferentes de *Z. indianus*.

### 1.1. Gênero *Zaprionus* Coquillett (1902)

A filogenia molecular sugere que o gênero *Zaprionus* é original do Oriente e invadiu a África (YASSIN et al., 2008, 2010). Durante o século XX, três espécies Afrotropicais invadiram a região Paleártica: *Z. indianus*, *Z. tuberculatus* e *Z. ghesquieri*. Dessas, somente *Z. indianus* invadiu as Américas, constituindo uma das espécies do gênero com maior sucesso de colonização (CHASSAGNARD; KRAAIJEVELD, 1991).

Após as coletas de Vilela (1999) no Estado de São Paulo, *Z. indianus* foi detectada em Santa Catarina (TONI et al., 2001), Rio Grande do Sul (CASTRO; VALENTE, 2001) e Uruguai (GOÑI et al., 2001), além de ter sido registrada em diferentes localidades de Minas Gerais (KATO et al., 2004). Em 2002 foi encontrada em vários estados do Nordeste (MATTOS-MACHADO et al., 2005), com registros em Tocantins e no norte do Brasil em 2003 (SANTOS et al., 2003). Nesse mesmo ano de 2003 houve registros da espécie no Panamá (América Central) e, em 2005, *Z. indianus* foi registrado na Flórida (EUA) (VAN DER LINDE et al., 2006) e Argentina (SOTO et al., 2006). Essa dispersão geográfica ampla e rápida é indicativa da grande facilidade com a qual *Z. indianus* pode colonizar novos ambientes (KARAN et al., 1999; TIDON et al., 2003; ARARIPE et al., 2004).

A questão das invasões biológicas é de interesse crescente para o campo de genética evolutiva. Vermeij (1996) classificou o processo de invasão em três etapas: chegada, estabelecimento e integração. Em muitos casos de invasões biológicas a primeira etapa tem sido facilitada pelo homem, direta ou indiretamente, através do transporte de passageiros e mercadorias. As últimas duas etapas, no entanto, dependem de características intrínsecas da espécie invasora e assumem que esta esteja respondendo a um regime seletivo e, mais ainda, esteja se tornando parte desse regime por sua interação com outras espécies da comunidade.



A partir daí, estudos acerca da invasão de *Z. indianus* no Brasil tornaram-se interessantes e nos levam a questionar quais as características biológicas e reprodutivas que contribuem para o sucesso de sua colonização e expansão geográfica.

## **1.2. Aspectos biológicos de *Zaprionus indianus***

O adulto de *Z. indianus* mede de 2-3 mm de comprimento, apresentando na cabeça e no corpo faixas longitudinais brancas bordejadas de estreitas faixas negras, que contrastam fortemente com as áreas castanhas adjacentes (GUPTA, 1970).

O trabalho de Araripe et al. (2004) avaliou que a tolerância térmica de *Z. indianus*, medida por meio de limites de temperatura, induz a esterilidade do macho. Os machos desta espécie são mais tolerantes ao frio e levam o mesmo tempo para recuperar a fertilidade, tanto quando submetidos a um estresse de temperatura baixa quanto a um estresse de temperatura alta. Assim, foi visto que temperaturas próximas a 25°C são ótimas para o desenvolvimento de *Z. indianus* (de ovo a adulto), permitindo curto tempo de desenvolvimento e alta viabilidade (KARAN et al., 1999; STEIN et al., 2003; SETTA; CARARETO, 2005; NAVA et al., 2007).

Além disso, aspectos como ciclo de vida (AMOUDI et al., 1991; STEIN et al., 2003), competição larval (AMOUDI et al., 1993a) e componentes do valor adaptativo (AMOUDI et al., 1993b; SETTA; CARARETO, 2005) em linhagens de *Z. indianus* de origem da Arábia Saudita ajudam a explicar o potencial invasivo dessa espécie de Drosophilidae.

## **1.3. Espermatogênese em Drosophilidae**

A espermatogênese é um processo biológico de modificação gradual de células germinativas em espermatozoides dentro dos testículos. Esse processo envolve proliferação

celular por repetidas divisões mitóticas, duplicação das cromátides, divisão reducional por divisão meiótica para produzir espermátides haploides, e diferenciação terminal das espermátides em espermatozoides.

Assim, a espermatogênese pode ser dividida em: proliferação, divisões reducional e equacional (na meiose) e diferenciação. Essas fases também são associadas com tipos de células germinativas específicas, isto é, espermatogônias, espermatócitos e espermátides.

A organização dos testículos e o processo da espermatogênese de *Drosophila melanogaster* e de outros drosofilídeos são conhecidos em detalhes (COOPER, 1950; HARDY et al., 1979; LINDSLAY; TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993; BARREAU et al., 2008)

A primeira etapa da espermatogênese envolve a divisão de uma célula tronco espermatogonial (linhagem germinativa) e a divisão de duas células tronco somáticas (SCHARER et al., 2008).

No ápice do testículo da drosófila, há dois tipos de células tronco, linhagem germinativa de células tronco (“germinative stem cells”-GSCs) e linhagem somática de células tronco (“somatic stem cells”- SSCs; são também conhecidas como células progenitoras do cisto). Essas células são responsáveis por produzir células germinativas diferenciadas e células somáticas do cisto, respectivamente. Cada uma das células GSCs, é unida a células somáticas de sustentação, chamadas em conjunto de células “hub” por possuírem forma de cubo. Essas células cúbicas estão ancoradas no ápice testicular por extensões da lâmina basal e as células tronco (SSC) estão firmemente atadas em um arranjo radial ao redor dessas células cúbicas (HARDY et al., 1979; LINDSLEY; TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993; GÖNCZY et al., 1997; TULINA; MATUNIS, 2001; LI; XIE, 2005; SCHARER et al., 2008).

Durante essas divisões as células mães permanecem ligadas às células somáticas “hub” (células cúbicas) e as células filhas juntas formam um cisto, no qual as duas células somáticas

se juntam e se fecham para formar uma nova célula germinativa (células em trânsito). O restante da espermatogênese ocorre dentro de cada cisto (Figura 1).

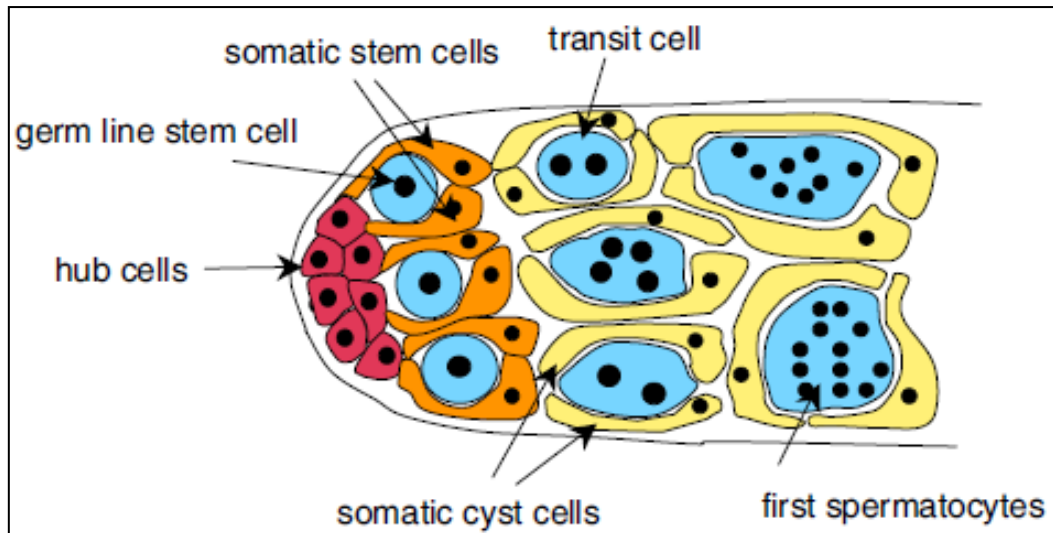


Figura 1. Organização do ápice testicular de *Drosophila melanogaster*. Esquema adaptado de SCHARER et al., 2008.

À medida que o desenvolvimento ocorre, esses cistos são deslocados do ápice pela contínua geração de estágios anteriores nessa região do testículo (COOPER, 1950; LINDSLAY; TOKUYASU, 1980; GÖNCZY; DINARDO, 1996; MAINES; WASSERMAN, 1997; GÖNCZY et al., 1997; HARDY et al., 1979; FULLER, 1993; LI; XIE, 2005; SCHARER et al., 2008).

Durante a proliferação, as células primordiais dos testículos, diploides, aumentam em quantidade por mitoses consecutivas e formam as espermatogônias. Cada espermatogônia passa por quatro divisões mitóticas gerando 16 espermatogônias. Um pequeno aumento no volume do citoplasma das espermatogônias as converte em espermatócitos de primeira ordem, também chamados espermatócitos primários ou espermatócitos I, também diploides e que se diferenciam dentro de um cisto. Cada um desses 16 espermatócitos passam por divisões

meióticas, resultando num cisto de 64 espermátides circulares haploides. A divisão reducional corresponde ao período de ocorrência das meioses nos espermatócitos primários e secundários. A diferenciação corresponde à espermiogênese, processo que converte as espermátides em espermatozoides (COOPER, 1950; BAIRATI, 1968; MEYER, 1974; HARDY et al., 1979; LINDSLAY; TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993; JOLY; BRESSAC, 1994; GÖNCZY; DINARDO, 1996; GÖNCZY et al., 1997; MAINES; WASSERMAN, 1997; REX, 1999; TULINA; MATUNIS, 2001; BARREAU et al., 2008; CHENG; MRUK, 2010).

Assim, espécies dentro do gênero *Drosophila* e de outras espécies da família Drosophilidae, como do gênero *Zaprionus*, são um modelo atrativo para estudo de espermatogênese, além de que muitos mecanismos envolvidos na espermatogênese de mamíferos são preservados nas moscas (WHITE-COOPER, 2009).

O estudo de características da espermatogênese das espécies do gênero *Zaprionus*, pode elucidar aspectos de sua reprodução e de seu desenvolvimento, além de observações acerca dos aspectos evolutivos do espermatozoide, podendo auxiliar na construção de hipóteses para o sucesso de *Z. indianus* desde as etapas iniciais de invasão.

#### **1.4. Morfologia do testículo em Drosophilidae**

Na família Drosophilidae o desenho básico dos órgãos reprodutivos internos do macho é muito simples comparando com as partes externas do trato reprodutivo (DAVEY, 1985). Tipicamente, cada par de testículos abre em um ducto espermático, parte do qual é dilatado para formar a vesícula seminal (COOPER, 1950) (Figura 2).

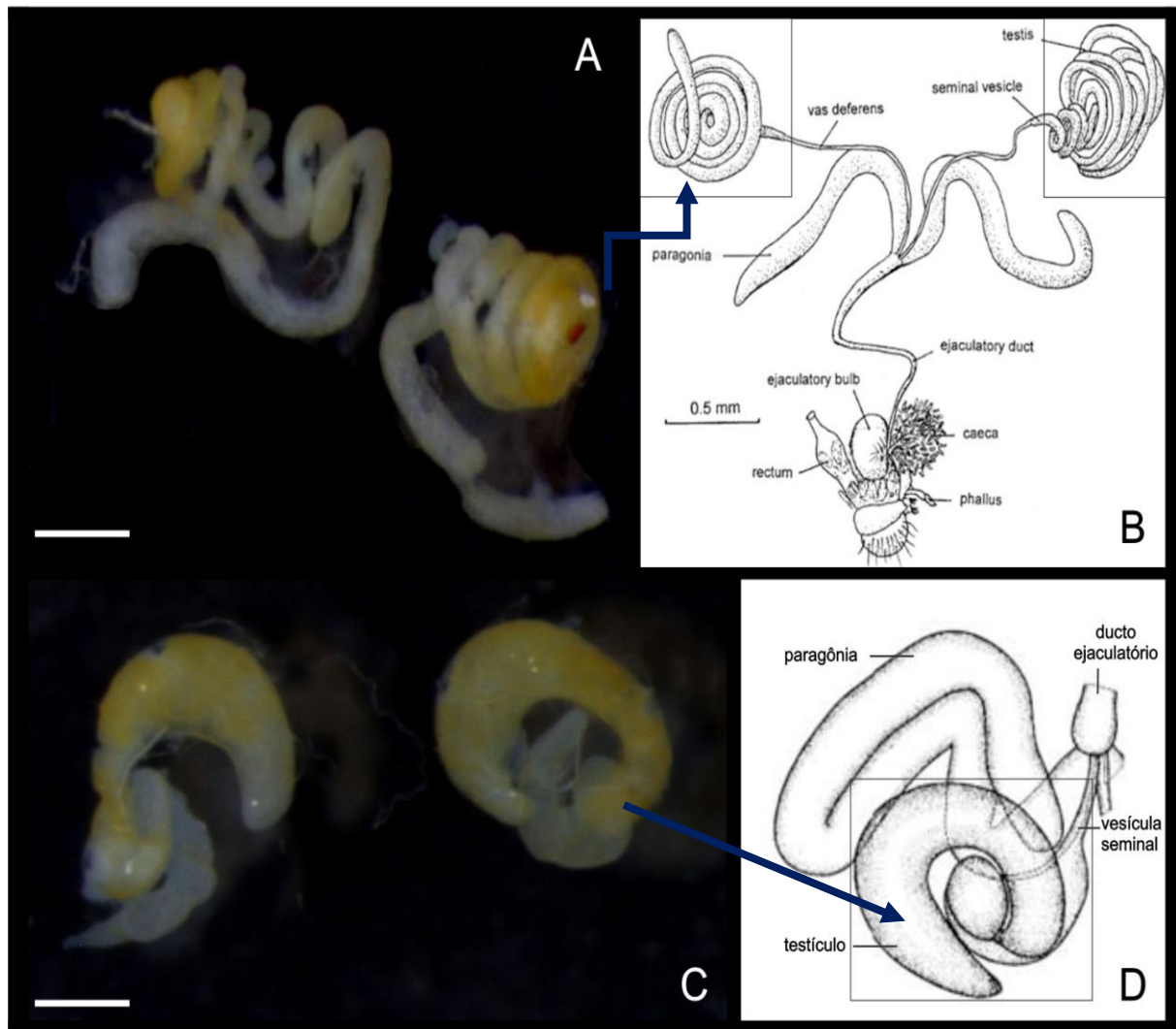


Figura 2. Testículos de *Zaprionus indianus* (A e B) e *Zaprionus sepsoides* (C e D). B = Esquema adaptado de ARARIPE et al., 2004; C = Esquema adaptado de YASSIN; DAVID, 2010. Barras correspondem a 0.5 mm.

### 1.5. Evolução do tamanho do espermatozoide e tamanho do testículo

Na família Drosophilidae o desenho básico dos órgãos reprodutivos internos do macho é muito simples comparando com as partes externas do trato reprodutivo (DAVEY, 1985). Tipicamente, cada par de testículos abre em um ducto espermático, parte do qual é dilatado para formar a vesícula seminal (COOPER, 1950). A vesícula seminal, então, conecta-se com o ducto ejaculatório. As diferenças consideráveis no comprimento dos testículos das espécies dessa família (JOLY; BRESSAC, 1994; JOLY et al., 2004) estão correlacionadas positivamente com o comprimento dos espermatozoides (JOLY; BRESSAC, 1994; PITNICK; MARKOW, 1994b; PITNICK, 1996; PITNICK; MILLER, 2000) que varia desde 77  $\mu\text{m}$  em *D. persimilis* (SNOOK, 1997) a 6 cm em *D. bifurca* (PITNICK et al., 1995), bem como o tamanho do espermatozoide em relação ao tamanho do receptáculo da fêmea.

A variação nas fêmeas envolve órgãos e estruturas internas que recebem e manipulam o espermatozoide, mais que aquelas envolvidas com a mecânica e a física da liberação do espermatozoide durante a cópula. Espermatozoides continuam a sofrer pressões seletivas e/ou competitivas dentro do trato reprodutivo feminino, e essa interação com o ambiente feminino pode ser uma grande força seletiva agindo nos tratos reprodutores femininos e masculinos (JOLY; SCHIFFER, 2010).

Amitin e Pitnick (2007) sugeriram que a evolução da escolha feminina por determinado espermatozoide baseia-se em seu tamanho e, assim, espermatozoides longos apresentariam maior custo em serem produzidos em *Drosophila*, mas possuiriam vantagem competitiva na fertilização sobre espermatozoides menores. Essa hipótese de que espermatozoides grandes poderiam aumentar o potencial competitivo de um ejaculado ou promover a escolha feminina, poderia ser porque espermatozoides grandes, entre outras razões, se movimentariam mais rápido, sendo mais efetivo no deslocamento dentro do trato

reprodutivo da fêmea. O tamanho da espermateca feminina, então, influenciaria o padrão da seleção, podendo direcionar o tamanho do espermatozoide (SNOOK, 2005).

García-González et al. (2007) estudaram o papel da variação natural no tamanho do espermatozoide e seu sucesso de fertilização no besouro *Onthophagus taurus*. Descobriram que o sucesso de fertilização foi maior em machos com espermatozoides relativamente pequenos. Mas essa seleção no tamanho do espermatozoide foi dependente da morfologia do trato reprodutivo feminino.

Dessa forma, o tamanho do testículo envolve a resposta à demanda na produção de espermatozoides pela competição espermática e a maquinaria do testículo pode reagir a diferentes demandas de produção espermática, uma mudança que pode refletir no tamanho do testículo (SCHARER et al., 2008; VARRED et al., 2011). Assim, a evolução do tamanho do espermatozoide representa o resultado da seleção sexual pós-copulatória, mais especificamente de uma complexa interação entre competição espermática e escolha críptica da fêmea. Então, é possível que a seleção sexual possa influenciar a arquitetura testicular, quando está relacionada à seleção do tamanho do espermatozoide ou ao número de espermatozoides produzidos. Como consequência da variação na seleção sexual, o testículo não somente produz diferentes números de células, mas também células de alta complexidade e variação morfológica, significando que o testículo está sob variadas e rápidas mudanças da pressão seletiva (SCHARER et al., 2008).

#### **1.6. Aspectos citogenéticos e comportamento nucleolar**

Apesar da grande importância ecológica e evolutiva do gênero *Zaprionus*, estudos citogenéticos em cromossomos não politênicos têm sido negligenciados neste grupo, uma vez que somente o número cromossômico foi estudado em poucos casos, evidenciando o número

diploide de 12 cromossomos (10A+XY) para as seguintes espécies: *Z. vittiger*, *Z. ghesquieri*, *Z. multistriatus*, *Z. sepsoides*, *Z. argentoistriatesus* e *Z. tuberculatus* (ver em GUPTA; KUMAR, 1987). Já aspectos citogenéticos e moleculares relacionados a cromossomos politênicos de espécies de *Zaprionus* são mais frequentemente analisados (GUPTA; KUMAR, 1987; HATCH; JEFFERY, 1992; SU et al. 1992; ANANINA et al., 2007; CAMPOS et al., 2007).

Estudos citogenéticos de cromossomos politênicos no gênero *Zaprionus* mostraram que o padrão de cinco longos cromossomos e um sexto cromossomo menor correlacionados com cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par menor de cromossomos são características das poucas espécies estudadas do gênero *Zaprionus* (SCIANDRA et al., 1973; SU et al., 1992; HATCH; JEFFERY, 1992).

O nucléolo é uma estrutura dinâmica que está relacionada com a compartimentalização das funções do núcleo (HERNADEZ-VERDUN, 1991), sendo considerado um subcompartimento nuclear altamente organizado, não envolto por membrana, apresentando número, forma e tamanhos variáveis, de acordo com a atividade celular e é onde ocorre a síntese de RNA ribossômico (GERBI et al., 2003). Dessa maneira, o nucléolo se forma ao redor de grupos de repetições do gene de RNA ribossômico (RNAr) durante o final da telófase, persiste em intérfase e se desfaz assim que a célula entra em divisão (LAM et al., 2005). Algumas atividades celulares estão ligadas ao nucléolo como síntese e processamento de RNAr e RNA transportador, reparo no dano de DNA, captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico e regulação da estabilidade proteica (OLSON et al., 2002; LAM et al., 2005; PEDERSON, 2010). O nucléolo interfásico encontra-se organizado ao redor de regiões cromossômicas denominadas Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) ou NORs (do inglês *Nucleolar Organization Regions*), que são regiões do DNA responsáveis pela transcrição de RNA ribossômico e podem ser identificadas, de forma



indireta, pela técnica de impregnação pelo nitrato de prata. Nesta técnica são coradas as proteínas residuais que permaneceram aderidas às NORs, após as atividades transcricionais desta região para a formação do nucléolo, sendo uma das mais empregadas em estudos citogenéticos (MILLER, 1977).

Sabe-se que o tamanho e o número de nucléolos e corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e podem refletir, então, diferenças metabólicas e funcionais.

### **1.7. Aspectos ultraestruturais dos espermatozoides em Drosophilidae**

Os espermatozoides são células geralmente pequenas, compactadas e altamente especializadas na fertilização do óvulo. São otimizadas para transferir o material genético paterno para o óvulo, processo essencial na transmissão da hereditariedade e posterior desenvolvimento do organismo. Caracterizam-se por serem células dotadas de um flagelo, cujo papel principal é impulsioná-las através do meio fluido. É uma célula altamente complexa e tem passado por diversas modificações morfológicas ao longo dos processos evolutivos (BACCETTI; AFZELIUS, 1976).

O espermatozoide de *Drosophila* possui forma filiforme e núcleo alongado, seguido de uma longa cauda (PEROTTI, 1969). Embora alguns constituintes dos espermatozoides variem em forma e posição, a estrutura geral do espermatozoide na família Drosophilidae é relativamente bem conservada entre as espécies. Em contraste, o tamanho dos núcleos e da cauda são altamente variáveis entre espécies. O comprimento total do espermatozoide mede 3.7 mm em *Zaprionus tuberculatus*, cerca de 2 mm em *Drosophila melanogaster* e 1.2 mm em *D. simulans*, (JOLY et al., 2004). Já em *D. hydei* o espermatozoide mede 23 mm e em *D. bifurca* chega a 58.29 mm (PITNICK et al., 1995b).

As observações realizadas nos flagelos de espermatozoides de diferentes espécies de *Drosophila* contribuíram para o estudo da organização estrutural do axonema (Ax) desse grupo de dípteras (PEROTTI, 1969; KIEFER, 1970; DALLAI; AFZELIUS, 1991). A estrutura e organização do espermatozoide em *Drosophila* é caracterizada pela presença de: acrossoma localizado lateralmente ao núcleo, cromatina nuclear bastante compactada, centríolo, dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes preenchidos por material paracristalino e um axonema com o arranjo 9+9+2 de microtúbulos, que é o arranjo usual de 9+2 microtúbulos circundados por nove microtúbulos acessórios adicionais, ou seja, um par de microtúbulos centrais, nove microtúbulos duplos periféricos (formados por fibrila A e fibrila B) e nove microtúbulos acessórios (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972; JAMIESON et al., 1999).

Na maioria dos insetos o padrão organizacional do axonema segue o arranjo 9+9+2. Em algumas espécies de insetos há variação nos elementos centrais do axonema, como em mosquitos é comum o arranjo 9+9+1, enquanto na ordem dos efemerópteros (libélulas), predomina o esquema 9+9+0 (PHILLIPS, 1970). No entanto, os microtúbulos duplos periféricos parecem ser uma característica conservada em todas as caudas de espermatozoides de dípteras (DALLAI et al., 1993).

Durante a espermatogênese as mitocôndrias assumem diferentes morfologias e em insetos, a regularidade nas formas da mitocôndria é notável (PHILLIPS, 1970). No decorrer da espermatogênese as mitocôndrias sofrem mudanças morfológicas, onde a estrutura típica da mitocôndria é completamente modificada. Logo após a meiose há o início de uma série de fusões e rearranjos das mitocôndrias formando o complexo mitocondrial que é frequentemente denominado “Nebenkern”, especialmente em trabalhos mais antigos (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972). No decorrer da espermatogênese, ocorre a divisão do complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais, que no processo de alongamento do

espermatozoide posicionam-se bilateralmente em relação ao axonema (LINDSLEY; TOKUYASU, 1980).

A diferenciação mitocondrial resultando em um ou dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes varia de espécie para espécie. Em algumas ordens como Trichoptera somente um derivado mitocondrial é encontrado (PHILLIPS, 1970). Em espermatozoides de dípteros da família Drosophilidae, dois derivados mitocondriais de diferentes tamanhos são característicos e em outros dípteros como os das famílias Culicidae e Simullidae são encontrados dois derivados mitocondriais de tamanhos iguais (PHILLIPS, 1970).

Durante o processo de diferenciação, os derivados mitocondriais são preenchidos ao longo de sua extensão por uma estrutura de natureza proteica, organizada num padrão paracristalino, e muitas espécies de insetos acumulam estas estruturas nas mitocôndrias durante a espermiogênese (PHILLIPS, 1970). Esta estrutura paracristalina é formado por uma proteína rica em prolina (BACCETTI et al., 1977). Várias são as funções sugeridas aos derivados mitocondriais dos espermatozoides de insetos, podendo participar no controle e regulação da forma do movimento flagelar e estando relacionados com o processo de estocagem e liberação de energia necessária para a motilidade flagelar (PHILLIPS, 1970).

As diferenças observadas nos machos jovens de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* quanto a quantidade de espermatozoides e frequência de células em fases iniciais da espermatogênese são características que podem interferir no sucesso reprodutivo e adaptativo destas espécies e estar relacionadas ao maior potencial invasivo de *Z. indianus*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Ampliar os estudos sobre a biologia de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* por meio da espermatogênese e espermiogênese e identificar características que possam ajudar a entender o alto poder de adaptação de *Zaprionus indianus* a vários ambientes, refletida pelo sucesso de sua invasão em diferentes continentes.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- a) Descrever as fases da espermatogênese de ambas as espécies, utilizando técnicas citoquímicas de coloração com orceína lacto - acética, coloração com azul de toluidina, reação de P.A.S. e reação de Feulgen, em machos de diferentes idades.
- b) Avaliar o comportamento nucleolar durante a espermatogênese, por meio da técnica de impregnação pelo nitrato de prata.
- c) Analisar por meio de microscopia eletrônica de transmissão, os aspectos da espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozoides das espécies estudadas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Procedência dos insetos**

Foram utilizadas uma linhagem de *Zaprionus indianus* procedente de Ubatuba/SP, Brasil, e uma linhagem de *Zaprionus sepsoides* procedente da África, região do Congo, cedida pelo Prof. Dr. Jean David (CNRS/Gif-sur-Yvette/França).

#### **Medidas dos testículos**

Medidas lineares de um total de 24 testículos de cada espécie foram feitas onde os pares de testículos foram obtidos de 12 pares de machos adultos, com oito dias de idade, de *Z. indianus* e *Z. sepsoides*. Para medir de maneira linear foi necessário desenrolar os testículos dos indivíduos de *Z. indianus*, já que os mesmos possuem forma de espiral.

#### **Preparação das lâminas e técnicas citoquímicas**

Nestas análises os testículos das duas espécies foram retirados de machos com diferentes idades (de 1 a 8 dias), corados com orceína lacto - acética de acordo com De Vaio et al. (1985) e impregnados com nitrato de prata de acordo com Howel e Black (1980), modificado. Após o preparo usual das lâminas, o procedimento para as duas espécies para a Reação de Feulgen foi seguido de acordo com Mello e Vidal (1980), com modificações.

A análise estrutural e ultraestrutural foi feita de acordo com Cotta-Pereira et al. (1976), com modificações. Os testículos de adultos de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* foram retirados desses insetos em diferentes fases de desenvolvimento (1, 3, 5 e 8 dias de vida) e foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato a 0,2M,

pH 7,4. Após a fixação inicial por 4 horas em geladeira, o material foi lavado três vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, durante 15 minutos, e, em seguida, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão, por 2 horas em geladeira e em frasco escuro vedado. Após esse procedimento, o material foi lavado três vezes em água destilada, durante 5 minutos em cada banho. Posteriormente, iniciou-se o processo de desidratação do material em sequência crescente de soluções de acetona (acetona 30%, 50%, 70% e 90% por 15 minutos em cada solução; na sequência, acetona 95% e 100%, três vezes, por 15 minutos, cada vez). Após a desidratação, o material foi embebido em uma mistura de resina (*Araldite*®) e acetona 100% (1:1), e deixado overnight à temperatura ambiente. Em seguida retirou-se a mistura *Araldite*®/acetona 100% (1:1) e depois ocorreu a inclusão em resina na estufa a 37° C por 2 horas. Depois os testículos foram retirados dos frascos contendo a resina pura e iniciou-se o processo de inclusão no molde. Em seguida, colocou-se a placa contendo o molde em estufa a 60°C por 72 horas (processo de polimerização).

Os cortes semifinos de 0,5µm foram corados com de azul de toluidina 1% e analisados em microscópio de luz; os cortes ultrafinos de 70nm foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados em microscópio eletrônico de transmissão.

Para a reação de P.A.S., após o preparo das lâminas para a análise estrutural, o seguinte procedimento foi seguido para as duas espécies (MELLO; VIDAL, 1980, com modificações): foram gotejadas sobre os cortes semi-finos de 0,5 µm, uma solução de ácido periódico a 0,5% em estufa a 60°C, por 14 minutos e, em seguida, elas foram lavadas em água destilada corrente por 5 minutos. Adicionou-se o reativo de Shiff em placas de Petri protegidas da luz em estufa a 60°C, por 45 minutos. Daí por diante, foram dados três banhos com água destilada, por 5 minutos cada um. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar, montadas em verniz cristal e analisadas em microscópio de luz.

O material submetido às técnicas citoquímicas e citogenéticas convencionais foi analisado por meio de observação das lâminas ao microscópio de luz (*Olympus BX40*), com sistema analisador de imagem *Axiovision LE*, Versão 4.8 para *Windows*, do laboratório de Biologia Celular (IBILCE-UNESP-São José do Rio Preto). O material submetido às técnicas histológicas foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão-JEOL 1011 operado a 80kv, da Central de Microscopia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Morfologia dos testículos de *Zaprionus indianus* e *Zaprionus sepsoides***

Os testículos de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* apresentaram uma coloração amarela (Figuras 2A e 2C, respectivamente). Em *Z. indianus* são formados por dois tubos enovelados com cerca de 5 mm de comprimento cada um (Figura 2A). Em *Z. sepsoides* os testículos são dois tubos de aparência reniforme com cerca de 2 mm de comprimento cada um (Figura 2C).

### **4.2. Coloração com orceína lacto - acética e reação de Feulgen**

- **Espermatogênese em *Zaprionus indianus***

Na parte apical dos testículos observou-se um grande número de células em divisão. Na prófase I, os núcleos dos espermatócitos primários em diplóteno/diacinese apresentaram os cromossomos dispostos em anel circular ( $2n = 12; 10A+XY$ ), com associações entre si e os cromossomos sexuais separados desse anel (Figura 3B). Apresentaram também quiasmas intersticiais conferindo sua disposição em forma de cruz (Figuras 3C-E e 3L). As metáfases I da meiose mostraram os cromossomos bivalentes em um arranjo circular no núcleo (Figuras 3F e 3M-N). Durante a anáfase meiótica foi possível discriminar alguns cromossomos

acrocêntricos migrando para os polos da célula (Figuras 3G e 3O). Na telófase I o material genético mostrou-se difuso no centro do núcleo (Figuras 3H e 3P). Ao término da telófase II, observou-se a formação de quatro núcleos haploides (Figura 3I), originando as espermatídes. Por fim, durante o processo da espermiogênese, essas espermatídes sofreram alongamento (Figuras 3J e 3Q) e se organizaram em longos feixes de espermatozoides (Figuras 3K e 3R).

- **Espermatogênese em *Zaprionus sepsoides***

Durante a prófase I, na fase diplóteno/diacinese os cromossomos estavam dispostos em um anel circular, com associações entre si e os cromossomos sexuais separados desse anel (Figuras 4B e 4N-O). Ainda na fase diplóteno/diacinese quiasmas duplo terminais conferem aos cromossomos a morfologia arredondada (Figura 4C). Ainda em diplóteno/diacinese, os cromossomos apresentaram quiasmas intersticiais conferindo sua disposição em forma de cruz (Figura 4M). As metáfases I da meiose mostraram seis pares de cromossomos bivalentes ( $2n=10A+XY$ ) (Figuras 4D-E e 4P-Q). Na anáfase foi possível observar cromossomos migrando para os polos da célula (Figura 4F). Na telófase I o material genético mostrou-se difuso no centro do núcleo (Figura 4G). Ao término da telófase II, observou-se a formação de quatro núcleos haploides (Figura 4H), originando as espermatídes. Por fim, essas espermatídes sofreram alongamento (Figura 4I) e em uma fase posterior se organizaram em curtos feixes de espermatozoides (Figuras 4K e 4S-T). Esses feixes de espermatozoides mostraram forte coloração e concentração de material genético em sua extremidade anterior, que correspondem aos núcleos desses espermatozoides em individualização (Figuras 4J-K e 4S-T), indicando a presença de moléculas carregadas positivamente dos grupos amina de resíduos dos aminoácidos proteicos ( $-NH_3^+$ ), por conta da coloração com orceína lacto -



acética, bem como a presença de grupos aldeídos, por conta da reação produzida pelo reativo de Schiff.

#### **4.3. Impregnação por prata (AgNOR) em células de *Z. indianus* e *Z. sepsoides***

Foram observadas células em variadas fases da espermatogênese impregnadas com prata. Em *Z. indianus* foram vistos espermatócitos no estágio inicial da prófase I mostrando corpúsculos nucleolares espalhados por todo o núcleo das células (Figuras 5A-D). Espermátides em um estágio mais avançado de alongamento não apresentaram impregnação específica ao longo de todo o seu comprimento (Figuras 5E-F), enquanto espermatozoides organizados em feixes longos com extremidades fortemente coradas pela AgNOR foram vistos com bastante frequência (Figuras 5G-H).

Em *Z. sepsoides* foram observados espermatócitos em prófase com os núcleos corados pelo nitrato de prata. Esses núcleos apresentaram corpúsculos nucleolares impregnado pela prata (Figuras 5I-L). Espermátides em um estágio mais avançado de alongamento não apresentaram impregnação específica ao longo de todo o seu comprimento (Figuras 5M-N). Os feixes de espermatozoides apresentaram-se distribuídos em todas as direções (Figura 5S), com as regiões das cabeças dos espermatozoides fortemente marcadas pela prata (Figuras 5O-U). Notou-se claramente a diferença de morfologia entre as células em prófase I, espermátides alongadas e espermatozoides (Figura 5V). Espermatozoides foram vistos entrelaçando-se uns nos outros (Figuras 5X-Z).

#### **4.4. Análise estrutural e ultraestrutural dos testículos e da espermatogênese de *Z. indianus* e *Z. sepsoides***

Foram analisados testículos de *Z. sepsoides* e *Z. indianus* em diferentes fases de desenvolvimento (1, 3, 5 e 8 dias de vida). Foi observado que as duas espécies possuem células em divisão e espermatozoides nos machos de diferentes idades. No entanto, células em divisão (espermatócitos) e em processo de alongamento (espermátides) são mais facilmente encontradas nos primeiros dias de vida do que com mais de cinco dias, onde são vistos espermatozoides com maior frequência, isto para *Z. sepsoides* foi mais evidente que em *Z. indianus*, que mostrou uma abundância maior de espermatozoides em machos jovens (1 a 3 dias), com poucas células nos estágios iniciais da espermatogênese.

Nos testículos das duas espécies foram identificadas diversas estruturas celulares diferenciadas que são descritas a seguir. Camada de revestimento (cr): camada externa de células envolvendo cada órgão de maneira contínua. Essas células estão separadas do interior do testículo por um envoltório (en), na qual se alinha os espermatócitos e as células espermatogoniais. Centro germinativo (Cg): local onde foi observada uma quantidade considerável de células germinativas, identificadas no ápice do testículo (ap) das duas espécies de *Zaprionus* estudadas (Figuras 6A-B e 5D e Figuras 8A-C). O conteúdo testicular foi dividido em duas partes: células germinativas no ápice do testículo e o restante do testículo preenchido pelas células correspondentes as outras fases da espermatogênese (Figuras 6A e 8B-C).

Principalmente nos testículos de *Z. sepsoides* foram observados grânulos fortemente corados, os quais podem ser grânulos de glicogênio, segundo dados da literatura. A presença de carboidratos nesses grânulos foi confirmada realizando-se a técnica de P.A.S. nesses testículos (Figura 9B).

Em *Z. indianus* não foi possível observar ao longo do testículo a localização das sucessivas fases da espermatogênese, talvez pela característica morfológica e tamanho deste órgão (em espiral) nesta espécie, que dificultou uma preparação adequada para a observação nos cortes ultrafinos ou porque o pico das fases iniciais pode ter ocorrido em estágios anteriores como, por exemplo, nas pupas. Em regiões como o ápice testicular, foram vistas muitas espermátides circulares e alongadas ocupando todo o interior dessa parte do órgão. Nas outras regiões, foram observados feixes de espermatozoides distribuídos em todas as direções (Figuras 6A-B e 7A-B).

Em *Z. sepsoides* observou-se a localização de algumas fases da espermatogênese, com células em divisão ocupando toda a porção apical do testículo, juntamente com a presença de muitos grânulos (Figura 9B). Logo em seguida, foi localizada uma massa de espermátides e, adiante, ocupando todo o restante do interior do testículo, feixes de espermatozoides distribuídos em todas as direções (Figuras 9A-C).

Pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível observar que o testículo é composto de uma camada externa de revestimento, circundando o envoltório nas duas espécies estudadas (Figuras 10A, 10C e 11A).

A diferenciação das espermátides nas duas espécies ocorre em sincronia dentro dos cistos, portanto estas se encontram no mesmo estágio de maturação (Figuras 10A-B e Figuras 11A-B). Dessa maneira, um fator relevante observado ultraestruturalmente foi o número constante de 64 espermatozoides por feixe em *Z. indianus* (Figuras 10A-B) e em *Z. sepsoides* (Figuras 11A-B).

A ultraestrutura dos espermatozoides de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* revelou que o axonema de ambas as espécies possui o arranjo de 9+9+2: um par de microtúbulos centrais, nove microtúbulos duplos periféricos (formados por fibrila A e fibrila B), nove microtúbulos acessórios adicionais, além de nove 'spokes' (Figuras 10G-H e 11D-E, respectivamente). Foi

visto também que próximo ao axonema, dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes estão presentes em ambas as espécies (Figuras 10B, 10D-G e Figuras 11B-D). O derivado mitocondrial de maior tamanho contém material paracristalino bem evidente principalmente em *Z. indianus* (Figuras 10D-E).

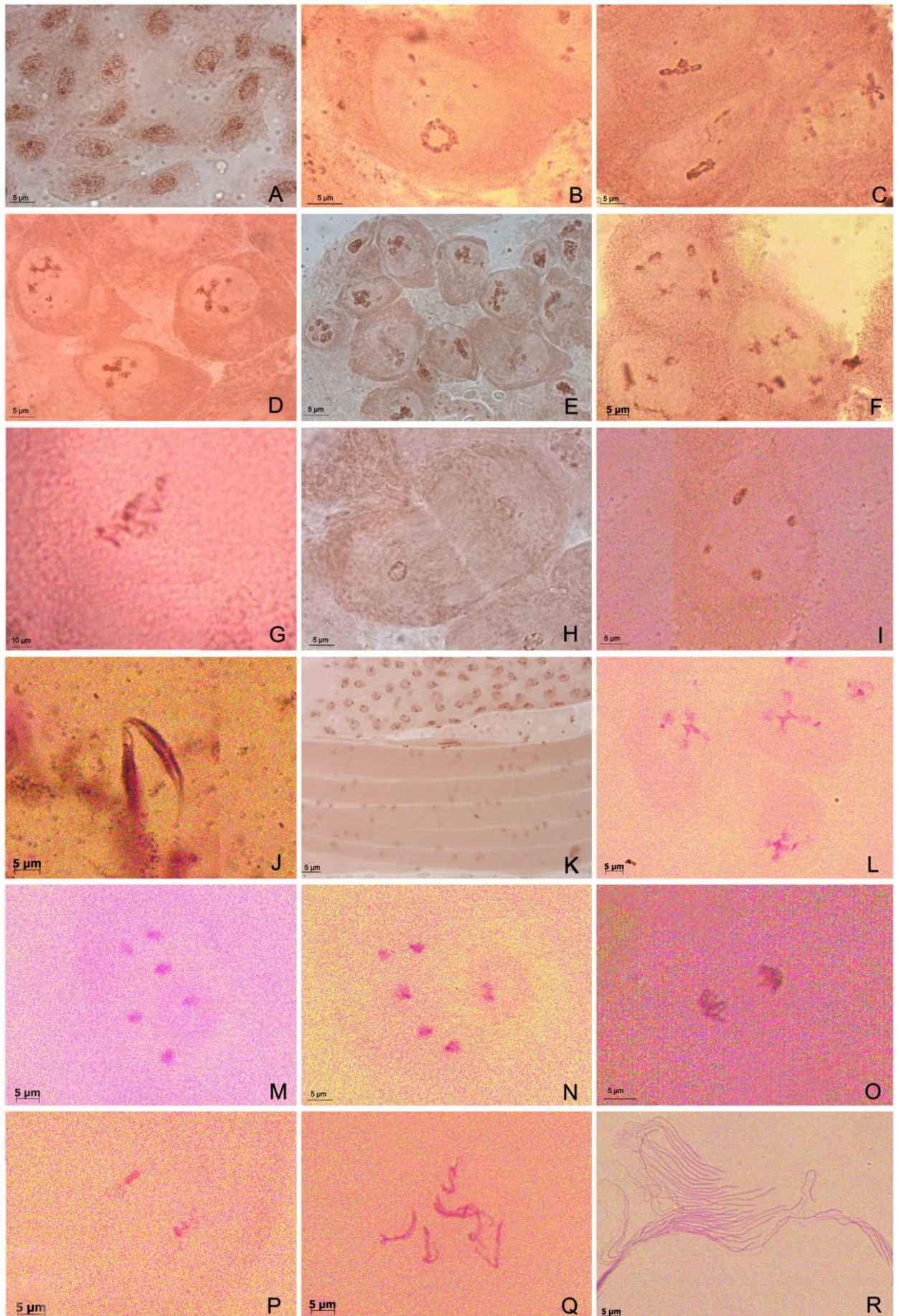


Figura 3.

**Figura 3. A-R.** Células de testículos de *Zaprionus indianus* coradas com orceína lacto – acética (**A-K**) e submetidas à reação de Feulgen (**L-R**). **A.** Intérfase com região correspondente ao nucléolo deslocada para a periferia do núcleo. **B.** Prófase I (diplóteno/diacinese), mostrando os cromossomos dispostos em um anel circular, e os cromossomos sexuais separados desse anel. **C, D, L.** Diplóteno/diacinese com quiasmas intersticiais que conferem aos cromossomos morfologia em forma de cruz; **E, F, M, N.** Metáfases I da meiose mostrando os seis pares de cromossomos bivalentes. **G, O.** Anáfase meiótica; **H, P.** Telófase I mostrando o material genético no centro de cada núcleo; **I.** Telófase II e a formação de quatro núcleos haploides; **J, Q.** Espermátides alongadas; **K, R.** Espermatozoides organizados em longos feixes.

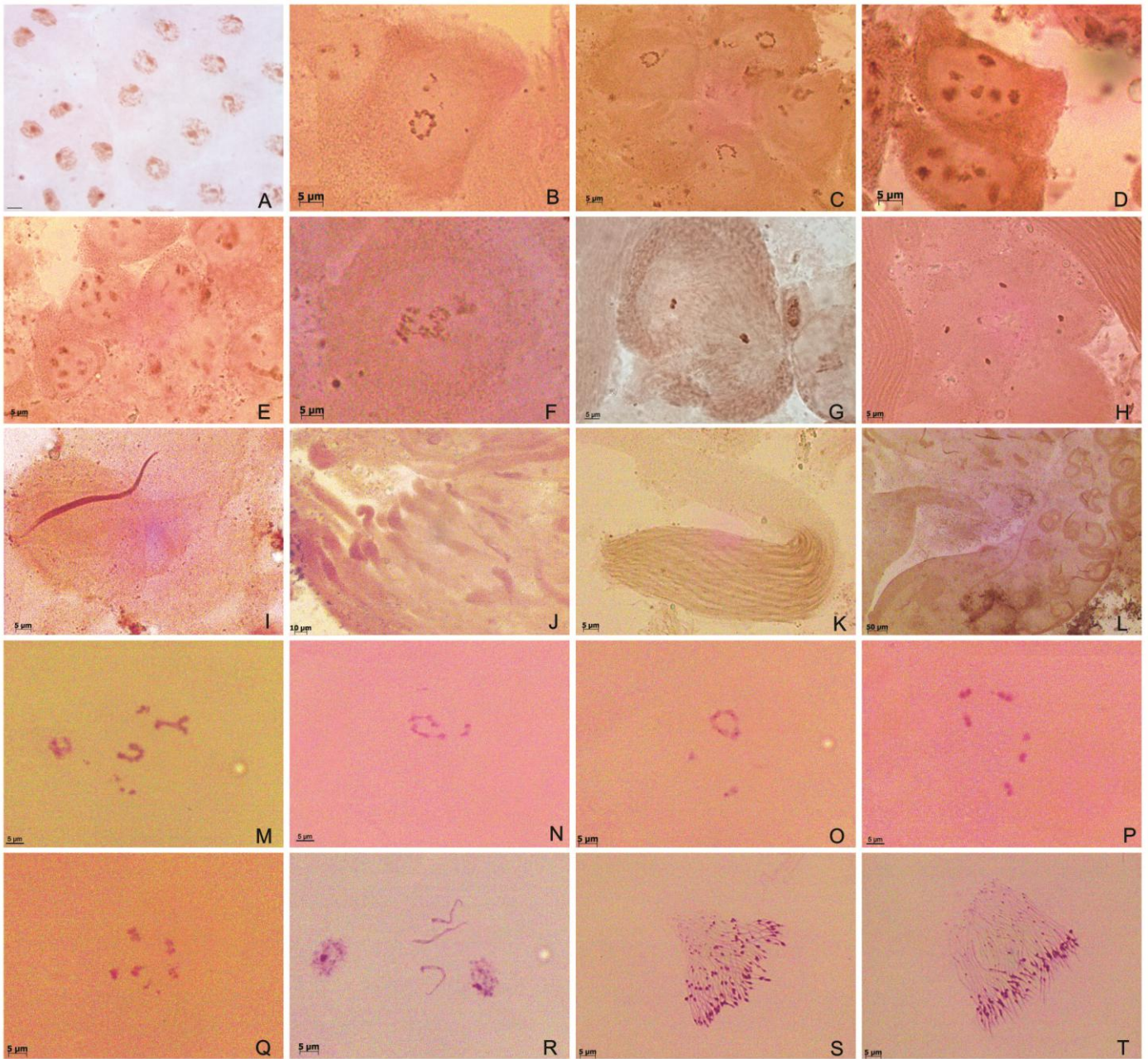


Figura 4.

**Figura 4. A-T.** Células de testículos de *Zaprionus sepsoides* coradas com orceína lacto - acética (**A-L**) e submetidas à reação de Feulgen (**M-T**); **A.** Intérfase com região correspondente ao nucléolo deslocada para a periferia do núcleo; **B, C e M, N, O.** Prófase I (diplóteno/diacinese), mostrando os quiasmas intersticiais que conferem aos cromossomos a morfologia arredondada e os cromossomos sexuais separados desse anel; **D, E e P, Q.** Metáfases I da meiose mostrando os seis pares de cromossomos bivalentes; **F.** Anáfase inicial mostrando alguns cromossomos migrando para os polos da célula; **G.** Telófase I mostrando o material genético no centro de cada núcleo; **H.** Telófase II, mostrando a formação de quatro núcleos haploides; **I e R.** Espermátides alongadas; **J, K e S, T.** Feixes de espermatozoides apresentando forte coloração e concentração de material cromatínico na ponta desses feixes, que correspondem aos núcleos desses espermatozoides; **L.** Espermatozoides dispostos em feixes curtos e circulares no testículo



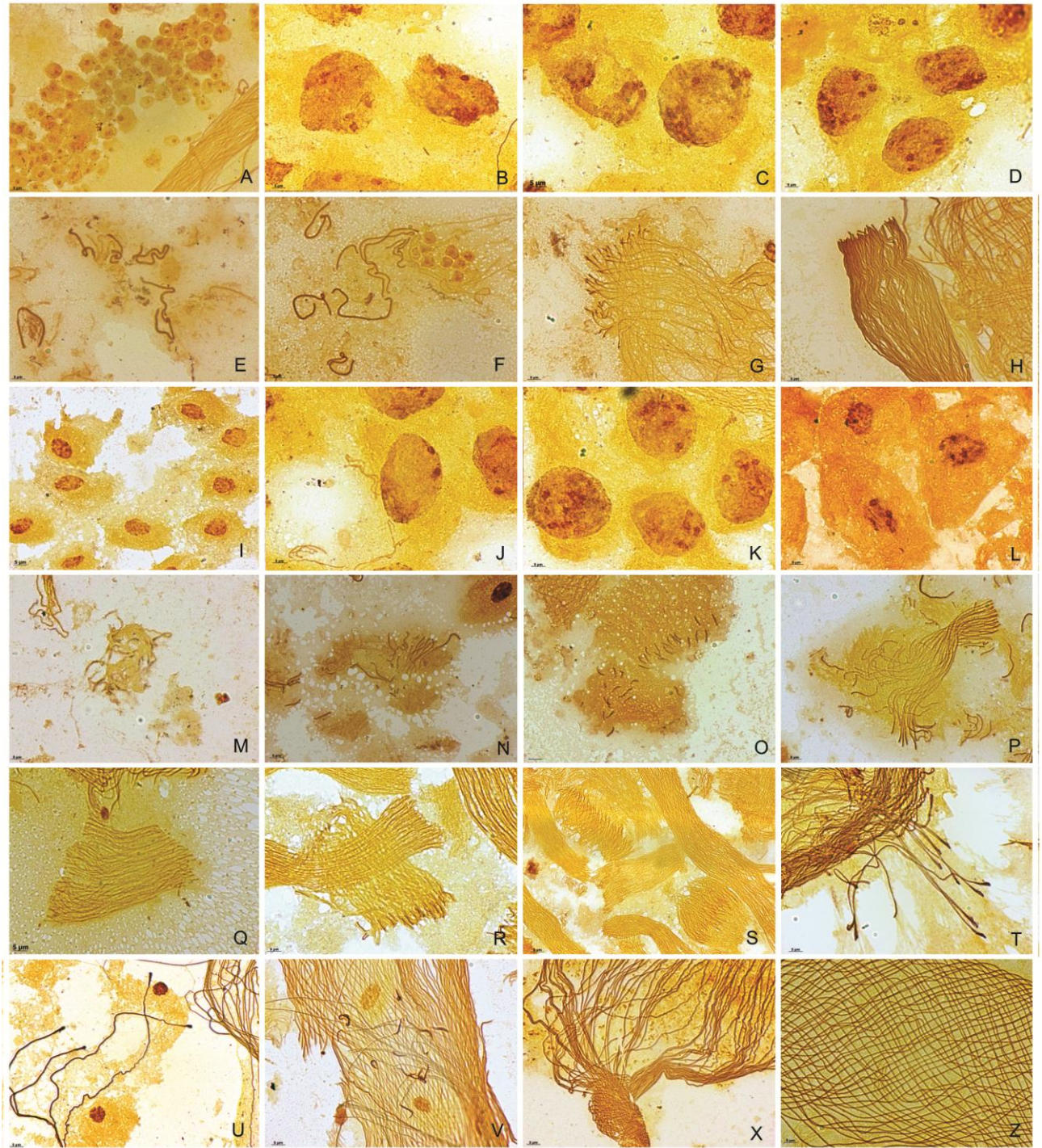


Figura 5.

**Figura 5.** Células de testículos de *Zaprionus indianus* (A-H) e *Zaprionus sepsoides* (I-Z) impregnadas pela prata. A-D. Células de testículos de *Zaprionus indianus* impregnadas pela prata. Espermatócitos no estágio inicial da prófase I mostrando corpúsculos nucleolares espalhados por todo o núcleo das células; E, F. Espermatídes em um estágio mais avançado de alongamento não apresentando impregnação específica ao longo de todo o seu comprimento; G, H. Espermatozoides organizados em feixes longos e com as extremidades fortemente coradas pela AgNOR. (I-Z) Células de testículos de *Zaprionus sepsoides* impregnadas pela prata; I-L. Espermatócitos em prófase I mostrando os corpúsculos nucleolares das célula impregnados com a prata; M, N. Espermatídes em um estágio mais avançado de alongamento não apresentando impregnação específica ao longo de todo o seu comprimento; O-R. Espermatozoides mostrando forte marcação de AgNOR em uma de suas extremidades correspondentes aos núcleos dessas células; S. Feixes curtos de espermatozoides distribuídos em todas as direções com as regiões das cabeças dos espermatozoides fortemente marcadas pela prata; V. Três tipos celulares da espermatogênese: núcleos em prófase, espermatídes alongadas e espermatozoides; (T, U, X, Z) Feixes de espermatozoides vistos em detalhe

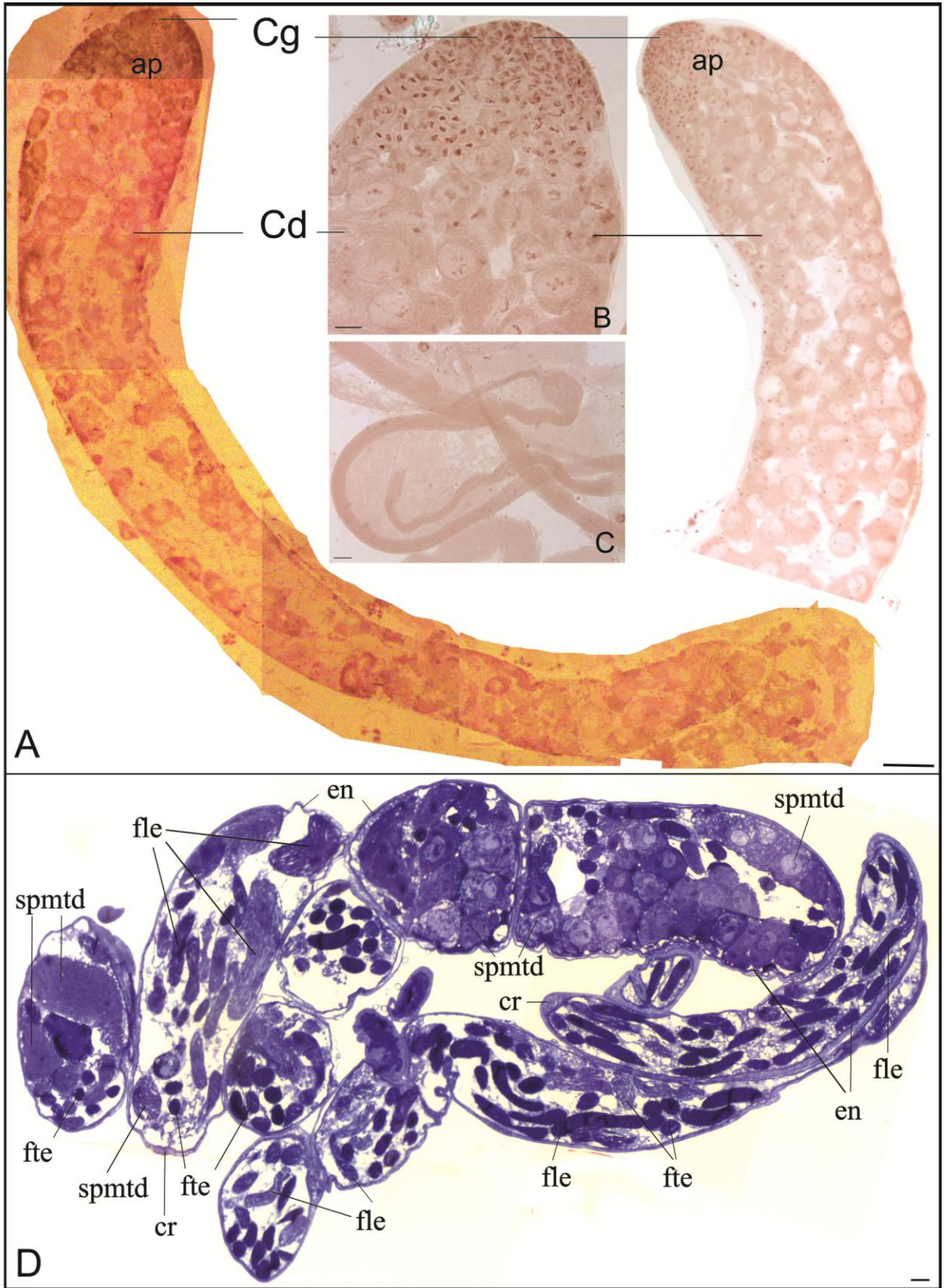


Figura 6.

**Figura 6.** Testículos e células de *Zaprionus indianus*. **A, B.** Esmagamento e coloração com orceína lacto - acética, mostrando no ápice do testículo (ap) a região do centro germinativo (Cg), seguida de células em divisão (Cd) e espermatozoides (C) presentes na região mediana do testículo; **D.** Corte histológico mostrando espermátides (spmtid), seguidas de feixes de espermatozoides arranjados em forma de feixes transversais de espermatozoides (fte), além de feixes longitudinais de espermatozoides (fle). Observar também outras estruturas presentes nos testículos como a camada de revestimento (cr) e o envoltório (en). Corte histológico em **(D)** com 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura e corado com azul de toluidina a 1%. Barras correspondem a 10  $\mu\text{m}$ .

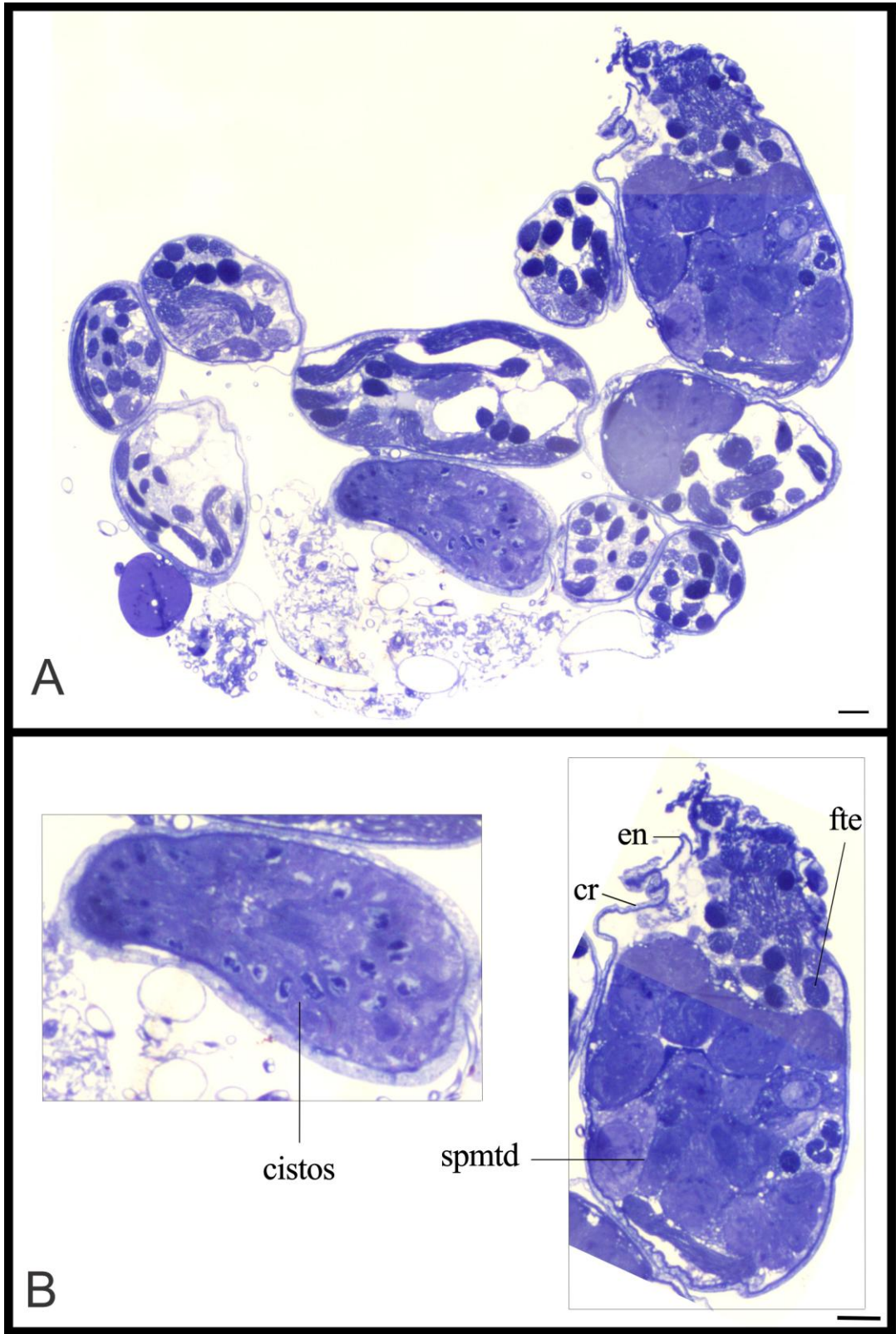


Figura 7.

**Figura 7.** Testículos e células de *Zaprionus indianus*; **A.** Corte histológico com 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura e corado com azul de toluidina a 1%, e em detalhe em **(B)**, mostrando espermatídes (spmt), seguidas de feixes transversais de espermatozoides (fte); Observar também outras estruturas presentes nos testículos como a camada de revestimento (cr) e o envoltório (en). Barras correspondem a 10  $\mu\text{m}$ .

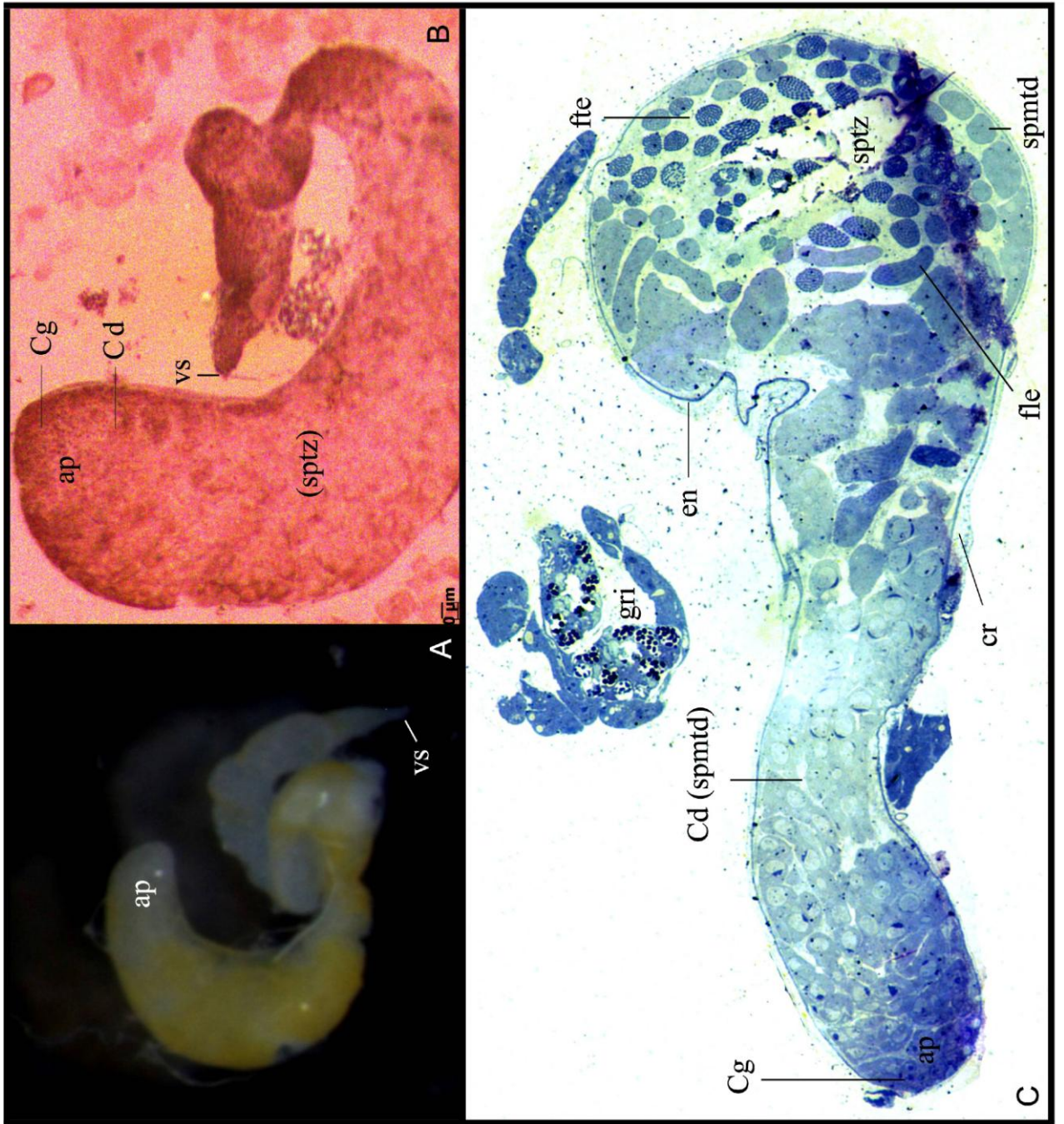


Figura 8.

**Figura 8. A-C.** Testículos e células de *Zaprionus sepsoides*. **A.** Órgão de indivíduo com 8 dias de vida. Notar coloração amarelada; **B.** Esmagamento e coloração com orceína lacto - acética, mostrando no ápice do testículo (ap) a região do centro germinativo (Cg), seguida de células em divisão (Cd) e espermatozoides presentes na região mediana do testículo; **C.** Corte histológico células organizadas de forma regular e progressiva ao longo do comprimento dos testículos: centro germinativo (Cg) formado por espermatogônias e células em divisão (Cd) constituídas de espermatócitos e espermátides (spmtid), seguidas de feixes de espermatozoides (sptz) individualizados e arranjados em forma de feixes transversais de espermatozoides (fte), além de feixes longitudinais de espermatozoides (fle). Observar também outras estruturas presentes nos testículos como a camada de revestimento (cr) e o envoltório (en). Corte histológico em (C) com 0,5 µm de espessura e corado com azul de toluidina 1%. Barras correspondem a 10 µm.



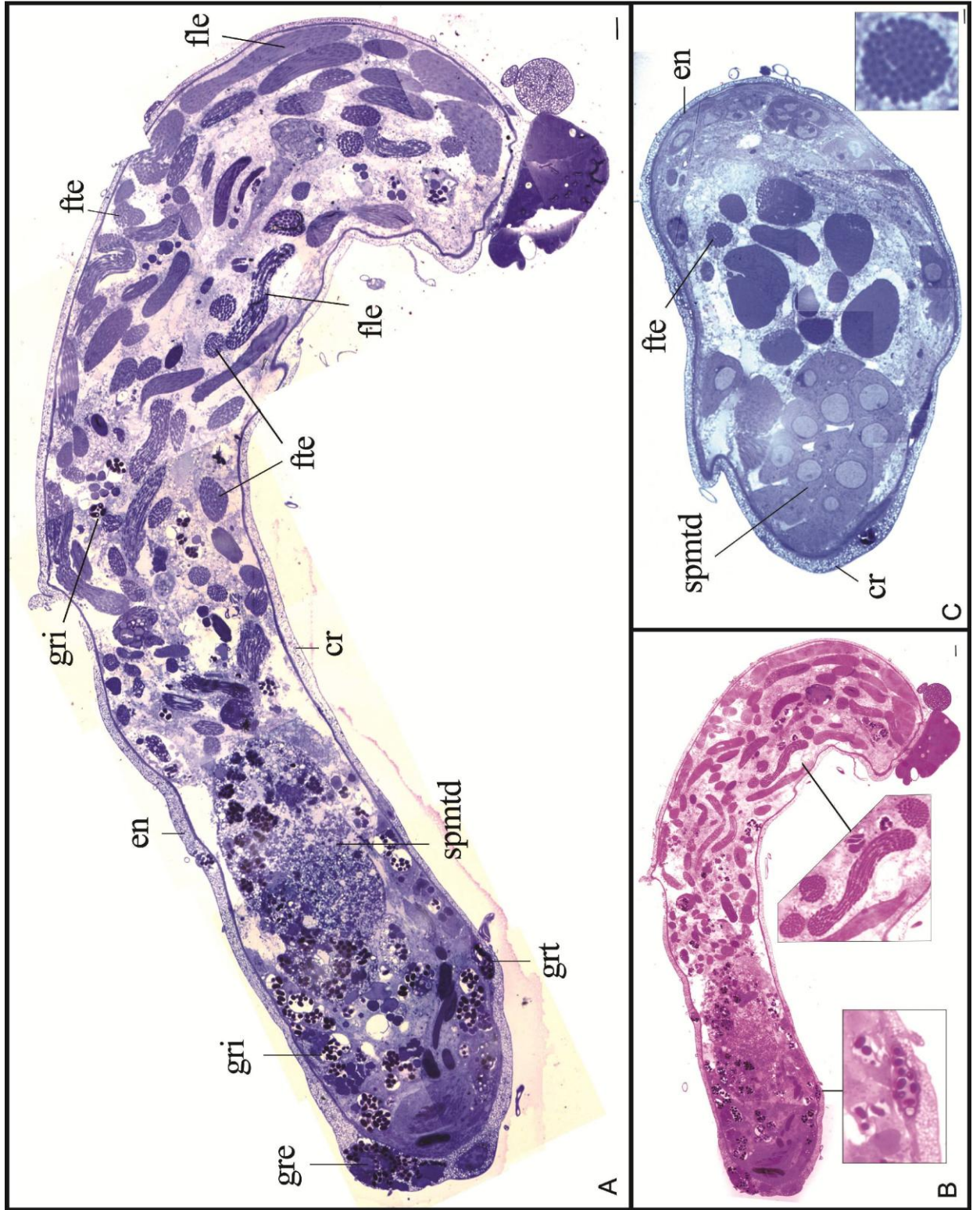


Figura 9.

**Figura 9.** Cortes semifinos de testículos de *Z. sepsoides* corados com azul de toluidina a 1% e com P.A.S. **A, C.** Corte histológico com 0,5 µm de espessura, corado com azul de toluidina a 1%; em detalhe em **(C)**, espermátides (spmt), seguidas de feixes transversais de espermatozoides (fte), onde é possível visualizar o número de 64 espermatozoides por feixe (detalhe). Observar também outras estruturas presentes nos testículos como a camada de revestimento (cr), o envoltório (en), grânulos internos de glicogênio (gri) e grânulos externos de glicogênio. A figura **(B)** mostra o mesmo corte mostrado em **(A)**, porém submetido à coloração P.A.S. Os detalhes mostram os grânulos de transição (grt) e os feixes transversais (fte) e longitudinais (fle) de espermatozoides. Barras correspondem a 10 µm.

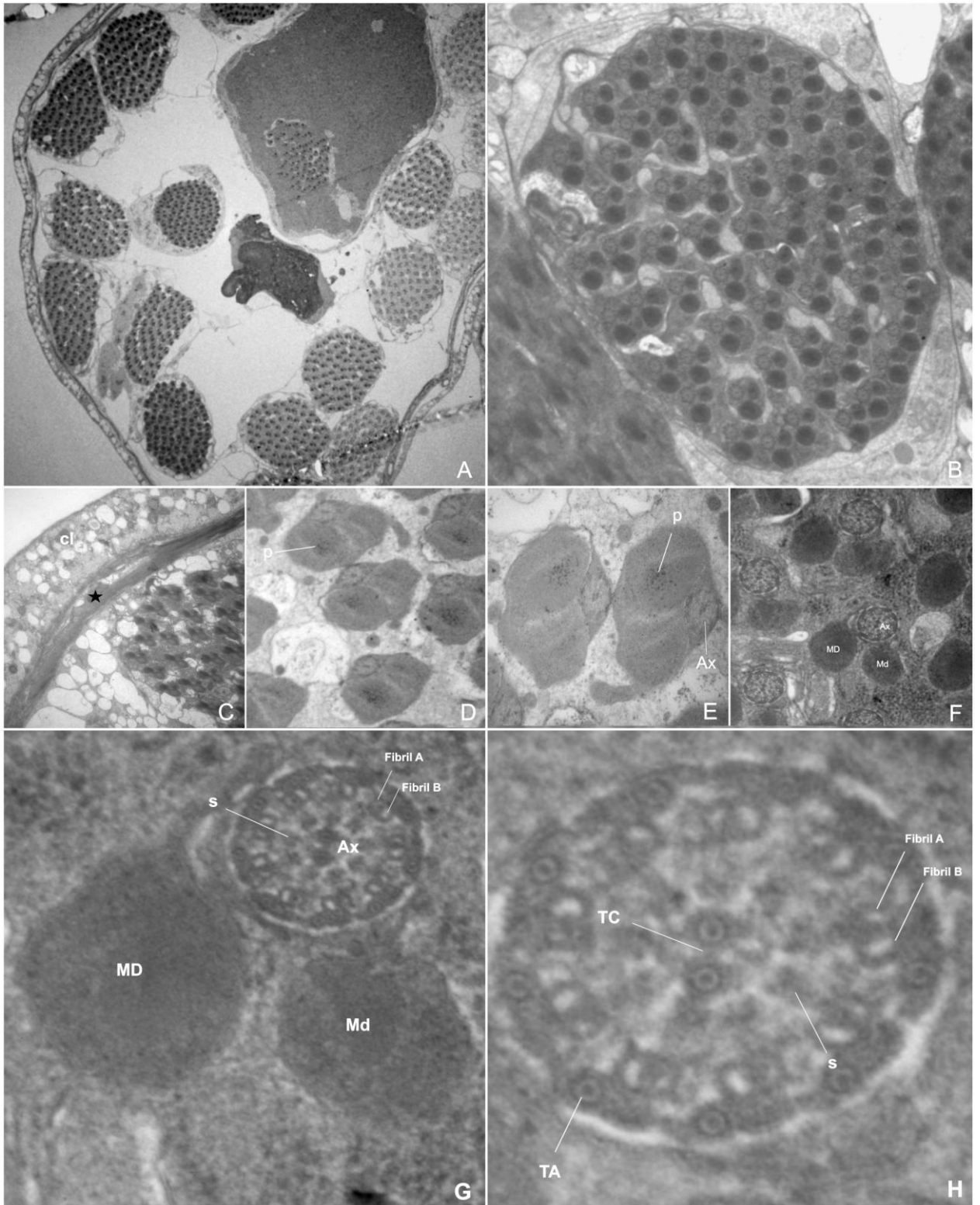


Figura 10.

**Figura 10.** Micrografias em MET de espermatozoides-região do flagelo- de *Z. indianus*. **A.** Seção transversal do testículo mostrando diversos feixes de espermatozoides organizados em cistos. **B.** Seção transversal do testículo mostrando em detalhe um feixe contendo 64 espermatozoides. **C.** Seção transversal do testículo onde é possível observar uma camada de revestimento (cl) e um envoltório (notar estrela). **D-G.** Seção transversal de um feixe de espermatozoides, mostrando a região da cauda com axônios (Ax) e derivados mitocondriais de diferentes tamanhos: derivado mitocondrial maior (MD), onde é possível notar acúmulo de material paracristalino (p) e derivado mitocondrial menor (Md). Em **(H)** detalhe de um axônio, mostrando o arranjo de 9+9+2: um par de microtúbulos centrais, nove microtúbulos duplos periféricos (notar fibrila A e fibrila B), nove túbulos acessórios (TA), além de nove 'spokes' (s).

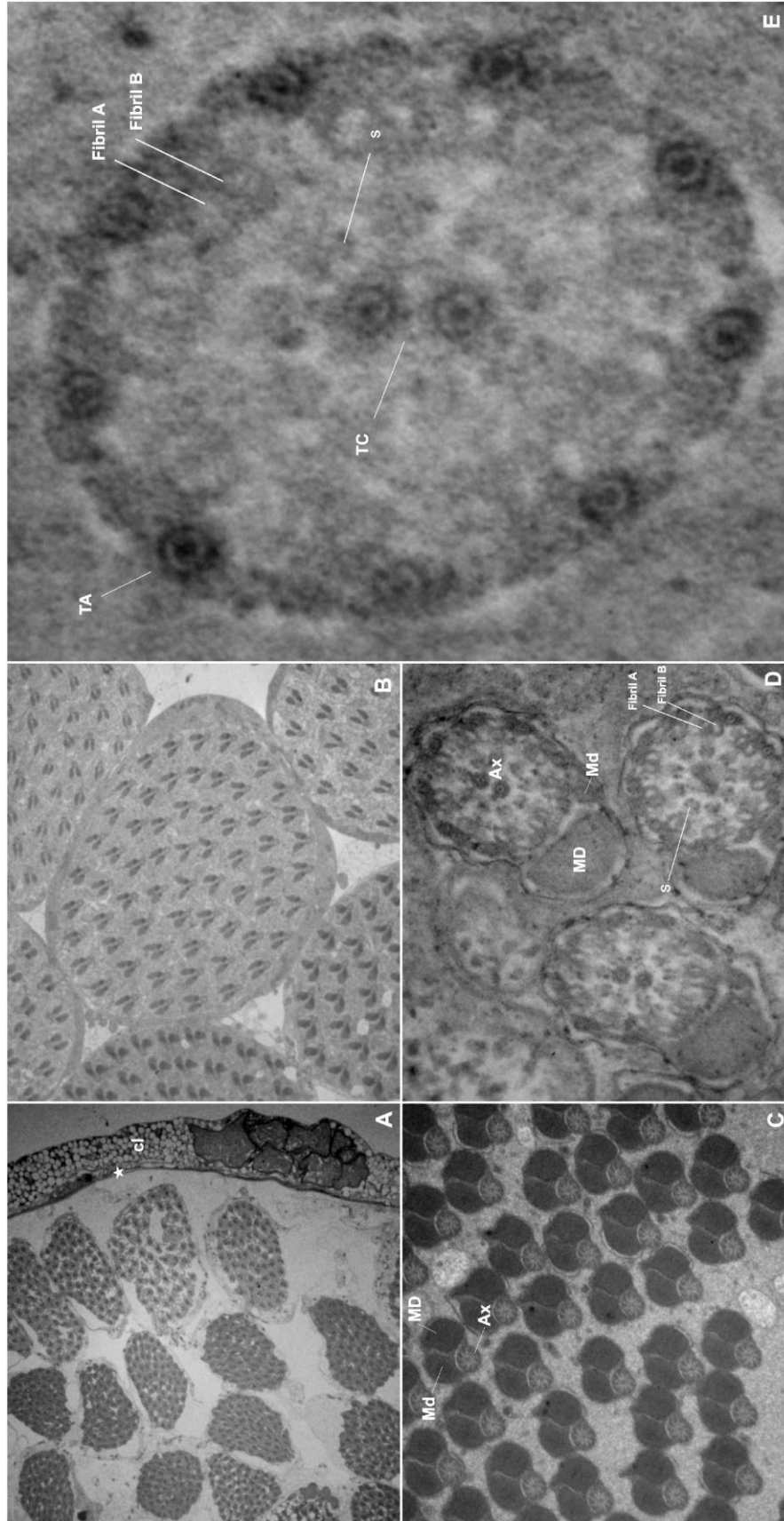


Figura 11.

**Figura 11.** Micrografias em MET de espermatozoides-região do flagelo- de *Z. sepsoides*. **A.** Seção transversal do testículo mostrando diversos feixes de espermatozoides organizados em cistos. **B.** Seção transversal do testículo mostrando em detalhe feixes contendo 64 espermatozoides. **C, D.** Seção transversal de um feixe de espermatozoides, mostrando a região da cauda com axônios (Ax) e derivados mitocondriais de diferentes tamanhos: derivado mitocondrial maior (MD), onde é possível notar acúmulo de material paracristalino (p) e derivado mitocondrial menor (Md). Em **(E)** detalhe de um axônio, mostrando o arranjo de 9+9+2: um par de microtúbulos centrais, nove microtúbulos duplos periféricos (notar fibrila A e fibrila B), nove túbulos acessórios (TA), além de nove 'spokes' (s). Observar o acúmulo de material elétron denso nos nove microtúbulos acessórios e nos dois microtúbulos centrais.

## 5. DISCUSSÃO

A rápida dispersão de *Z. indianus* em diferentes continentes e principalmente no Brasil, onde é considerada uma praga das plantações de figo (STEIN et al., 2000), tem estimulado um crescente número de estudos visando entender aspectos de sua biologia e da história de sua invasão. A mesma razão motivou o presente estudo da espermatogênese desta espécie e de outra com características ecológicas e da morfologia testicular diferentes, que é *Z. sepsoides*.

Foi evidenciado que os testículos de *Z. indianus* são formados por dois tubos enovelados com cerca de 5 mm de comprimento cada um e em *Z. sepsoides* os testículos são dois tubos de aparência reniforme com cerca de 2 mm de comprimento cada um. Essas medidas coincidem com as medidas lineares feitas por Yassin e David (2010) em testículos de diferentes espécies do gênero *Zaprionus*. Espécies do grupo *inermis* podem ser classificadas em duas categorias: aquelas com pequenos testículos variando de 1.0 a 2.0 mm (*Z. sepsoides*, *Z. inermis*, *Z. cercus*, *Z. kolodkinae* e *Z. tsacasi*), e aquelas com testículos grandes, variando de 5.2 a 5.4 mm, como em *Z. indianus*, *Z. africanus* e *Z. taronus*.

Araripe et al. (2004) mostraram que a anatomia e fisiologia reprodutiva de *Z. indianus* são diferentes das conhecidas em *D. melanogaster*, uma vez que *Z. indianus* possui espermatozoides maiores (5 mm) que *D. melanogaster* (1.8 mm). Joly e Bressac (1994) mediram o tamanho dos espermatozoides e dos testículos de várias espécies de drosofilídeos e verificaram que, em *Z. indianus*, o tamanho do espermatozoide é de aproximadamente 6.07 mm e em *Z. sepsoides* de 0.78 mm, sendo os tamanhos dos testículos de 6.53 mm e 1.42 mm respectivamente. Essas medidas dos testículos correspondem às encontradas no presente trabalho.

Foi verificado que os feixes de espermatozoides em *Z. sepsoides* possuem menor comprimento do que em *Z. indianus*, refletindo seu menor tamanho e, conseqüentemente, menor tamanho dos testículos. Como já é conhecido por dados da literatura, os testículos são tão longos quanto os espermatozoides que são fabricados neles (LINDSLEY; TOKUYASU, 1980; PITNICK; MARKOW, 1994).

O número diploide de *Z. indianus* e *Z. sepsoides* foi confirmado como sendo  $2n = 12$ . No presente trabalho não foi possível, pela técnica AgNOR evidenciar nos cromossomos meióticos as Regiões Organizadoras de Nucléolo, somente nos núcleos em prófase e nos espermatozoides, nos quais sua presença confirmou a intensa atividade de síntese proteica em sua região anterior, correspondente às cabeças dos espermatozoides. Esta marcação já foi evidenciada em estudos com outros organismos (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2008; COSTA et al., 2008; PERUQUETTI et al., 2008, 2010).

Existem poucos estudos utilizando marcações com AgNOR em espécies do gênero *Zaprionus*. Gupta e Kumar (1987) estudaram a associação dos cromossomos politênicos com o nucléolo em quatro populações indianas distintas de *Zaprionus indianus* e observaram que diferentes cromossomos, como o cromossomo X e o menor par de cromossomos do conjunto, estão envolvidos com as atividades da Região Organizadora do Nucléolo (RON).

Em machos jovens (1 a 3 dias) de *Z. sepsoides* foram observados mais frequentemente que em *Z. indianus*, células em estágios iniciais da espermatogênese, como espermatócitos I e II, poucas espermátides e uma quantidade relativa de espermatozoides. Já em machos jovens de *Z. indianus* foram obtidas poucas células na fase inicial da espermatogênese e uma quantidade maior de espermátides e espermatozoides. Esta diferença observada sugere tempo de maturação diferencial dos espermatozoides entre estas espécies. Para espécies do gênero



*Drosophila* foi verificado que os espermatócitos começam a entrar na primeira divisão meiótica ainda no estágio de pupa (COOPER, 1950), sendo que os testículos da maioria das espécies de *Drosophila* não estão completamente desenvolvidos na eclosão e, portanto, continuam se desenvolvendo durante o período de maturação do adulto, e isto é altamente variável entre as espécies (PITNICK; MILLER, 2000). Em *Z. indianus* isto parece ocorrer também, tendo em vista que machos de um dia de idade mostram uma quantidade significativa de espermatozoides, diferente de *Z. sepsoides*, que apresenta maiores quantidades em machos mais velhos (8 dias de idade).

Estes resultados contrariam os de Pitnick e Miller (2000). Esses autores demonstraram um aumento no tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) e no tempo de maturação dos espermatozoides pós-eclosão em *D. hydei* selecionada para testículos maiores, e isto contribui para um atraso na reprodução desta população. Em *Z. indianus*, que possui maior testículo e maior espermatozoide que *Z. sepsoides*, isto parece não ocorrer, pelo fato de machos jovens já apresentarem quantidades significantes de espermatozoides.

A fertilidade de *Z. indianus* é maior que a de *Z. sepsoides*, ao menos em experimentos de laboratório (MADI-RAVAZZI, L; DAVID, J, comunicação pessoal), indicando um valor adaptativo diferencial entre estas espécies. Se as diferenças de tamanho e maturação de espermatozoides entre estas espécies favorecem maior potencial reprodutivo necessita ser investigado em detalhes.

A distribuição organizada e direcionada das células espermatogênicas observadas em *Z. indianus* e *Z. sepsoides* obedece à mesma distribuição e localização nos testículos encontrada em outros drosofilídeos (COOPER, 1950; BAIRATI, 1968; MEYER, 1974; HARDY et al., 1979; LINDSLAY; TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993, JOLY; BRESSAC, 1994; GÖNCZY; DINARDO, 1996; LI; XIE, 2005; SCHARER et al., 2008; MOJICA et al., 2000; BARREAU et al., 2008, CHENG; MRUK, 2010).

Outro fator relevante observado foi o número constante de 64 espermatozoides por feixe em *Z. indianus* e em *Z. sepsoides*. O mecanismo de formação desses feixes é semelhante ao que ocorre em *Drosophila* e em outros insetos. Nessas espécies, um feixe de espermatozoides é produzido por uma série de divisões mitóticas da espermatogônia dentro de um cisto espermático (COOPER, 1950; HARDY et al., 1979; LINDSLAY; TOKUYASU, 1980; FULLER, 1993; FABRIZIO et al., 1998; MOJICA et al., 2000).

Embora na maioria dos insetos as divisões mitóticas dentro do feixe sejam sincrônicas, em algumas espécies de *Drosophila* podem também ser assincrônicas e o número de espermatozoides por feixe pode variar de 32 como em *D. hydei* a 128 em *D. pseudoobscura* (MOJICA et al., 2000), bem como ocorre em abelhas (CRUZ-LANDIM, 2001) e em Coleoptera (NAME et al., 2007). Isso sugere que as células goniais de qualquer estágio são capazes de se tornarem espermatócitos e que o programa genético espécie-específico determina o número de divisões pré-meióticas na linhagem germinativa masculina (MOJICA et al., 2000).

De acordo com Virkii (1969), ordens basais de insetos possuem mais espermatozoides por feixe que ordens mais recentes. Os grupos mais especializados tendem a possuir o menor número de espermatozoides por feixe. Name et al. (2007) mostraram, por exemplo, que alguns coleópteros como os escarabulídeos possuem de 128 a 512 espermatozoides por feixe e que as espécies por eles estudadas, *Sitophilus zeamays* e *S. oryzae* possuem cerca de 260 espermatozoides por feixe. Menos espermatozoides por feixe indicam produção reduzida de espermatozoides a qual pode corresponder a um valor adaptativo que limita a variabilidade genética (MOJICA et al., 2000).

Embora em *Z. indianus* e em *Z. sepsoides* tenhamos observado o mesmo número de espermatozoides por feixe (64), há possibilidade de haver números diferentes de feixes nestas

espécies, o que é indicado pela abundância maior de espermatozoides em *Z. indianus* do que em *Z. sepsoides*. Isto necessita ser investigado.

O presente estudo confirmou o padrão organizacional do axonema dos insetos que segue o esquema 9+9+2, que é o arranjo usual de 9+2 microtúbulos internos circundados por nove microtúbulos acessórios adicionais. Estudos da organização estrutural do axonema em *Drosophila* foram realizados por vários autores (PEROTTI, 1969; KIEFER, 1970; PHILLIPS, 1970; DALLAI; AFZELIUS, 1991; DALLAI et al., 1993; FABRIZIO et al., 1998; MOJICA et al., 2000) que confirmaram a conservação dessa estrutura em diferentes espécies do gênero *Drosophila* e da família Drosophilidae.

Dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes estão presentes em ambas as espécies. Estas estruturas têm sido estudadas ultraestruturalmente em insetos com enfoque filogenético (PHILLIPS, 1970; MOJICA et al., 2000). Ao longo do processo de diferenciação, os derivados mitocondriais são preenchidos ao longo de sua extensão por uma estrutura proteica rica em prolina e organizada num padrão paracristalino (PHILLIPS, 1970; BACCETTI et al., 1977). Algumas funções dos derivados mitocondriais podem estar relacionadas ao processo de estocagem e liberação de energia necessária para a mobilidade do flagelo (PHILLIPS, 1970, LINDSLEY; TOKUYASU, 1980).

Embora as relações dentro do gênero *Zaprionus* fossem propostas recentemente (YASSIN; DAVID, 2010), a sua posição dentro da família Drosophilidae ainda é debatida (YASSIN et al., 2007, 2008, 2010; YASSIN; DAVID, 2010). Atualmente, a maior parte dos estudos concordam que *Zaprionus* pertence ao gênero *Drosophila* e que *Zaprionus* está mais intimamente relacionada com a *Drosophila* do que com os subgêneros *Sophophora*, o qual pertence o subgrupo *melanogaster* (DA LAGE et al, 2007; COMMAR et al, 2012).

Estudos com elementos transponíveis mostraram maior similaridade de sequências entre espécies do subgênero *Zaprionus* e algumas espécies do grupo *melanogaster* do que entre espécies do mesmo grupo (DE SETTA et al., 2009).

As observações ultraestruturais do padrão organizacional do axonema (9+9+2) e dos derivados mitocondriais, sendo um maior e o outro menor, são características presentes nos espermatozoides das espécies do gênero *Drosophila*, corroborando a proximidade filogenética com *Zaprionus*.

O estudo da espermatogênese efetuado no presente trabalho, de duas espécies com dinâmica ecológica bem diferenciada, uma invasora, *Z. indianus*, a outra com distribuição restrita, *Z. sepsoides*, com morfologia testicular e tamanho de espermatozoides diferentes, evidenciou diferenças na fase de maturação dos espermatozoides, entre estas espécies, as quais poderiam causar uma diferenciação adaptativa favorecendo *Z. indianus* a explorar novos ambientes.

## 6. CONCLUSÕES

- Os aspectos da espermatogênese e da espermiogênese das espécies *Z. indianus* e *Z. sepsoides* são semelhantes em suas fases e também muito próximos de *D. melanogaster*, indicando uma conservação destes processos dentro da família Drosophilidae.

- As principais diferenças observadas por microscopia óptica e pela microscopia eletrônica de transmissão entre *Z. indianus* e *Z. sepsoides* foram: menor tamanho do espermatozoide de *Z. sepsoides* em relação ao de *Z. indianus*, uma maior quantidade de material paracristalino nos derivados mitocondriais de *Z. indianus* e uma coloração destacada na região da cabeça do espermatozoide de *Z. sepsoides* quando submetidos à

coloração por orceína e Feulgen. Se estas diferenças estão relacionadas com o maior potencial invasivo de *Z. indianus*, há necessidade de maior investigação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANINA, G. et al. Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970) (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v.131, p.117-125, 2007.
- ARARIPE, L.O. et al. Male sterility thresholds in a tropical cosmopolitan drosophilid, *Zaprionus indianus*. **Journal of Thermal Biology**, v.29, p.73-80, 2004
- BACCETTI, B. Insect sperm cell, *Advances in Insect Physiology*, v. 9 p. 315-397, 1972.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B.A. *The biology of the sperm cell*. Basel, New York, Karger, 254p., 1976.
- BACCETTI, B. et al. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. **The Journal of Cell Biology**, v. 73 p. 594-600, 1977.
- BAIRATI, A. Structure and ultrastructure of male reproductive system in *Drosophila melanogaster*. II. Genital duct and accessory glands. *Monitore Zoologico Italiano*, v.2, p.105-182, 1968.
- BARREAU, C.; BENSON, E.; WHITE-COOPER, H. Comet and cup genes in *Drosophila* spermatogenesis: the first demonstration of post-meiotic transcription. **Biochemical Society Transactions**, v.36, n.3,p. 540-542, 2008.
- CAMPOS, S.R.C.; RIEGER, T.T.; SANTOS, J.F. Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *in situ* hybridization in *Zaprionus indianus*. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.2, p.262-276, 2007.
- CHASSAGNARD, M.T.; KRAAIJEVELD, A.R. The occurrence of *Zaprionus* sensu strict in the Palearctic region (Diptera: Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France**, v.27, p.495-496, 1991.

CHENG, C.Y.; MRUK, D. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 365, p.1459-1463, 2010.

COOPER, K.W. Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: *The Biology of Drosophila* (M. Demerec, ed), John Wiley and Sons, New York, p.1- 61, 1950.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO F.G.; DAVID-FERREIRA, J.F. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technology**, v.51, p.7-11, 1976

COQUILLET, D. W. New Diptera from Southern Africa. **Proceedings of the United States National Museum**, v.24, p.27-32. 1902.

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

CULIK, M.P.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J.A. Uma nova praga potencial para o mamão e outros registros de pragas no Espírito Santo. **Papaya Brasil**, p.518-521, 2005.

DALLAI R; AFZELIUS B.A Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) (Diptera). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.20 p. 215-222, 1991.

DALLAI, R. et al. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. **Zoologica Scripta**, v.22, p.193-202, 1993.

DA SILVA, N.M. et al. Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Porto Alegre, Southern Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.95, n.3, p.233-240, 2005a.

DA SILVA, N.M. et al. Population Dynamics of the Invasive Species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in Communities of Drosophilids of Porto Alegre City, Southern of Brazil. **Neotropical Entomology**, v.34, n.3, p.363-373, 2005b.

DAVEY, K.G. The male reproductive tract. In: Kertuk, G.A., Gilbert LI, editors. **Comprehensive Insect Physiology**. Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press. p.1-36, 1985

DAVID, J.R.; ARARIPE, L.O.; BITNER-MATHÉ, B.C. Quantitative trait analysis and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader of Brazil. **Heredity**, v.96, p.53-62, 2006.

DE SETTA, N. et al. *Copia* retrotransposon in the *Zaprionus* genus: Another case of transposable element sharing with the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Journal of Molecular Evolution** v.72, p.326-328, 2011.

FABRIZIO, J.J. et al. Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. **Development**, v.125, p.1833-1843, 1998.

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

FULLER, M.T. Spermatogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press. Vol. 1, p. 71-147, 1993.

GERBI, A.G.; BOROVJAGIN, A.V.; LANGE, T.S. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.318-325, 2003.

GÖNCZY, P.; DINARDO, S. The germ line regulates somatic cyst cell proliferation and fate during *Drosophila* spermatogenesis. **Development**, v.122, p.2437-47, 1996.

GÖNCZY, P.; MATUNIS, E.; DINARDO, S. *bag-of-marbles* and *benign gonial cell neoplasm act* in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. **Development**, v.124, p.4361-4371, 1997.

GUPTA, J.P. Description of a new species of *Phorticella Zaprionus* (Drosophilidae) from India. **Indian National Science Academy**, v.36, p.62-70, 1970.



GUPTA, J.P.; KUMAR, A. Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae): nucleolar organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. **Genetica**, v.74, n.1, p.19-25, 1987.

HARDY, R.W. et al. The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Ultrastructure Research**, v.69, p.180-190,1979.

HATCH, K.; Jeffery, D.E. Salivary gland chromosome map of *Zaprionus inermis*. **Journal of Heredity**, v.83, p.311-315, 1992.

HERNADEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal of Cell Science**, v. 99, p. 465-471, 1991.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015,1980.

JAMIESON, B.G.M., DALLAI, R., AFZELIUS, B.A. Insects: their spermatozoa and phylogeny (Enfield, New Hampshire USA –Sciende Publisher Inc.). 555p., 1999.

JOLY, D.; BRESSAC, C. Sperm length in *Drosophilidae* (Diptera): estimation by testis and receptacle lengths. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, v.23, p.85-92, 1994.

JOLY, D.; KOROL, A.; NEVO, E. Sperm size evolution in *Drosophila*: inter- and intraspecific analysis. **Genetica**, v.120, n.(1-3): 233-244, 2004.

JOLY, D.; SHIFFER, M. Coevolution of male and female reproductive structures in *Drosophila*. **Genetica**, v.138, p.105-118, 2010.

KIEFER, R.G. Development, organization and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. **Journal of Cell Science**, v. 6 p. 177-194, 1970.

KARAN, D.; MORETEAU, B.; DAVID, J.R. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. **Heredity**, v.83, p. 398-407, 1999.

KATO, C. M. et al. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.2, p.454-455, 2004.

LINDSLEY, D.L.; TOKUYASU, K.T. Spermatogenesis. In *Genetics and Biology of Drosophila*. London: Academy Press. p. 225-294, 1980.

LAM, Y.W.; TRINKLE-MULCAHY, L.; LAMOND, A.I. The nucleolus. **Journal of Cell Science**, v.118, p.1335-1337, 2005.

LI, L.; XIE, T. Stem Cell Niche: structure and function. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v.21, p.605-31, 2005.

MACHADO, N.S.; FANTINEL, C.C.; VALENTE V.L. Populations dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, Southern of Brazil. **Neotropical Entomology**, v.34, n.3, p.363-374, 2005.

MAINES, J.; WASSERMAN, S. Regulation and Execution of Meiosis in *Drosophila* Males. **Current Topics in Developmental Biology**, v.37,p.301-332, 1997.

MATTOS-MACHADO, T. et al. Allozyme variability in an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae): Comparison of a recently introduced Brazilian population with Old World populations. **Annales de la Société Entomologique de France**, v.41, p.1-7, 2005.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil, 1980.

MEYER, G. F.; HENNING, W. The nucleolus in primary spermatocytes of *Drosophila hydei*. **Chromosoma**, v.46, p.121-144, 1974.

MILLER, D.A. et al. Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-straining of nucleolus organizer regions. **American Journal Human Genetics**, v.11, p.490-502, 1977.

MOJICA, J.M.; FILE-EMPERADOR, S.; BRUCK, D.L. Sperm bundle and spermatozoon ultrastructure in two species of the *cardini* group of *Drosophila*. **Invertebrate Reproduction and Development**, v.37, n.2, p.147-155, 2000.

NAME, K.P.O.; DOS REIS, G.P.; BAÓ, S.N. An ultrastructural study of spermiogenesis in two species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) *Biocell*. Coleoptera. *Sitophilus* (Linneaus). **Biocell**, v.31, n.2, p.229-236, 2007.

NAVA, D.O. et al. Biology, termal requirements and estimation of the number of generations of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) for the main fig producing regions of Brazil. **Florida entomologist**, v.90, n.3, p.495-501, 2007.

OKADA, T.; CARSON, H.L. The genera *Phorticella* Duda and *Zaprionus* Coquillett (Diptera, Drosophilidae) of the Oriental region and New Guinea. **Kontyu**, v.51, p.539-553, 1983.

OLSON, M.O.; HINGORANI, K.; SZEBENI, A. Conventional and nonconvencional roles of the nucleolus. **International Review of Cytology**, v.219, p.199-266, 2002.

PEDERSON, T. The Nucleolus. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology pp.1-15, 2010.

PEROTTI, M.E. Ultrastructure of mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig J. Submicr. **Cytology**, v.1, p.171-196, 1969.

PITNICK, S.; MARKOW, T.A. Large-male advantages associated with costs of sperm production in *Drosophila hydei*, a species with giant sperm. **Evolution**, v.91, p.9277-9281, 1994a.

PITNICK, S.; MARKOW, T.A. Male strategies: sperm size, testes size, and, the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila pachea* and its relatives. **The American Naturalist**, v.143, p.785-819, 1994b.

PITNICK, S.; MARKOW, T.A.; SPICER, G.S. Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.92: p.10614-10618, 1995.

PITNICK, S. Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. **The American Naturalist**, v.148, p.57-80, 1996.

PITNICK, S.; MILLER, G.T. Correlated response in reproductive and life history traits to selection on testis length in *Drosophila hydei*. **Heredity**, v.84, p.416-426, 2000.

REX, A.S. Spermatogenesis, Overview. University at Illinois at Urbana, v.4, p.539-545, 1999.

SANTOS, J.F. et al. Colonization of northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. **Drosophila Information Service**, v.86, p.92-95, 2003.

SCIANDRA, R.J.; ABDEL-HAMEED, F.; BENNETT, J. Chromosome complement of *Zaprionus multistriatus*. **Journal of Heredity**, v.64, p.31-34, 1973.

SCHARER, L.; DALAGE, J.L.; JOLY, D. Evolution of testicular architecture in Drosophilidae: a role for sperm length. **BMC Evolutionary Biology**, v.8, p.143, 2008.

SETTA, N.; CARARETO, C.M.A. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.95, n.1, p.47-51, 2005.

SNOOK, R.R. Is the production of multiple sperm types adaptive? **Evolution**, v.51, p.797-808, 1997.

SOTO, I. et al. First record of *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Argentina. **Drosophila Information Service**, v.89, p.13-14, 2006.

STEIN, C.P.; TEIXEIRA, E.P.; NOVO, J.P.S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae). **Entomotropica**, v.18, n.3, p.219-221, 2003.

SU, Y. et al. *Zaprionus tuberculatus*: Chromosome Map and Gene Mapping by DNA *in situ* Hybridization. **Journal of Heredity**, v.83, n.4, p.299-304, 1992.

TIDON, R.; LEITE, D.F.; LEÃO, B.F.D. Impact of the colonization of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 2 years after the invasion. **Biological Conservation**, v.112, p.299-305, 2003.

TULINA, N.; MATUNIS, E. Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. **Science**, v.294, p.2546-2549, 2001.

VAN DER LINDE, K. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. **Florida Entomologist**, v.89, n.3, p.402-404, 2006.

VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? **Drosophila Information Service**, v.82, p.37-39, 1999.

VIRKII, N. Sperm bundles and phylogenies. **Z. Zellforsch.**, v.101, p.13-27, 1969.

VERMEIJ, G.J. An agenda for invasion biology. **Biociências**, v.78, p. 3-9, 1996.

WHITE-COOPER, H. Studying how flies make sperm-investigating gene function in *Drosophila* testes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.10, p.66-74, 2009.

YASSIN, A. et al. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.491-501, 2007.

YASSIN, A. et al. Grafting the molecular phylogenetic tree with morphological branches to reconstruct the evolutionary history of the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae) **Molecular Ecology Resources**, v.47, p.903-915, 2008.

YASSIN, A. et al. Polyphyly of the *Zaprionus* genus group (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Ecology Resources**, v.55, p. 335-339, 2010.

YASSIN, A.; DAVID, J.R. Revision of the Afrotropical species of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of two new species and notes on internal reproductive structures and immature stages. **ZooKeys**, v.51, p.33-72, 2010.

**8. ARTIGO ACEITO NA *GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY***

---

**Spermatogenesis of *Zaprionus indianus* and *Zaprionus sepsoides* (Diptera: Drosophilidae): cytochemical, structural and ultrastructural characterization**

**Leticia do Nascimento Andrade de Almeida Rego<sup>1</sup>**

**Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira<sup>2</sup>**

**Rosana Silistino-Souza<sup>2</sup>**

**Lilian Madi-Ravazzi<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Ecologia, Evolução e Genética de *Drosophila*, São José do Rio Preto, SP, Brasil;

<sup>2</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia Celular, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Send correspondent to Lilian Madi-Ravazzi, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Ecologia, Evolução e Genética de *Drosophila*, Cristóvão Colombo, 2265- Jardim Nazareth. 15054-000. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

(17) 3221 2389/ FAX (17) 3221 2390/ email: lilian@ibilce.unesp.br

Running Title: Spermatogenesis in *Zaprionus* sp.

Key words: *Zaprionus indianus*, *Zaprionus sepsoides*, spermatogenesis, cytochemistry, ultrastructure, meiosis.



## ABSTRACT

*Zaprionus indianus* is a drosophilid native to the Afrotropical region that has colonized South America. *Z. indianus* exhibits a wide geographical distribution, whereas *Z. sepsoides* is restricted to certain African regions. The two species differ in the size of their testes, which are larger in *Z. indianus* than in *Z. sepsoides*. To better understand the biology and the degree of differentiation of these species, the current study evaluated spermatogenesis in males of different ages (1, 3, 5 and 8 days old) from both species by conventional staining techniques and ultrastructural analysis. Spermatogenesis and the ultrastructure of spermatozoa were similar in the two species, for which the diploid number was confirmed to be  $2n = 12$  chromosomes. However, a greater number of spermatozoa were observed in young *Z. indianus* males (1-3 days old) than in young *Z. sepsoides* males, which showed a higher frequency of cells at the early stages of spermatogenesis at this age. A portion of the head of the sperm was strongly marked in both species by silver staining (AgNOR), lacto-acetic orcein and the Feulgen reaction. Additionally, when submitted to P.A.S. reaction, the testes of both *Z. sepsoides* and *Z. indianus* exhibited glycogen granules. The two species also presented the same flagellar ultrastructure, in which the axoneme includes a 9+9+2 arrangement of microtubules, two mitochondrial derivatives of different sizes are present and the number of spermatozoa per bundle is 64. The great similarity in the pattern of microtubule arrangement in the axoneme and in the mitochondrial derivatives of the species *Zaprionus*, as compared with other species of *Drosophila*, indicates that these structures are preserved in the family Drosophilidae. The differences observed between the young males of *Z. indianus* and *Z. sepsoides*, including the number and frequency of sperm cells in the early stages of spermatogenesis, are features that may interfere with reproductive success and may be related to the invasive potential of *Z. indianus*.

## INTRODUCTION

The genus *Zaprionus* is divided into two biogeographically separate subgenera: the subgenus *Anaprionus* Okada, with approximately 10 species in the Eastern region, and the *Zaprionus* subgenera, with approximately 50 species in the Afrotropical region (Okada and Carson, 1983; Yassin *et al.*, 2008). Phylogenetically, *Zaprionus* is very close to the genus *Drosophila* (Yassin *et al.*, 2007, 2008, 2010; Yassin and David, 2010).

The species *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) originated in Africa and was first identified in Brazil in 1999 and is considered an invasive species that has infested the fig plantations (Vilela, 1999; Tidon *et al.*, 2003). After 1999, *Z. indianus* has been detected in different regions of Brazil (Toni *et al.*, 2001, Castro and Valente, 2001; Santos *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2004; Mattos-Machado *et al.*, 2005, David *et al.*, 2006), Uruguay (Goñi *et al.*, 2001) and, in 2005, Florida (USA) (Van der Linde *et al.*, 2006) and Argentina (Soto *et al.*, 2006).

Some studies have examined the invasive potential of *Z. indianus*, including its life cycle (Amoudi *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 2003), its larval competition (Amoudi *et al.*, 1993a) and components of its adaptive value (Amoudi *et al.*, 1993b; Setta and Carareto, 2005) in strains of Saudi Arabian origin. Allozyme studies have indicated that plasticity in the distribution of the allelic frequency of the locus Est-3 may have also contributed to this species success in spreading across the Americas (Gallego and Carareto, 2007, 2010). However, few studies have examined the biology and reproduction of *Z. indianus* (Araripe *et al.*, 2004) or other *Zaprionus* species (Yassin *et al.*, 2007; Yassin and David, 2010; Yassin *et al.*, 2010).

Of the 49 species of the genus *Zaprionus*, only three have become invasive: *Z. indianus*, *Z. tuberculatus* and *Z. ghesquierei* (Chassagnard and Kraaijeveld, 1991). *Z.*

*indianus* is the most widespread species of the genus and the most ecologically diverse of the Afrotropical drosophilid fauna (Yassin *et al.*, 2007; Yassin and David, 2010; Yassin *et al.*, 2010). The general habits of this species may be a major factor in its successful occupancy of four continents (Lachaise and Tsacas 1983, Schmitz *et al.*, 2007). However, other factors, including aspects of its reproduction, adaptation and ecology, may also be involved in the invasion process.

Male characteristics that influence the competitive ability to mate and fertilization success can also interfere with the adaptive potential of the species. For example, the size of the sperm is a male trait that is predicted to undergo strong sexual selection (Hosken *et al.*, 2003, Snook, 2005; Scharer *et al.*, 2008), although the selective advantage of different sizes of sperm remains largely unclear (Garcia-Gonzalez and Simmonds, 2007; Amitin and Pitnick, 2007). The number of sperm and their developmental stages are also factors that can contribute to the reproductive potential of the species.

The present study aims to expand on previous studies of the biology of *Z. indianus* and the characteristics that aid its adaptation to various environments, reflected by its successful invasion of different continents. More specifically, this paper analyzes spermatogenesis and the sperm ultrastructure of a geographical strain of *Z. indianus* and *Z. sepsoides* (Duda, 1939). *Z. sepsoides* is restricted to some regions of East Africa, differs in testicular size and sperm from *Z. indianus* and is not considered an invasive species.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Origin of insects**

A strain of *Z. indianus* from Ubatuba, SP, Brazil, and a strain of *Z. sepsoides* from the Congo region of Africa were used in the present work.

### **Measurements of testes**

Linear measurements of a total of 24 testes from each species were collected. The pairs of testes were obtained from 12 eight-day-old adult males. To perform the linear measurements, the testes from *Z. indianus* were first uncoiled due to their spiral shape.

### **Preparation of slides and cytochemical techniques**

In this analysis, the testes were removed from males of different ages (1-8 days of life) from both species. The testes were stained using lacto-aceto orcein following De Vaio *et al.* (1985) and impregnated with silver nitrate following Howell and Black (1980), with modifications. After the slides were prepared, the two species were prepared for the Feulgen reaction following Mello and Vidal (1980), with modifications.

The structural and ultrastructural analysis was performed according to Cotta-Pereira *et al.* (1976), with modifications. The testes of adult *Z. indianus* and *Z. sepsoides* were removed at different developmental stages (1, 3, 5 and 8 days old) and fixed in a solution of 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4. After initial fixation for 4 hours in the refrigerator (4°C), the testes were washed three times in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 15 minutes each. Next, the material was post-fixed in a 1% osmium tetroxide solution for 2 hours in a dark, sealed bottle in the refrigerator. After this procedure, the material was washed three times in distilled water for 5 minutes each. The material was then dehydrated in a series of four increasingly concentrated acetone solutions

(30%, 50%, 70% and 90% acetone), with 15 minutes per solution, followed by dehydration in 95% and 100% acetone three times for 15 minutes each. After dehydration, the material was embedded in a 1:1 mixture of resin (*Araldite*®) and 100% acetone and incubated overnight at room temperature. The next day, the material was removed from the resin-acetone solution, placed in resin and placed in a 37°C oven for 2 hours. The testes were then removed from the bottles containing the pure resin, and the embedding process was initiated for the mold. A plate containing the mold was placed in a 60°C oven for 72 hours, allowing polymerization.

Semi-thin, 0.5 µm sections of the testes were stained with 1% toluidine blue and analyzed using a light microscope. Ultra-thin, 70 nm sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and analyzed by transmission electron microscopy. To perform period acid-Schiff (P.A.S.) staining, the slides were first prepared for structural analysis for the two species, as follows (Mello and Vidal, 1980, with modifications). A solution of 0.5% periodic acid was applied to the semi-thin, 0.5 µm sections using a dropper, and the sections were then placed in a 60°C oven for 14 minutes. Next, the sections were washed in distilled running water for 5 minutes. A Schiff reagent was added to Petri dishes, which were protected from light and were placed in a 60°C oven for 45 minutes. Following the washing of each sample in 3 distilled water baths for 5 minutes each; the slides were air-dried and mounted with polish before analysis by light microscopy.

The material prepared using conventional cytochemical and staining techniques was analyzed using a light microscope (Olympus BX40) and with Axiovision LE digital imaging software, Version 4.8 for Windows, in the Cellular Biology Laboratory of São Paulo State University (IBILCE-UNESP) in São José do Rio Preto, Brazil. The material prepared using histological techniques was analyzed and photographed using a JEOL 1011 transmission electron microscope operated at 80 kV at the Microscopy Center of the University of São Paulo Medical School in Riberão Preto, Brazil.

## RESULTS

### Morphology of testes of *Z. indianus* and *Z. sepsoides*

The testes of *Z. indianus* and *Z. sepsoides* are yellow in color (Figures 1A and 1C, respectively). In *Z. indianus*, the testes are formed by two coiled tubes of approximately 5 mm each in length (Figure 1A), whereas in *Z. sepsoides*, the testes comprise two kidney-shaped tubes of approximately 2 mm each in length (Figure 1C).

### Lacto-aceto orcein staining and Feulgen reaction

In the apical part of the testes, a large number of dividing cells was observed. During prophase I, the nuclei of the primary spermatocytes in the diplotene and diakinesis stages exhibited chromosomes that were arranged in a circular ring and were associated with each other. The sex chromosomes were separate from this ring, as indicated by arrows in Figures 2A and 2J.

The metaphase stage of meiosis I revealed six pairs of bivalent chromosomes ( $2n = 12$ ) in the nucleus in a circular arrangement (Figures 2B-C, 2E-F and 2K and 2L).

At the end of telophase I, the formation of two nuclei was observed (Figures 2D, 2G and 2M). During spermiogenesis, the spermatids were elongated (Figures 2H and 2N) and organized into long bundles in *Z. indianus* (Figure 2I) and short bundle in *Z. sepsoides* (Figure 2O). In *Z. sepsoides*, these bundles stained strongly and revealed a concentration of genetic material at their tips, corresponding to the nuclei of these spermatozooids during individualization (Figure 2O). This strong staining indicated the presence of aldehyde groups, based on the color produced by the reactive Schiff stain.

In the apical part of the testes of *Z. indianus* and *Z. sepsoides*, primary spermatocytes were mainly observed, whereas in other parts of the testes, secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa were noted (Figures 1B and 1D).

### **Impregnation by AgNOR**

Cells in various stages of spermatogenesis were observed by impregnation with AgNOR. For both species, spermatocytes in the early stages of prophase I were observed, with nucleolar corpuscles scattered throughout the cell nucleus (Figures 2P and 2S). Spermatids at later stages of elongation showed no impregnation with AgNOR along their entire length (Figures 2Q and 2T), whereas spermatozoa arranged into long bundles and strongly stained with AgNOR in their extremities were observed frequently in *Z. indianus* (Figure 2R). In contrast, in *Z. sepsoides*, sperm bundles did not exhibit this staining (Figure 2U).

### **Structural and ultrastructural analysis of the testes and spermatogenesis of *Z. indianus* and *Z. sepsoides***

The testes of *Z. sepsoides* and *Z. indianus* were analyzed at different stages of development (1, 3, 5 and 8 days old). In *Z. sepsoides*, the dividing cells (spermatocytes) and elongating cells (spermatids) were more easily detected in the young males (1-3 days old), after which spermatozooids were noted more frequently. In contrast, in *Z. indianus*, a greater abundance of sperm bundles was observed in young males (1-3 days old), with few cells in the early stages of spermatogenesis.

In the testes of both species, diverse and unique cellular structures were found. The germinal center was the location of a considerable number of germ cells, which were identified at the apex of the testis in both *Zaprionus* species. The testicular content was divided into two parts: the germ cells at the apex of the testis and the rest of the testis, which was filled with cells corresponding to other stages of spermatogenesis. The coating layer was the outer layer of cells, which wrapped completely around each testis. These cells were separated within the testis by an envelopment, at which the spermatocytes and spermatogonial cells were aligned (Figures 1B, 1D, 3A, 3B, 4A, 4C and 5A). Strongly stained granules were also observed, particularly in the testes of *Z. sepsoides*. These granules may contain glycogen. The presence of carbohydrates in these granules was confirmed by performing P.A.S. reaction on these testes (Figure 1B).

The successive stages of spermatogenesis were not visible in the testes of *Z. indianus*, perhaps due to their spiral morphology and size, which hampered their proper preparation as ultra-thin sections for observation. Alternatively, the peak of the initial stages may have occurred earlier in development, such as in the pupae. In *Z. sepsoides*, some stages of spermatogenesis were observed, with dividing cells occupying the entire apical portion of the testis together with the presence of many granules. Additionally, in regions such as the testicular apex, many circular and elongated spermatids were observed, and in other regions, bundles of spermatozoa were distributed in all directions (Figures 3A-B).

The differentiation of the spermatids in both species occurs in synchrony within the cysts, so these cells were at the same stage of maturation (Figures 4A-B and 5A-B). Another observation in ultrastructural level was the consistent number of 64 spermatozooids per bundle in both *Z. indianus* (Figures 4A-B) and *Z. sepsoides* (Figures 5A-B).

The ultrastructures of the spermatozooids in both *Z. indianus* and *Z. sepsoides* revealed that the axonemes of both species possess a 9+9+2 configuration, consisting of two pairs of



central microtubules, nine double peripheral microtubules formed by fibril A and fibril B, surrounded by nine additional microtubules accessories, plus nine spokes (Figures 4G-H and 5D-E, respectively). Additionally, proximal to the axoneme, two mitochondrial derivatives of different sizes were present (Figures 4B, 4D-G, and 5B-D) in both species. The larger mitochondrial derivative contained distinct paracrystalline material, particularly in *Z. indianus* (Figures 4D-E).

## DISCUSSION

The rapid dispersion of *Z. indianus* across different continents, and especially throughout Brazil, where this species is considered a pest on fig plantations (Stein *et al.*, 2000), has spurred a growing number of studies of their biology and history of invasion. A similar reason motivated the present study of the spermatogenesis of this species and *Z. sepsoides*, which differ in their ecological characteristics and testicular morphology. Here, it was shown that the testes of *Z. indianus* are formed by two coiled tubes of approximately 5 mm each in length, whereas the testes of *Z. sepsoides* consist of two tubes of kidney shaped appearance of approximately 2 mm each in length. These length values coincide with the linear measurements performed by Yassin and David (2010) of the testes of different species of *Zaprionus*. The *inermis* species can be classified into two categories: those species with small testes, ranging from 1.0 to 2.0 mm in length (*Z. sepsoides*, *Z. inermis*, *Z. cercus*, *Z. kolodkinae* and *Z. tsacasi*), and those species with large testes, varying from 5.2 to 5.4 mm in length (*Z. indianus*, *Z. africanus* and *Z. taronus*).

Araripe *et al.* (2004) showed that the anatomy and reproductive physiology of *Z. indianus* differ from *D. melanogaster*. For example, *Z. indianus* sperm are longer (5 mm) than the sperm of *D. melanogaster* (1.8 mm). Joly and Bressac (1994) measured the size of the

sperm and testes of several drosophilid species and found that the sperm size is approximately 6.7 mm in *Z. indianus* and 0.78 mm in *Z. sepsoides* and that the testicular sizes are 6.53 mm and 1.42 mm, respectively. These measurements correspond to the testes measurements performed in this study.

The sperm bundles in *Z. sepsoides* were shorter than in *Z. indianus*, reflecting the former's smaller size and thus smaller testes. As reported in the literature, testicles are as long as the sperm that are produced in them (Lindsley and Tokuyasu, 1980; Pitnick and Markow, 1994; Snook, 2005; Scharer *et al.*, 2008).

The diploid number of *Z. indianus* and *Z. sepsoides* was confirmed to be  $2n = 12$  chromosomes. In this study, the AgNOR technique could not distinguish the nucleolar organizer regions (NORs) in the meiotic chromosomes. In the nuclei in the prophase stage and in the sperm, the NOR was confirmed by intense protein synthesis in the anterior region, corresponding to the spermatozoid heads. Although this marking has been observed in studies of other organisms (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2005; Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2008; Costa *et al.*, 2008; Peruquetti *et al.*, 2008, 2010), few studies have examined AgNOR markings in the *Zaprionus* genus. Gupta and Kumar (1987) studied the association of polytene chromosomes with the nucleolus in four distinct Indian populations of *Zaprionus indianus* and observed that different chromosomes, such as chromosome X and the microchromosomes, are involved in the activities of the NOR.

In young *Z. sepsoides* males (1-3 days old), cells in the early stages of spermatogenesis, such as spermatocytes I and II, spermatids and a few spermatozooids, were observed more frequently than in young *Z. indianus* males. In contrast, the young *Z. indianus* males presented larger numbers of spermatids and spermatozoa and a few cells at the initial stage of spermatogenesis. This finding suggests a difference in sperm maturation between the

two species. For the genus *Drosophila*, the spermatocytes begin their first meiotic division in the pupal stage (Cooper, 1950), and the testes of most species of *Drosophila* are not fully developed at hatching and thus continue to develop during the maturation into adulthood, although this process is highly variable between species (Pitnick and Miller, 2000). The results of the present work indicate that in *Z. indianus*, a similar process occurs because one-day-old males exhibit significant quantities of sperm bundles, whereas high quantities are present in older *Z. sepsoides* males (8 days old).

The findings presented here contradict the findings of Pitnick and Miller (2000), who determined that an increase in the duration of egg-to-adult development and spermatozoa maturation after hatching in *D. hydei* selected for larger testicles, which delays the reproduction of this population. In contrast, in *Z. indianus*, which has larger testes and sperm than *Z. sepsoides*, young males exhibited fertile spermatozoa (Madi-Ravazzi, L.; David J., “personal communication”).

The fertility of *Z. indianus* is greater than that of *Z. sepsoides*, at least in laboratory experiments (Madi-Ravazzi, L.; David J., “personal communication”), indicating a difference in the adaptive value of these species. If the size differences and maturation of sperm from these species favor greater reproductive potential, this phenomenon should be investigated in detail.

The organized and targeted distribution of spermatogenic cells observed in *Z. indianus* and *Z. sepsoides* is similar to that of other Drosophilidae (Cooper, 1950; Bairati, 1968; Meyer, 1974; Hardy *et al.*, 1979; Lindsley and Tokuyasu, 1980; Fuller, 1993, Joly and Bressac, 1994; Gönczy and Dinardo, 1996, Li and Xie, 2005; Scharer *et al.*, 2008; Mojica *et al.*, 2000; Barreau *et al.*, 2008, Cheng and Mruk, 2010).

Another relevant factor was the constant 64 sperm per bundle in *Z. indianus* and *Z. sepsoides*. The mechanism underlying the formation of these bundles is similar to what occurs

in *Drosophila* and other insects. In these species, a bundle of sperm is produced by a series of mitotic divisions of the spermatogonia within a spermatid cyst (Cooper, 1950; Hardy *et al.*, 1979; Lindsley and Tokuyasu, 1980; Fuller, 1993; Fabrizio *et al.*, 1998; Mojica *et al.*, 2000).

Although the mitotic divisions within the cysts are synchronous in most insects, in some species of *Drosophila*, the divisions can also be asynchronous, and the number of sperm per bundle varies from 32, as in *D. hydei*, to 128, as in *D. pseudoobscura* (Mojica *et al.*, 2000), bees (Cruz-Landim, 2001) and Coleoptera (Name *et al.*, 2007).

According to Virkii (1969), basal orders of insects have more sperm per bundle than the newer orders, whereas the more specialized groups tend to exhibit the lowest number of sperm per bundle. Name *et al.* (2007) demonstrated, for example, that certain beetles, like scarabaeidae, have 128-512 sperm per bundle and that *Sitophilus zeamais* and *S. oryzae* exhibit approximately 260 sperm per bundle. Fewer sperm per bundle indicates a reduced production of spermatozoa, which may correspond to an adaptive value that limits genetic variability (Mojica *et al.*, 2000). Although *Z. indianus* and *Z. sepsoides* have the same number of sperm per bundle (64), there may be different numbers of cysts in these species, which is indicated by a greater abundance of sperm bundles in *Z. indianus* than in *Z. sepsoides*.

The present study confirmed the organizational pattern of the axoneme of insects following the 9+9+2 scheme, which is an arrangement of an internal 9+2 microtubules surrounded by nine additional microtubule accessories. Studies of the structural organization of the axoneme in *Drosophila* have been performed by various researchers (Perotti, 1969; Kiefer, 1970; Phillips, 1970; Dallai and Afzelius, 1991; Dallai *et al.*, 1993; Fabrizio *et al.*, 1998; Mojica *et al.*, 2000), who have confirmed the conservation of this structure in different species of *Drosophila* and the family Drosophilidae.

Two mitochondrial derivatives of different sizes are also present in both species. These structures have been studied ultrastructurally in insects using a phylogenetic approach

(Phillips, 1970; Mojica *et al.*, 2000). Some functions of mitochondrial derivatives may be related to the process of storing and releasing energy to power the mobility of the flagellum (Phillips, 1970, Lindsley and Tokuyasu, 1980).

Although relationships within the genus *Zaprionus* have been proposed recently (Yassin and David, 2010), their position within the family Drosophilidae is still debated (Yassin *et al.*, 2007, 2008, 2010; Yassin and David, 2010). Currently, most reports agree that *Zaprionus* belongs to the genus *Drosophila* and that *Zaprionus* is more closely related to *Drosophila* than to the *Sophophora* subgenera, to which the *melanogaster* subgroup belongs (Russo *et al.*, 1995; Kwiatowski and Ayala, 1999; Da Lage *et al.*, 2007; Commar *et al.*, 2012).

Studies of transposable elements demonstrated greater similarity between the sequences of species of the subgenus *Zaprionus* and some species of the *melanogaster* group than between species of the same group (Setta *et al.*, 2009). The ultrastructural observations of the organizational pattern of the axoneme (9+9+2) and the mitochondrial derivatives in the spermatozoa of the genus *Drosophila* corroborate phylogenetic relationships within the *Zaprionus* genus.

The findings presented here indicate differences in sperm maturation between the species analyzed. These differences may favor the reproductive success and adaptive value of *Z. indianus* and thus also relate to the invasive potential of the species.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) is acknowledged for financial support. Prof. Dr. Jean David (CNRS, Gif-Sur-Yvette, France) is thanked for donating the study material, and Prof. Dr. Hermione E. Melara de C. Bicudo is

thanked for her valuable suggestions. Technical assistance was provided by José Augusto Maulim (Microscopy Center, Faculty of Medicine, Ribeirão Preto, USP).

## REFERENCES

Amitin EG and Pitnick S (2007). Influence of development environment on male- and female-mediated sperm precedence in *Drosophila melanogaster*. Journal Compilation European Society for Evolutionary Biology, 20:381-391.

Amoudi MA, Diab FM and Abou-Fannah SSM (1991) *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera, Drosophilidae) in Saudi Arabia and the effect of temperature on the life cycle. J King Saud Univ Agri 3:25-35.

Amoudi MA, Diab FM and Abou-Fannah SSM (1993a) Effects of larval population density on the life cycle parameters in *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera, Drosophilidae). Pakistan J Zool 25:37-40.

Amoudi MA, Diab FM and Abou-Fannah SSM (1993b) The influence of low temperature on development, adult longevity and productivity of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera, Drosophilidae). J King Saud Univ Agri 5:263-274.

Araripe LO, Klaczko LB, Moreteau B and David J R (2004) Male sterility thresholds in a tropical cosmopolitan drosophilid, *Zaprionus indianus*. J Therm Biol 29:73-80.

Bairati A (1968) Structure and ultrastructure of male reproductive system in *Drosophila melanogaster*. II. Genital duct and accessory glands. Monit Zool Ital 2:105-182.

Barreau C, Benson E and White-Cooper H (2008) Comet and cup genes in *Drosophila* spermatogenesis: the first demonstration of post-meiotic transcription. *Biochem Soc Trans* (36)3:540-542.

Castro FL and Valente VLS (2001) *Zaprionus indianus* invading communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Drosophila Inf Serv* 84:15-17.

Chassagnard MT and Kraaijeveld AR (1991) The occurrence of *Zaprionus sensu stricto* in the Palearctic region (Diptera, Drosophilidae). *Ann Soc Entomol Fr* 27:495-496.

Cheng C and Mruk D (2010) The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Phil Trans R Soc Lond B* 365:1459-1463.

Commar LS, Galego LGC, Ceron, CR, Carareto CMA (2012) Taxonomic and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and Neotropical regions *Genet. Mol. Biol.* 35(2):395-406.

Cooper KW (1950) Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: *The Biology of Drosophila* (M. Demerec, ed), Jonh Wiley and Sons, New York pp1-61.

Costa LC, Azeredo-Oliveira MTV and Tartarotti E (2008) Spermatogenesis and Nucleolar Activity in *Triatoma klugi* (Triatomine, Heteroptera). *Genet. Mol. Biol.* 31(2):438-444.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG and David-Ferreira J F (1976) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain technol* 51:7-11.

Cruz-Landim C (2001) Organization of the cysts in bee (hymenoptera, apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia Sér Zool* 91:183-189.

Da Lage JL, Kergoat GJ, Maczkowiak F, Silvain JF, Cariou ML, Lachaise D (2007) A phylogeny of Drosophilidae using the *amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. *J Zool Syst Evol Res* 45:47-63.

Dallai R and Afzelius BA (1991) Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) (Diptera). *Int J Insect Morphol Embryol* 20:215-222.

Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S and Afzelius BA (1993) The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. *Zoo Scr* 22:193-202.

David JR, Araripe LO and Bitner-Mathé BC (2006) Quantitative trait analysis and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader of Brazil. *Heredity* 96:53-62.

de Setta N, Van Sluys MA, Capy P and Carareto CM (2009) Multiple invasions of *Gypsy* and *Micropia* retroelements in genus *Zaprionus* and *melanogaster* subgroup of the genus *Drosophila*. *BMC Evol Biol* 9:e279.

De Vaio ES, Cucci B, Castagnino AM, Franca ME and Martinez ME (1985) Meiotic differences between three triatominae species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica* 67:185-19.



Fabrizio JJ, Hime G, Lemmon SK and Bazinet C (1998) Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125:1833-1843.

Fuller MT (1993) Spermatogenesis. In: *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press. Vol. 1, pp. 71-147.

Galego LGC and Carareto CMA (2007) Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: Contribution of esterase loci polymorphisms. *Drosophila Inf Serv* 90:79-84.

Galego LG and CararetoCMA (2010) Variation at the Est3 locus and adaptability to organophosphorous compounds in *Zaprionus indianus* populations. *Ent Exp App* 13:97-105.

García-González F and Simmons LW (2007) Shorter sperm confer higher competitive fertilization success. *Evolution* 61: 816–824.

Gönczy P and Dinardo S (1996) The germ line regulates somatic cyst cell proliferation and fate during *Drosophila* spermatogenesis. *Development* 122:2437-47.

Goñi B, Fresia P, Calviño M, Ferreiro MJ, Valente VLS and Basso da Silva L (2001) First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in southern localities of Uruguay, South America. *Drosophila Inf Serv* 84:61-65.

Gupta JP (1970) Description of a new species of *Phorticella Zaprionus* (Drosophilidae) from India. *Proc Indian Nat Sci Acad* 36:62-70.

Gupta JP and Kumar A (1987) Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae): nucleolar organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. *Genetica* 74(1):19-25.

Hardy R W, Tokuyasu KT, Lindsley DL and Garavito, M (1979) The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J Ultrastruct Res* 69:180-90.

Hosken DJ, Garner TWJ and Blanckenhorn WU (2003) Asymmetry, testis and sperm size in Yellow Dung Flies. *Functional Ecology* 17, 231-236

Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.

Joly D and Bressac C (1994) Sperm length in *Drosophilidae* (Diptera): estimation by testis and receptacle lengths. *Int J Insect Morphol Embryol* 23:85-92.

Kato CM, Foureaux LV, César RA and Torres MP (2004) Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. *Ciênc Agrotec* 28:454-455 (Abstract in English).

Kiefer BI (1970) Development, organization and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. *J Cell Sci* 6:177-194.

Kwiatowski J and Ayala FJ (1999) Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. *Mol Phylogenet Evol* (13):319-328.

Lachaise D and Tsacas L (1983) Breeding-sites in tropical African Drosophilids, p. 221-332. In: Ashburner MHL Carson and Thompson JN (eds.). The genetics and biology of *Drosophila*, v.3a. London. Academic Press. 382 p.

Li L and Xie T (2005) Stem Cell Niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605-31.

Lindsley DL and Tokuyasu KT (1980) Spermatogenesis. In: Genetics and Biology of *Drosophila*. London: Academy Press. pp 225-294.

Mattos-Machado T, Solé-Cava AM, David JR and Bitner-Mathé BC (2005) Allozyme variability in an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae): Comparison of a recently introduced Brazilian population with Old World populations. *Ann Soc Entomol Fr* 41:7-13.

Mello MLS and Vidal BC (1980) Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP Editora Edgard Blucher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil.

Meyer GF and Henning W (1974) The nucleolus in primary spermatocytes of *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 46:121-144.

Mojica JM, File-Emperador S and Bruck DL (2000) Sperm bundle and spermatozoon ultrastructure in two species of the *carding* group of *Drosophila*. *Invertebr Repr Dev*, 37(2):147-155.

Morielle-Souza A and Azeredo-Oliveira MTV (2008) Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Micron* 39:1020-1026.

Name KPO, Dos Reis GP and Baó SN (2007) An ultrastructural study of spermiogenesis in two species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) *Biocell. Coleoptera. Sitophilus* (Linnaeus). *Biocell* 31(2):229-236.

Okada T, Carson HL (1983) The genera *Phorticella* Duda and *Zaprionus* Coquillett (Diptera, Drosophilidae) of the Oriental region and New Guinea. *Kontyu*, 51, 539–553.

Perotti ME (1969) Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig. *J Submicrosc Cytol* 1:171-196.

Peruquetti RL, Assis IM, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV (2008) Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron* (39):419-425.

Peruquetti RL, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV (2010) Characterization of Mongolian Gerbil Chromatoid Bodies and Their Correlation with Nucleolar Cycle During Spermatogenesis. *Reprod Dom Anim* 45:399-406.

Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* (44):243-277.

Pitnick S and Markow TA (1994) Large-male advantages associated with costs of sperm production in *Drosophila hydei*, a species with giant sperm. *Evolution* 91:9277-9281.

Pitnick S and Miller GT (2000) Correlated response in reproductive and life history traits to selection on testis length in *Drosophila hydei*. *Heredity* 84:416-426.

Russo CAM, Takezaki N and Nei M (1995) Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol Biol Evol* (12):391-404.

Santos JF, Rieger TT, Campos SRC, Nascimento ACC, Félix PT, Silva SVO and Freitas FMR (2003) Colonization of northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. *Drosophila Inf Serv* 86:92-95.

Scharer L, Dalage JL and Joly D (2008) Evolution of testicular architecture in Drosophilidae: a role for sperm length. *BMC Evol Biol* 8:143.

Schmitz HJ, Valente VL and Hofmann PR (2007) Taxonomic survey of Drosophilidae (Diptera) from mangrove forests of Santa Catarina Island, southern Brazil. *Neotrop Entomol* 36:53-64.

Setta, N and Carareto, CMA (2005) Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.* [online]. 2005, 95(1): 47-51.

Severi-Aguiar GDD and Azeredo-Oliveira MTV (2005) Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera:Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. *Caryologia* 58(4):293-299.

Snook RR (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends Ecology Evolution*, 20: 46-53.

Soto I, Corio C, Fanara JJ and Hasson E (2006) First record of *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Argentina. *Drosophila Inf Serv* 89:13-14.

Stein CP, Teixeira EP, Novo JPS (2003) Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae). *Entomotropica*, 18(3): 219-221.

Tartarotti E and Azeredo-Oliveira MTV (1999) Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia* 52(3-4):177-184.

Tavares MG and Azeredo-Oliveira, MTV (1997) Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analysed by silver staining. *Cytobios* 89:93-103.

Tidon R, Leite DF and Leão BFD (2003) Impact of the colonization of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical region: 2 years after the invasion. *Biol Conserv* 112:299-305.

Toni DC, Hofmann PRP and Valente VLS (2001) First register of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Biotemas* 14:71-85.

Van der Linde K, Steck GJ, Hibbard K, Birdsley JS, Alonso L and Mand Houle D (2006) First records of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. *Fla Entomol* 89:402-403.

Vilela CR (1999) Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Drosophila Inf Serv* 82:37-39.

Virkii N (1969) Sperm bundles and phylogenies. *Z Zelfosch* 101:13-27

Yassin A, Capy P, Madi-Ravazzi L, Ogereau D and David JR (2007) DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). *Mol Ecol Resour* 8:491-501.

Yassin A, Araripe LO, Capy P, Da Lage JL, Klaczko LB, Maisonhaute C, Ogereau D and David, JR (2008) Grafting the molecular phylogenetic tree with morphological branches to reconstruct the evolutionary history of the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). *Mol Phylogenet Evol* 47:903-915.

Yassin A, Da Lage JL, David JR, Kondo M, Madi-Ravazzi L, Prigent SR, Toda MJ (2010) Polyphyly of the *Zaprionus* genus group (Diptera: Drosophilidae). *Molecular Ecology Resources*, 55: 335-339.

Yassin A and David JR (2010) Revision of the Afrotropical species of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of two new species and notes on internal reproductive structures and immature stages. *ZooKeys* 51:33-72.

### Legends of figures

**Figure 1.** Testes and cells of *Zaprionus indianus* (A-B) and *Zaprionus sepsoides* (C-D). **A and C.** Testes seen under a stereo microscope. **B and D.** Smashing and staining with lacto-aceto orcein showing the germinal center (GC) in the apex of the testis (ap), followed by cells in division (Cd) and the spermatozooids present in the central region of the testis. Barrs: A and C (0.5mm); B and D (10  $\mu$ m).

**Figure 2.** *Zaprionus indianus* cells stained using lacto-aceto orcein (A-D) and subjected to the Feulgen reaction (E-I). *Zaprionus sepsoides* cells were stained using lacto-aceto orcein (J-M) and subjected to the Feulgen reaction (N-O). Testicular cells of *Zaprionus indianus* (P-R) and *Zaprionus sepsoides* (S-U) after silver impregnation. **A.** Prophase I (diplotene / diakinesis phase), showing the chromosomes arranged in a circular ring, and that the sexual chromosomes (arrows) were separate from this ring. **B, C, E, F.** Metaphase I of meiosis showing the six pairs of bivalent chromosomes. **D, G.** Telophase I showing the genetic material in the center of each nucleus. **H.** Elongated spermatids **I.** Spermatozooids organized into long bundles. **J.** Prophase I (diplotene / diakinesis phase), showing the chromosomes arranged in a circular ring, and that the sexual chromosomes (arrows) were separate from this ring. **K, L.** Metaphase I of meiosis showing the six pairs of bivalent chromosomes. **M.** Telophase I showing the genetic material in the center of each nucleus. **N.** Elongated



spermatids. **O.** Spermatozoid bundle presenting strong staining and a high concentration of chromosomal material at the tips of the bundles, which corresponds to the nuclei of these spermatozooids. **(P-U).** Testicular cells of *Zaprionus indianus* after silver impregnation. **P.** Spermatocytes in the initial state of prophase I, showing nucleolar bodies that were spread around the entire nucleus of each cell. **Q.** Spermatids in a more advanced stage of elongation that do not present specific impregnation along their entire length; **R.** Spermatozooids organized into long bundles with extremities that had been strongly stained by AgNOR (arrow). **(S-U)** Testicular cells of *Zaprionus sepsoides* after silver impregnation. **S.** Spermatocytes in prophase I showing the nucleolar bodies of the cells that had been subjected to silver impregnation; **T.** Spermatids in a more advanced stage of elongation that do not present specific impregnation along their entire length; **U.** Spermatozooids not showing strong AgNOR staining in one of their extremities. Barrs: 5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3.** Semi-thin histological section of *Zaprionus indianus* (**A**) and *Zaprionus sepsoides* (**B**), showing spermatids (spmt), followed by spermatozoid bundles arranged transversely and longitudinally (z). Other structures are also present in the testes, such as the coating layer (cl), the envelopment (en) and glycogen granules (gr) staining by P.A.S. reaction (note in detail of Figure B). Note these histological sections are 0.5 mm in length and stained with 1% toluidine blue. Barrs: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4.** TEM micrographs of spermatozooids (flagellum) of *Z. indianus*. **A.** Transverse section of the testis showing various spermatozoid bundles organized within cysts. **B.** Transverse section of the testis showing a bundle containing 64 spermatozooids in detail. **C.** Transverse section of the testis showing a coating layer (cl) and an envelopment (star). **D-G.** Transverse sections of a spermatozoid bundle, showing the tail region with axons (Ax) and

mitochondrial derivatives of different sizes: larger mitochondrial derivatives (MD) in which the accumulation of paracrystalline material (p) is visible and smaller mitochondrial derivatives (Md). **H.** details an axon, showing the 9+9+2 arrangement: one pair of central microtubules (TC), nine double peripheral microtubules (formed by fibril A and fibril B), surrounded by nine microtubules accessories additional, beside nine spokes (s).

**Figure 5.** TEM micrographs of spermatozooids (flagellum) of *Z. sepsoides*. **A.** Transverse section of the testis showing various spermatozoid bundles organized within cysts. **B.** Transverse section of the testis showing a bundle containing 64 spermatozooids in detail. **C, D.** Transverse section of a spermatozoid bundle, showing the tail region with axons (Ax) and mitochondrial derivatives of different sizes: larger mitochondrial derivatives (MD) and smaller mitochondrial derivatives (Md) are visible, beside a coating layer (cl) and an envelopment (star) **E.** details an axon, showing the 9+9+2 arrangement: one pair of central microtubules (TC), nine double peripheral microtubules (note fibril A and fibril B), surrounded by nine microtubules accessories additional (TA), beside nine spokes (s). Note the accumulation of dense electron material in the nine accessory microtubules and in the two central microtubules.

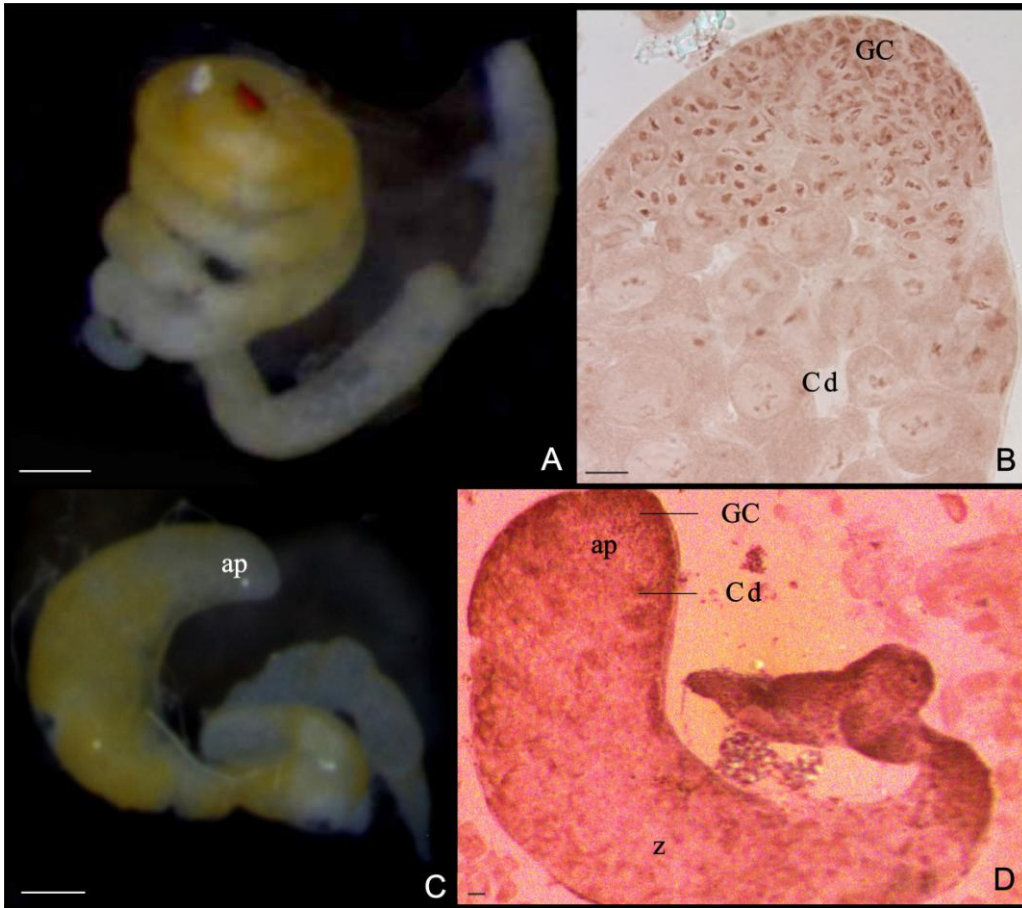


Figure 1

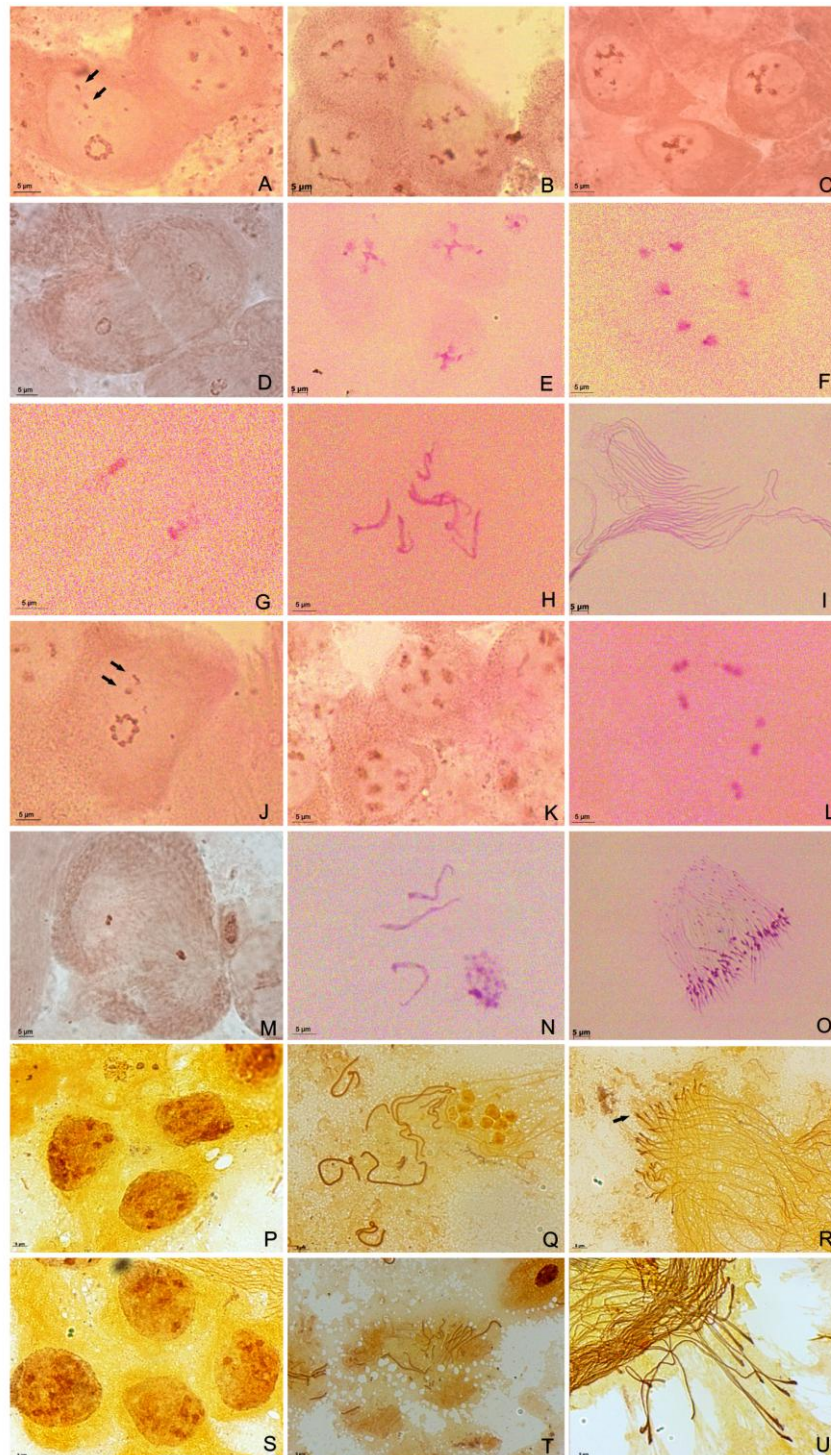


Figure 2

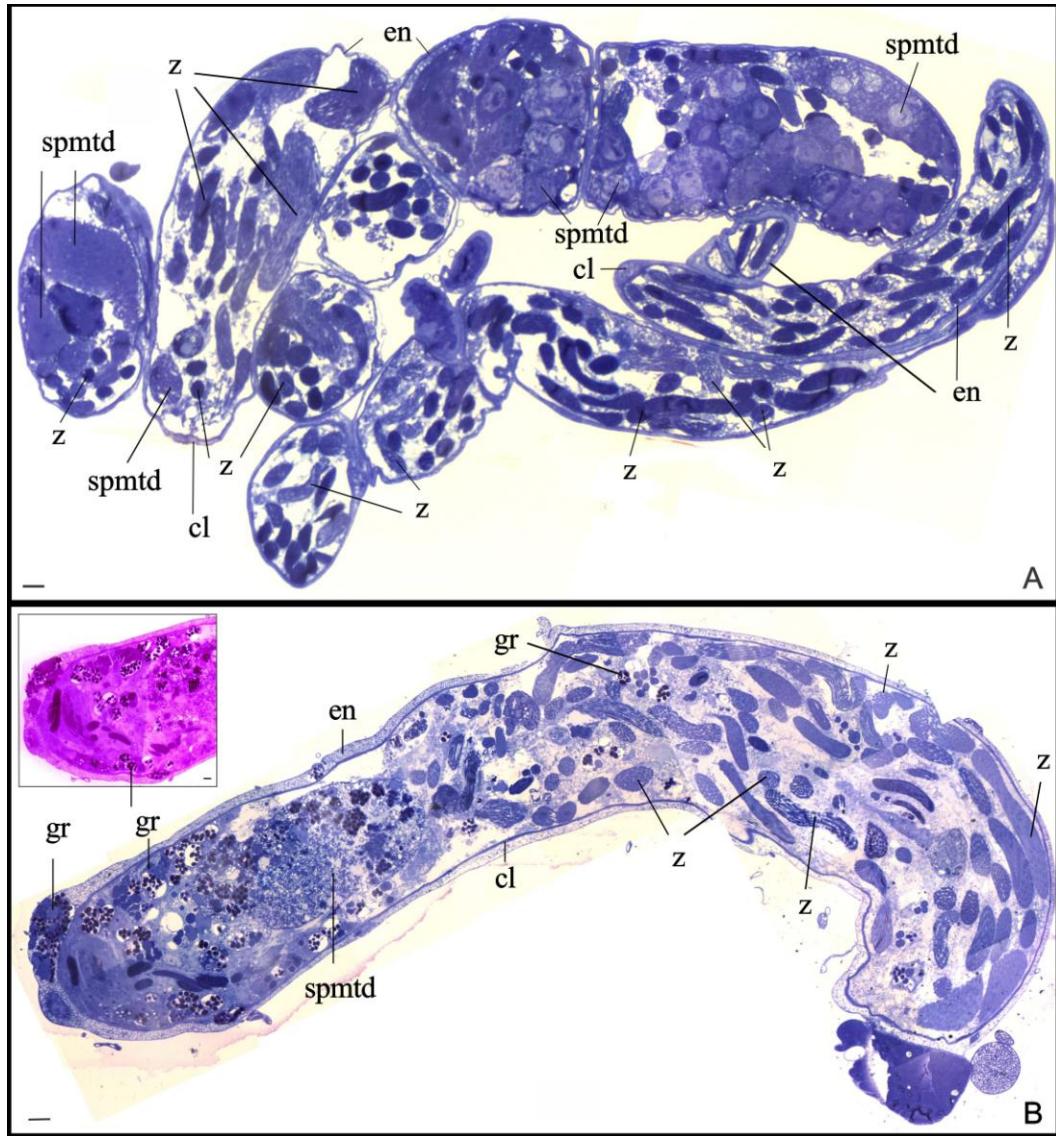


Figure 3

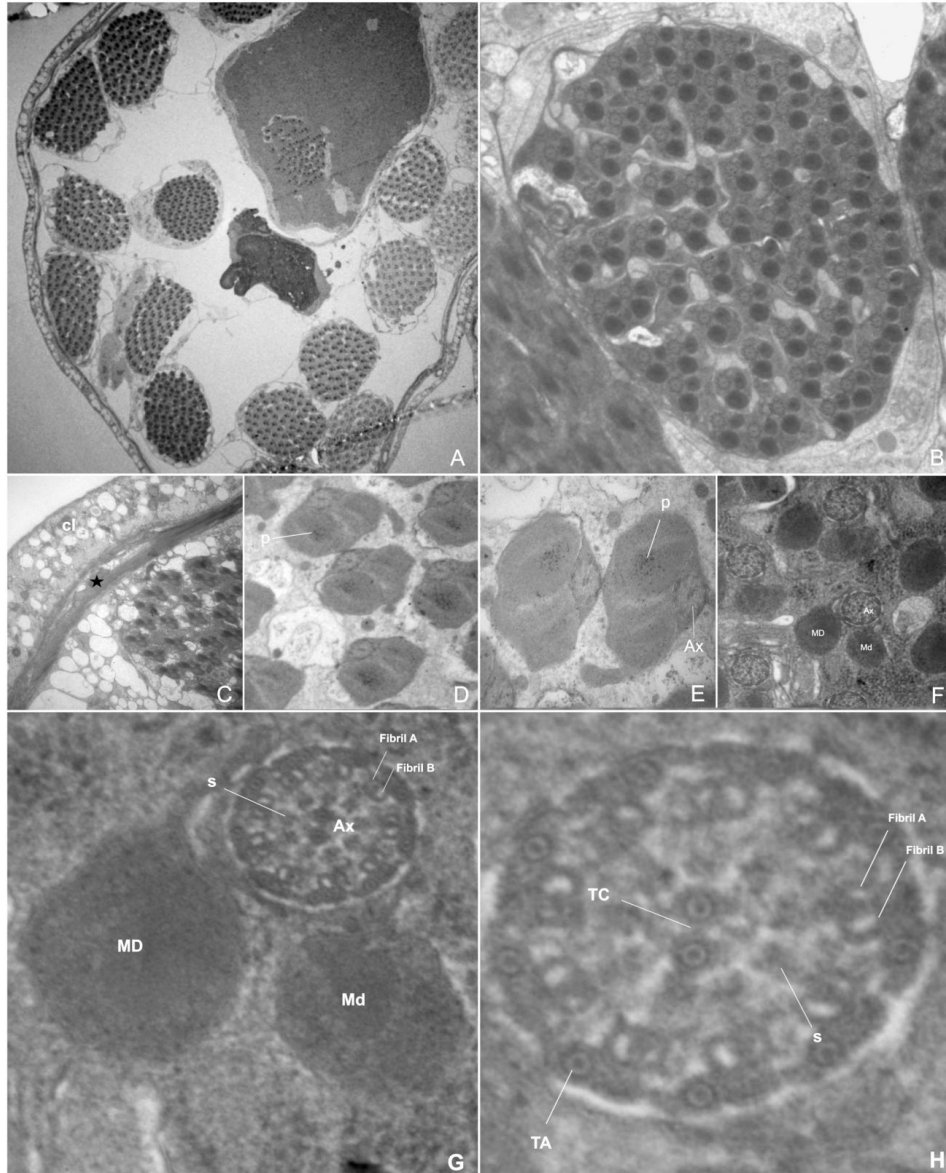


Figure 4

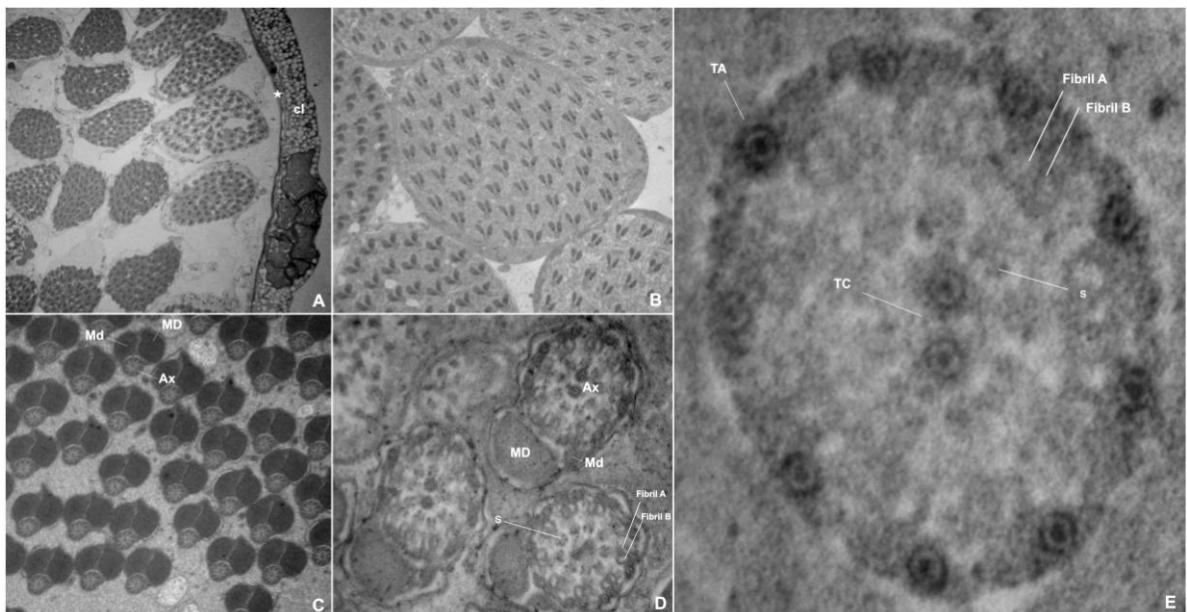


Figure 5