



Morfologia do testículo e espermatogênese da broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae)

Monique Campos Pereira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Carvalho dos Santos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR em Ciências Biológicas, Área de Concentração: ZOOLOGIA.

UNESP

Botucatu - São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Monique Campos.
Morfologia do testículo e espermatogênese em *Telchin
licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castiniidae) / Monique
Campos Pereira. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu
Orientador: Daniela Carvalho dos Santos
Capes: 20601000

1. Lepidoptero. 2. Espermatogênese. 3. Testículos. 4.
Morfologia (Biologia). 5. Broca (Inseto).

Palavras-chave: Broca gigante; Espermatogênese;
Lepidoptera; Morfologia; Testículo.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Sebastião e Maura

Aos meus amados irmãos, Rafael e Evelyn

Porque família é tudo.

Agradecimientos

A Deus

À Dra. Daniela Carvalho dos Santos

Ao Dr. Reinaldo José da Silva

Ao Centro de Microscopia Eletrônica e funcionários

À Seção de Pós-graduação e Programa de Ciências Biológicas - Zoologia

À Unesp - Instituto de Biociências de Botucatu

À CAPES

Ao Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba/ SP e Luiz Carlos de Almeida

Usina Iracema, Iracemápolis/ SP

Aos meus pais e irmãos

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho

Sumário

Resumo, 8
Abstract, 11
1. Introdução e Revisão Bibliográfica, 13
1.1 <i>Telchin licus</i>, 14
1.2 Espermatogênese em insetos, 17
1.3 Espermatogênese dicotômica em Lepidoptera, 18
2. Objetivo, 21
3. Material e Métodos, 23
3.1 Obtenção dos Insetos, 24
3.2 Coleta dos testículos, 25
3.3 Microscopia de luz, 25
3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), 27
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), 27
4. Resultados e Discussão, 28
4.1 Morfologia do testículo de larva <i>Telchin licus</i>, 29
4.2 Morfologia do testículo de adulto <i>Telchin licus</i>, 30
4.3 Espermatogênese em <i>Telchin licus</i>, 32
Espermatogônia, 33
Espermatócito, 33
Espermátide inicial, 34
Espermátide jovem apirene, 35
Espermátide tardia apirene, 36
Espermátide jovem eupirene, 36
Espermátide tardia eupirene, 36
Espermatozoide apirene, 37
Espermatozoide eupirene, 38
5. Figuras, 42
6. Conclusões, 61
Referências, 63
Anexos, 71
Anexo I, 73
Anexo II, 95
Errata, 120

Resumo

PEREIRA, M. C. Morfologia do testículo e espermatogênese da broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), Botucatu, 2015. 120p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Telchin licus (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) é um inseto praga da cultura canavieira, conhecido popularmente como broca gigante da cana-de-açúcar. No Brasil, a produção açucareira e de etanol é uma das principais atividades da economia nacional. Entretanto, apesar da sua importância econômica para o país, grande parte da produção da cana é perdida por causa dos danos causados por insetos pragas. A broca gigante encontra-se disseminada em uma área de aproximadamente 320 mil hectares no país e pode afetar de 20 a 60% da produção nos locais onde ocorre, causando perdas de até R\$ 34,5 milhões a cada safra. É na fase de larva que este inseto causa os enormes prejuízos à plantação, e por possuir um tamanho considerável é conhecida como “broca gigante”. Dentre os principais danos a cana-de-açúcar, destaca-se a “podridão vermelha”, causada por fungos que invadem as extensas galerias abertas pelas larvas, diminuindo da produção do vegetal e prejudicando a produção industrial de açúcar e álcool. A ampliação do conhecimento sobre a biologia e a reprodução deste inseto tem se tornado uma necessidade para fundamentar pesquisas sobre o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de controle desta praga e diante disso nos propusemos a caracterizar morfológicamente o testículo e investigar o processo de formação de gametas masculinos (espermatogênese) nesta espécie. Em Lepidoptera há a produção dicotômica de espermatozoides, os espermatozoides eupirenes, com núcleo, e os espermatozoides apirenes, sem núcleo. Neste estudo realizamos a descrição morfológica e ultraestrutural dos testículos em *T. licus*, além da caracterização das diferentes fases da espermatogênese e dos dois tipos de espermatozoides resultantes de tal processo. Para tanto foram utilizados larvas e adultos da broca gigante. Em larvas, os dois testículos aparecem separados e apresentam formato riniforme, já em adultos estes testículos parecem se fundir, uma vez que existe apenas um testículo de formato arredondado no corpo do adulto. O processo da espermatogênese pode ser caracterizado e sistematizado em seis etapas (espermatogônias, espermatócitos, espermátides iniciais,

espermátides jovens, espermátides tardias e espermatozoides), culminado com a formação de dois tipos de espermatozoides, os eupirenes e os apirenes.

Palavras-chave: Broca gigante; Espermatogênese; Lepidoptera; Morfologia; Testículo.

Abstract

Telchin licus (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) is a sugarcane crop pest known as giant sugarcane borer. In Brazil the production of sugar and alcohol is considered one of the main activities of the national economy. Despite the economy importance of sugarcane to the country, large amount of sugarcane production is lost because of damage caused by insect pests. The giant sugarcane borer is widespread in an area about 320 thousands of hectares and can affect from 20% to 60% of the production where it occurs, causing losses up to R\$ 34,5 million each harvest. In the larval stage this insect can causes huge losses for crop and because of your body size it is known as “giant borer”. It can mention “podridão vermelha” among the main damages caused by fungi that enter in the hollow open by the larvae in sugarcane, thus decreasing the sugar and alcohol production. The expansion of knowledge about the reproduction biology of this insect has become a requirement to support research on the development and improvement of control methods to this pest and faced with we set out to characterize morphologically the testis and investigate the formation process of male gametes (spermatogenesis) in this specie. The Lepidopteran order has the dichotomous spermatogenesis with the production of eupyrene and apyrene sperm (nucleate and enucleated). In this study it was made the morphological and ultrastructural description of *T. licus* testis and the characterization of different spermatogenesis steps and the characterization of the two sperm types. It was used larvae and adults to the research. The spermatogenesis process can be organized and characterized in six steps (spermatogonia, spermatocyte, early spermatid, young spermatid, late spermatid and sperm), resulting in two sperm types, the eupyrene and apyrene ones.

Key-words: Giant borer; Lepidoptera; Morphology; Spermatogenesis; Testis.

***1. Introdução e
Revisão Bibliográfica***

1.1 *Telchin licus*

Telchin licus (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) é um inseto praga da cultura canavieira, conhecido popularmente como broca gigante da cana-de-açúcar (Silva Júnior *et al.*, 2008; Almeida & Arrigoni, 2009). Este inseto pertence à subordem Glossata, série Ditrysia (mariposa), superfamília Castnioidea e subfamília Castniinae (Gallo *et al.*, 2002; Gullan & Cranston, 2007; Moraes & Duarte, 2009).

De acordo com Dias Filho & Tangerine (1991), Mendonça *et al.* (1996), Moraes & Duarte (2009) e Wadt (2012) existe grande variação de nomenclatura quando se refere a broca gigante da cana-de-açúcar tais como: *Castnia licus*, *Castnia licoides*, *Leucocastinias licus*, *Eupalamides licus* e *Papilio licus* (Garcia & Botelho, 2009).

A família Castniidae possui um pouco mais de 150 espécies e além do Brasil, também ocorre em países como Argentina, Colômbia, Costa Rica, Chile, Equador, Guiana, México, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Venezuela (Guagliume, 1972-1973; Moraes & Duarte, 2009; Wadt, 2012).

Segundo Guagliume (1972) sua ocorrência na cultura canavieira foi citada pela primeira vez no Brasil em 1927, quando Dr. Costa Lima verificou a presença de larvas deste inseto nos canaviais da Usina Tiuma, em Pernambuco (Almeida *et al.*, 2007; Almeida & Arrigoni, 2009).

A broca gigante é um dos mais importantes insetos praga que ataca a cultura canavieira na região Nordeste do Brasil. Esta praga encontra-se disseminada em uma área de aproximadamente 320 mil hectares e causa uma perda de aproximadamente R\$ 34,5 milhões a cada safra (Almeida *et al.*, 2007; Silva-Brandão *et al.*, 2013). Esta considerável praga endêmica anteriormente restrita às regiões Norte e Nordeste do Brasil, foi detectada pela primeira vez na região Sudeste em Julho de 2007 em um canavial da propriedade agrícola Chácara Paineira localizada na região de Limeira, São Paulo (Almeida *et al.*, 2007; Benedini & Conde, 2008; Almeida & Arrigoni, 2009).

Além da cultura de cana-de-açúcar, a fase larval de *T. licus* pode ser encontrada em abacaxizeiro (*Ananas comosus*), musáceas (*Ensete* spp., *Musa* spp., e *Musella* spp), gramíneas (*Paspalum virgatum*, *P. densum* e *Pennisetum purperem*) e em muitas espécies da família Orchidacea (Guagliume, 1972- 1973; Wadt, 2012).

Acredita-se que a introdução desta praga na região Sudeste ocorreu pelo fato de as divisas das áreas de plantações de cana-de-açúcar apresentar viveiros onde são

cultivadas e comercializadas plantas ornamentais que podem ter sido trazidas de áreas onde esta praga apresenta ocorrência natural nestas plantas hospedeiras (Almeida *et al.*, 2007).

Em condições de campo nas regiões Norte e Nordeste, o *T. licus* apresenta ciclo biológico com duração de aproximadamente cento e oitenta dias, no qual dez dias correspondem ao período de incubação, cento e dez dias correspondem ao período larval, quarenta e cinco dias correspondem ao período de pupa e de dez a quinze dias correspondem a longevidade dos adultos (Almeida *et al.*, 2007; Benedini & Conde, 2008; Venzon *et al.*, 2008). Almeida & Arrigoni (2009) relatam que o tempo médio de vida para adultos machos é de 6,7 dias e para fêmeas é de 7,4 dias; e ainda relata que o tempo máximo de vida para adultos machos é de dez dias e para fêmeas é de onze dias. A broca gigante pode apresentar dois ciclos populacionais por ano, com maior pico de adultos de junho a julho e menor pico populacional de adultos de novembro a dezembro (Benedini & Conde, 2008; Venzon *et al.*, 2008, Wadt, 2012).

Os ovos de *T. licus* possuem inicialmente cor rosada e depois adquirem coloração verde-azeitona e alaranjada. Medem quatro milímetros e possuem cinco arestas longitudinais, com formato de carambola (Benedini & Conde, 2008; Silva Júnior *et al.*, 2008).

As larvas da broca gigante podem chegar a oitenta milímetros de comprimento e a doze milímetros de largura. São caracterizadas por coloração branco-leitosa com algumas pintas pardas no pronoto e com sua largura decrescendo da parte torácica para a parte anal (Almeida *et al.*, 2007; Silva Júnior *et al.*, 2008; Venzon *et al.*, 2008).

Próximo à fase de muda as larvas permanecem na base das touceiras abaixo do nível do solo onde preparam a câmara pupal, prejudicando a brotação das soqueiras (Almeida *et al.*, 2007; Oliveira, 2009). A pupa sofre transformações no interior de um casulo feito de fibras de cana-de-açúcar que mede cerca de quatro centímetros de comprimento, dando origem ao adulto que será responsável por novas infestações (Gallo *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2007; Silva Júnior *et al.*, 2008).

As mariposas possuem coloração pardo-escura ou quase preta com manchas e faixa transversal branca nas asas anteriores, faixa transversal branca mais larga e manchas alaranjadas na margem externa das asas posteriores. Podem atingir trinta e cinco milímetros de comprimento e noventa milímetros de envergadura (Almeida *et al.*, 2007; Venzon *et al.*, 2008). No Nordeste brasileiro, os adultos da broca

gigante aparecem em vôos diurnos e rápidos no período do verão (Gallo *et al.*, 2002) e as fêmeas ovipositam de cinquenta a cem ovos em touceiras velhas, preferencialmente em meio a detritos e de caules cortados (Gallo *et al.*, 2002; Benedini & Conde, 2008). De acordo com Almeida & Arrigoni (2009) a fêmea pode ovipositar até cento e trinta e nove ovos durante sua longevidade, sendo a quantidade máxima de quarenta e cinco ovos por dia e por fêmea.

Duas características presentes em *T. licus* nos permite observar o dimorfismo sexual destes insetos: o frênuolo (estrutura presente nas asas posteriores utilizadas para o acoplamento das asas durante o vôo) e a coloração do abdome. As fêmeas possuem frênuolo formado por sete espinhos, enquanto que a mesma estrutura em machos é formada por apenas um espinho. O abdome em fêmeas apresenta coloração cinza escura e em machos a coloração é cinza claro (Guagliumi, 1972-1973; Mendonça *et al.*, 1996, Almeida & Arrigoni, 2009; Wadt, 2012).

No Brasil, a área cultivada com cana-de-açúcar atingiu em 2008 mais de 7,5 milhões de hectares, tornando a produção açucareira e de etanol uma das principais atividades da economia nacional (IBGE, 2008). Mesmo com sua grande importância, parte da cultura canavieira é perdida por causa dos danos causados por insetos pragas presentes nas regiões produtoras do país (Oliveira, 2009). Nos locais de ocorrência da broca gigante, esta praga pode afetar de 20 a 60% da produção de cana, açúcar e álcool (Gallo *et al.*, 2002).

O principal prejuízo causado pela broca gigante nas plantações de cana-de-açúcar é resultante da ação das larvas que abrem galerias verticais no colmo do vegetal, até 1/3 do tamanho do colmo, próximo às raízes. Por ser um inseto de tamanho considerável, são grandes os danos para a planta, provocando perda de peso e podendo causar até sua morte (Gallo *et al.*, 2002; Oliveira, 2009). Além dos prejuízos citados anteriormente, as galerias abertas pelas larvas facilitam a entrada de fungos da “podridão vermelha” (*Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*), que causam a inversão da sacarose, diminuindo dessa forma a produção de açúcar (Oliveira, 2009).

A broca gigante é uma praga de difícil controle, pois a larva fecha o orifício da galeria onde ela se encontra com restos de alimento após o corte da cana. A larva passa a viver escondida na parte mais profunda e fresca da touceira, alimentando-se do rizoma, de restolhos e de raízes, o que debilita e reduz o poder germinativo da touceira. Desta forma, tornando mais difícil o acesso de predadores e tornando ineficiente a aplicação de inseticidas (Benedini & Conde, 2008; Oliveira, 2009).

Para o controle da broca gigante já foram testados métodos químicos, mecânicos e biológicos que não obtiveram grande sucesso. O único método de controle desta praga que tem sido eficiente é o método de catação, o qual é realizado manualmente por trabalhadores, no campo, entretanto, é caracterizado como um método de custo elevado, por envolver trabalho manual humano (Botelho *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007; Benedini & Conde, 2008).

1.2 Espermatogênese em insetos

A espermatogênese é um processo que compreende a multiplicação, o desenvolvimento e a maturação das células da linhagem espermatogênica para a formação de espermatozoides ou gametas masculinos haploides (Medeiros, 1997).

Os espermatozoides são células especializadas que passaram por uma evolução morfológica, sendo um verdadeiro modelo de diferenciação celular. Algumas de suas características estruturais estão relacionadas com o seu papel na fertilização e outras têm causas evolutivas ou ainda são objetos de estudos especulativos (Phillips, 1974; Baccetti & Afzelius, 1976).

O aparelho reprodutivo masculino nos insetos tem como principais funções a produção e o armazenamento de espermatozoides, bem como seu transporte de uma forma viável, para o aparelho reprodutivo feminino (Gullan, 2007). Morfologicamente, o aparelho reprodutivo masculino consiste em um par de testículos, os quais possuem uma série de folículos testiculares (onde são produzidos os espermatozoides) que variam em organização e número dependendo da espécie. Os túbulos ou folículos testiculares abrem-se separadamente em dutos espermáticos, denominados vasos deferentes. Os vasos deferentes se alargam para formar a vesícula seminal, que é o órgão responsável pelo armazenamento de espermatozoides. O aparelho reprodutivo masculino também possui um par de glândulas acessórias. Os vasos deferentes pares unem-se no local onde levam ao duto ejaculatório, que é responsável por transportar o sêmen até o gonópore. Dentro de cada folículo as células germinativas estão organizadas em cistos, onde ocorre a espermatogênese (Phillips, 1970; Wigglesworth, 1984; Mancini & Dolder, 2004a; Ruppert *et al.*, 2005; Friedländer *et al.*, 2005; Gullan, 2007; Dallai 2014).

O cisto que envolve as células da linhagem germinativa por todo o processo de espermatogênese nada mais é do que um envoltório formado por células somáticas

delgadas. Estes cistos se organizam de forma polarizada no folículo testicular, refletindo a progressão temporal do processo de espermatogênese. Cistos contendo células em estágios iniciais da espermatogênese se localizam próximo as células apicais do testículo e cistos contendo espermatozóides maduros se posicionam próximos ao vaso deferente (Friedländer *et al.*, 2005), ou seja, a maturação dos cistos de espermatozoides ocorre no sentido apical-basal (Szöllösi, 1982) e no interior dos cistos, as células espermáticas se desenvolvem geralmente de modo sincrônico (Phillips, 1970; Baccetti, 1972; Mancini, & Dolder, 2004 a; Friedländer *et al.*, 2005).

Na maior parte dos insetos da ordem Lepidoptera, as células germinativas passam por seis mitoses sucessivas, produzindo sessenta e quatro espermátocitos primários, os quais entram em meiose, dando origem a duzentos e cinquenta e seis espermátides (Phillips, 1970; Lai-Fook, 1982; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004a; Friedländer *et al.*, 2005). As espermátides se desenvolverão em duzentos e cinquenta e seis espermatozoides após passarem pelo período de maturação pós-meiótica, conhecido como espermiogênese, o qual corresponde ao período da espermatogênese em que ocorrem alterações morfológicas e funcionais. As citocineses, que acontecem ao final das divisões mitóticas sincrônicas durante o período multiplicativo das células espermáticas, são incompletas e, conseqüentemente, as células permanecem interligadas por meio de pontes citoplasmáticas (King & Akai, 1971; Mandelbaum, 1980; King *et al.*, 1982; Garvey *et al.*, 2000; Friedländer *et al.*, 2005).

1.3 Espermatogênese dicotômica em Lepidoptera

A produção polimórfica de espermatozoides pode ser observada em grupos de invertebrados, como rotíferos, turbelários, moluscos e insetos (Jamieson, 1987; Friedländer, 1997; França & Báó, 2000; Mancini & Dolder, 2004 a; Friedländer *et al.*, 2005, Dallai *et al.*, 2014). O primeiro sistema de classificação de espermatozoides em invertebrados utilizou a presença de cromossomos para a diferenciação dos tipos existentes. Nesse sistema, eram denominados eupirenes os espermatozoides com cromossomos haploides e apirenes os espermatozoides sem cromatina, portanto sem núcleo (Swallow & Wilkinson, 2002).

Em insetos machos de algumas ordens é relatada a presença do polimorfismo espermático, tais como as ordens Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Heteroptera e Lepidoptera (Mancini & Dolder, 2004a).

A ordem Lepidoptera apresenta a espermatogênese dicotômica que envolve a produção de dois tipos de espermatozoides: o espermatozoide eupirene – nucleado, e o espermatozoide apirene – anucleado (Riemann, 1970; King & Akai, 1971; Katsuno, 1977; Leviatan & Friedländer, 1979; Lai-Fook, 1982; Corsatto-Alvarenga, 1987; Wolf *et al.*, 1987; LaChance & Olstad, 1988; LaChance & Olstad, 1988a; Medeiros, 1997; Kubo-Irie *et al.*, 1998; Jamieson *et al.*, 1999; França & Bão, 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2001; Mancini & Dolder, 2003; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedlander *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005; Alves, 2006, Pereira, 2011).

Na porção anterior, o espermatozoide eupirene é caracterizado pela presença de núcleo e acrossomo tubular formando uma “cabeça” alongada. Possui uma longa cauda com axonema de arranjo microtubular do tipo “9+9+2” e dois derivados mitocondriais dispostos paralelamente ao axonema. Os espermatozoides eupirenes possuem apêndices extracelulares denominados reticular e laciniado, que se estendem por todo o comprimento do espermatozoide, e são exclusivos da ordem Lepidoptera. Destaca-se como função dos espermatozoides eupirenes a fertilização de óvulos (França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedländer *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005).

O espermatozoide apirene se caracteriza pela ausência de núcleo, extremidade anterior ou “cabeça” recoberta por um capuz denso e uma longa cauda. O flagelo possui axonema com arranjo microtubular do tipo “9+9+2” e dois derivados mitocondriais que se estendem paralelamente ao axonema, assim como nos espermatozoides eupirenes. Os espermatozoides apirenes não apresentam apêndice reticular e nem apêndices laciniados uma vez que essas estruturas são específicas dos espermatozoides nucleados (eupirene) da ordem Lepidoptera (França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedländer *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005; Dallai, 2014).

Os dois tipos de espermatozoides são considerados morfologicamente e funcionalmente diferentes. Nos folículos testiculares da maioria dos Lepidoptera, os dois tipos de espermatozoides formam-se a partir de diferentes cistos e em tempos diferentes (Jamieson, 1987; Mancini & Dolder, 2004a). Apesar do fato de apirenes

serem inférteis, 50-90% destes espermatozoides são transferidos para o trato feminino (Jamieson, 1987; Friedländer, 1997).

Quanto ao papel fisiológico desempenhado pelos espermatozoides apirenes, alguns estudos sugerem que estes espermatozoides anucleados atuam na separação dos longos feixes de espermatozoides eupirenes (Katsuno, 1977; Osanai *et al.*, 1987); outros estudos sugerem que células apirenes desempenham função no transporte das células eupirenes até o trato reprodutivo feminino. No entanto, estudos mais recentes indicam que as células apirenes estão envolvidas na competição espermática (Mancini & Dolder, 2004a). Segundo Dallai (2014), acredita-se que o espermatozoide apirene desempenha um papel benéfico na assistência do espermatozoide eupirene, fornecendo nutrientes e o ajudando a alcançar o trato genital da fêmea. De acordo com Swallow & Wilkinson (2002) os espermatozoides eupirenes são maiores, mais grossos e possuem maior conteúdo mitocondrial do que os espermatozoides apirenes, porém ambos os espermatozoides podem alcançar a espermateca da fêmea (local de armazenamento de espermatozoides por fêmeas fertilizadas). Embora o espermatozoide apirene não esteja envolvido diretamente com o processo de fertilização, sua produção acontece em grande quantidade, podendo atingir até 90% do total dos dois tipos de espermatozoides em algumas espécies.

Apesar da espermatogênese dicotômica em Lepidoptera ser investigada por vários autores (Riemann, 1970; King & Akai, 1971; Katsuno, 1977; Leviatan & Friedländer, 1979; Lai-Fook, 1982; Corsatto-Alvarenga, 1987; Wolf *et al.*, 1987; LaChance & Olstad, 1988; LaChance & Olstad, 1988a; Medeiros, 1997; Kubo-Irie *et al.*, 1998; Jamieson *et al.*, 1999; França & Bão, 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2001; Mancini & Dolder, 2003; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedlander *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005; Alves, 2006, Pereira, 2011), poucos são os estudos morfológicos/ ultraestruturais que apresentam uma sistematização detalhada dos estágios sequenciais das modificações morfológicas sofridas pelas células germinativas na espermatogênese (Holt & North, 1970; King & Akai, 1971; Medeiros, 1986; Corsatto-Alvarenga, 1987, Garbini & Imberski, 1987).

2. Objetivo

Considerando a importância econômica de *Telchin licus* na cultura canavieira e a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito dos aspectos biológicos da reprodução desta praga, os objetivos deste estudo foram:

- Caracterizar morfológicamente o testículo de larvas e adultos da broca gigante.
- Caracterizar morfológicamente o processo da espermatogênese, assim como as diferentes células envolvidas neste processo.
- Propor uma sistematização baseada nas características morfológicas celulares encontradas para os estágios/ etapas do processo de espermatogênese na broca gigante.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção dos Insetos

Larvas e adultos de *T. licus* foram fornecidos pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) de Piracicaba, SP e pela Usina Iracema de Iracemópolis, SP.

As larvas e adultos utilizados neste trabalho foram coletados no campo (canaviais), com auxílio de trabalhadores do CTC e da Usina Iracema, através da utilização de ferramentas agrícolas manuais (facões) para exposição das raízes e coleta manual das larvas. Os adultos foram coletados com o auxílio de puçás. Foram realizadas quatro coletas entre 2011 e 2013, distribuídas da seguinte forma: julho de 2011; janeiro de 2012; julho de 2012 e janeiro de 2013. Nas coletas realizadas no mês de janeiro capturavam-se larvas e nas coletas realizadas no mês de julho capturavam-se adultos.



Larva, pupa e casulo de *T. licus*
Fonte própria



Larva de *T. licus*
Fonte própria



Vista dorsal de macho de *T. licus*

Fonte: Moraes & Duarte (2009)

3.2 Coleta dos testículos

A coleta dos testículos de larvas e adultos foi realizada na própria CTC e na Usina Iracema, logo após a obtenção dos insetos no campo, uma vez que ambos os locais não permitiam a saída com insetos vivos, devido ao risco de infestação em outras plantações. Foram utilizadas 40 larvas medindo de 4 a 6 centímetros de comprimento e de 5 a 9 milímetros de largura e 40 adultos machos. Os insetos foram dissecados sob lupa pela região ventral e após a identificação dos testículos, os mesmos foram pré-fixados no local (ainda no corpo do inseto), por gotejamento de solução fixadora modificada de Karnovsky contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 em temperatura ambiente e logo em seguida, os testículos foram individualizados e colocados em frascos de vidro contendo a mesma solução fixadora por 24 horas. No Laboratório da UNESP, Botucatu, esses testículos já fixados foram submetidos aos protocolos de preparação para microscopia de luz e eletrônica, conforme segue.

3.3 Microscopia de luz

Após a fixação inicial em solução modificada de Karnovsky por 24 horas, o material foi submetido ao protocolo de inclusão em metacrilato-glicol (historresina JB4

da Polysciences), seguindo a desidratação em álcool 70% e álcool 95%, após isso o material foi submetido a infiltração em mistura de resina (sem catalisador) e álcool 95% na proporção 1:1 por cinco horas, posteriormente seguiu para infiltração em resina (com catalisador) em temperatura ambiente por vinte e quatro horas e finalmente para inclusão em resina com catalisador e polimerização em estufa a 37°C por vinte e quatro horas.

Através do micrótomo foram feitos cortes no material de 3µm. Os cortes foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina e Reação de Feulgen. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DM 500.

A) Hematoxilina-Eosina (Pearse, 1972)

Os cortes histológicos foram hidratados com água destilada. Posteriormente foram tratados com Hematoxilina, por quinze minutos; lavados em água corrente por dez minutos e tratados com Eosina, durante quinze minutos. Após retirar o excesso de corante com água destilada, os cortes foram desidratados com uma lavagem de álcool 90% e três lavagens em álcool 100%. Então, os cortes foram diafanizados em álcool mais xilol, e logo após, foram feitas três lavagens em xilol. Após este processo, as lâminas foram montadas com Permount.

B) Reação de Feulgen (Pearse, 1972)

Os cortes foram lavados em água destilada e submetidos à hidrólise controlada com ácido clorídrico 1N por quinze minutos à 60° C. Para deter a hidrólise, os cortes foram colocados em água destilada gelada e posteriormente lavados em água corrente por dez minutos. Logo após, foram incubados com Reativo de Schiff por quarenta e cinco minutos e depois submetidos à lavagem em água corrente por dez minutos. Os cortes foram contra-corados com verde luz 1% por dez minutos. Lavados mais uma vez em água corrente, de forma rápida, para a retirada do excesso de corante. Após esse procedimento, os cortes foram desidratados com uma lavagem de álcool 90%, e três lavagens em álcool 100%. Então, os cortes foram diafanizados em álcool mais xilol, e logo após, foram feitas três lavagens em xilol. Após este processo, as lâminas foram montadas com Permount.

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O material biológico foi processado de acordo com o protocolo de rotina do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB – UNESP, Botucatu. As amostras biológicas foram fixadas em solução modificada de Karnovsky (mistura de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) por vinte e quatro horas. Após a fixação inicial as amostras foram submetidas à pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em mesmo tampão por duas horas. Duas lavagens em água destilada por cinco minutos cada; incubação em acetato de uranila 0,5 em solução aquosa por duas horas. Desidratação em acetona 50% sendo duas trocas de dez minutos cada. Desidratação em acetona 70% com duas trocas de dez minutos cada. Desidratação em acetona 90% com três trocas de quinze minutos cada e desidratação em acetona 100% com três trocas de quinze minutos cada. Colocado em mistura de acetona 100% mais resina na proporção de 1:1 por vinte e quatro horas. Incluído em resina Araldite.

Os cortes de 0,5 μ m foram corados em solução de azul de metileno. Dos blocos selecionados foram feitos cortes ultrafinos que foram submetidos à contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo, que posteriormente foram examinados em Microscópio Eletrônico de Transmissão TECNAI Spirit.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O material biológico foi processado de acordo com o protocolo de rotina do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB – UNESP, Botucatu. As amostras biológicas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por vinte e quatro horas. Após fixação inicial as amostras foram submetidas a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em mesmo tampão por duas horas. Desidratação em álcool etílico 7,5%, 15% , 30%, 50%, 70%, 90% e 100% com duas trocas cada. Secagem em ponto crítico CPD 020 (Balzer Union) e metalização com pó de ouro em metalizador SCD 050 (BAL-TEC). Após o processamento, as amostras foram analisadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura QUANTA 200 da FEI Company.

4. Resultados e Discussão

4.1 Morfologia do testículo de larva *Telchin licus*

A larva de *T. licus* apresenta um par de testículos de formato riniforme contendo internamente cistos compostos por células da linhagem germinativa, as células espermiáticas, envoltas por células somáticas, as células císticas (Figs. 1A, 1B, 1C). Cada testículo encontra-se envolto por túnica celular, a qual emite septos dividindo cada testículo em quatro folículos. O folículo testicular é composto por duas regiões: extremidade distal, localizada no lado convexo do folículo e extremidade proximal, localizada no lado côncavo do folículo. Na região distal localiza-se o germário, região de proliferação celular, onde ocorre a produção contínua de espermatogônias, e na região proximal estão localizados os cistos de espermatócitos. O processo de espermatogênese acontece no interior de cistos envoltos pelas císticas a partir da extremidade distal para a extremidade proximal no folículo testicular (Figs. 2A, 2B, 2C, 2D). As células císticas são delgadas com núcleo basófilo. As espermatogônias possuem formato arredondado com citoplasma acidófilo e núcleo basófilo com formato também arredondado, acompanhando o formato da célula. Alguns cistos de espermatogônias aparecem em processo de divisão celular, evidenciado pela compactação da cromatina em diferentes fases da mitose (Figs. 3A, 3B). Espermatócitos são células com volume citoplasmático e nuclear maior do que o volume de espermatogônias. Possuem citoplasma acidófilo com núcleo arredondado, volumoso e basófilo. Encontram-se envoltos por célula cística delgada de núcleo basófilo (Figs. 3C, 3D).

As características morfológicas de testículo de larvas de *T. licus* tais como o formato testicular, túnica de revestimento e número de folículos, estão de acordo com a descrição feita por Lai-Fook (1982) em *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperiiidae), Corsato-Alvarenga *et al.* (1987) em *Methona themisto* (Lepidoptera: Ithomiidae), Pereira (2011) em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), Friedländer *et al.* (2005) em uma revisão sobre a espermatogênese na ordem Lepidoptera e Dallai (2014) em ampla revisão sobre Hexápoda. Segundo a literatura, o número de folículos testiculares é bastante variado dependendo da espécie analisada, como por exemplo, em *Palembus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) cada testículos possui seis folículos testiculares circulares (Almeida & Cruz-Landin, 2000), e em muitos insetos da ordem Diptera, cada testículo consiste somente em um folículo (Phillips, 1970). Com relação ao formato dos testículos, também existe variação fora da ordem Lepidoptera, como relatado por Paoli *et al.*, (2013) em *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera,

Platygastridae) que possui dois testículos estreitos com formato de cone na fase de larva; os autores também descrevem que as espermatogônias apresentam núcleo volumoso e arredondado e encontram-se interconectadas umas as outras por pontes citoplasmáticas, tal como observado na broca gigante e descrito mais adiante.

De acordo com Mancini & Dolder (2004 a), Friedländer *et al.* (2005) e Pereira (2011), o testículo de larvas de insetos da ordem Lepidoptera apresenta duas regiões foliculares distintas, a extremidade distal e extremidade proximal, tal como encontrado nos testículos de larvas de *T. licus*. A presença de cistos contendo células em processo de divisão celular observados nos testículos de larvas na broca gigante, provavelmente corresponda a região do germário nos folículos testiculares deste inseto, assim como descrito por Dallai (2014) que relata a presença do germário (centro proliferativo de células germinativas) na região apical de folículos testiculares em Hexapoda e por Friedländer *et al.* (2005) e Pereira (2011) para outros insetos da ordem Lepidoptera.

Nos testículos de larvas de *T. licus* foram observados apenas cistos de espermatogônias e de espermátócitos, o que difere do estudo feito por Pereira (2011) que relatou a presença de cistos de espermatogônias, espermátócitos, espermátides e espermatozóides em larvas de *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Provavelmente esta diferença no desenvolvimento e avanço da espermatogênese em *D. saccharalis* se deva ao fato de que as larvas utilizadas por Pereira (2011) estivessem no último instar larval e as larvas de *T. licus* utilizadas no presente estudo apresentavam tamanho entre 4 e 6 centímetros, as quais acreditamos pertencer ao penúltimo instar larval. Tal suposição sobre a etapa de desenvolvimento larval (instar) de *T. licus* foi baseada nos dados da literatura sobre o comprimento total que uma larva desta espécie pode chegar, que é até oito centímetros (Almeida *et al.*, 2007; Silva Júnior *et al.*, 2008; Venzon *et al.*, 2008), uma vez que não foi encontrada referência específica com a classificação dos instares larvais para esta espécie.

4.2 Morfologia do testículo de adulto *Telchin licus*

O adulto de *T. licus* apresenta um único testículo de formato arredondado e conectado ao vaso deferente (Figs. 4A, 4B, 4C, 4D), contendo internamente cistos compostos por células da linhagem germinativa envoltos por células císticas, assim como os cistos presentes em larva. Entretanto o testículo único presente em adultos é

composto por mais de quatro folículos testiculares, dependendo do plano de corte do testículo e apesar de não ter sido possível a obtenção de uma imagem histológica onde pudéssemos visualizar todos os folículos testiculares (Figs. 5A, 5C, 5D). A fusão dos testículos em adultos de insetos da ordem Lepidoptera parece ser um fenômeno bastante comum para algumas espécies desta ordem. Segundo Friedländer *et al.* (2005), os testículos de larvas da ordem Lepidoptera apresentam um par de testículos que durante a fase adulta pode sofrer o processo de fusão, tal como descrito para os insetos *C. ethlius*, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), *E. hegesia* e *D. saccharalis*, que apresentam testículo fundido na fase adulta (Lai-Fook, 1982; Alves *et al.*, 2006; Mancini & Dolder, 2004a e Pereira, 2011). Em *T. licus* provavelmente também ocorra a fusão do par de testículos observados na fase de larva, uma vez que foi detectado apenas um testículo na fase adulta da broca gigante, além da presença de mais de quatro folículos testiculares neste testículo único, que evidencia tal fusão no adulto.

O testículo único de adultos da broca gigante é revestido externamente por túnica celular (Figs. 4B) que emite septos para o interior do órgão, dividindo-o em folículos testiculares, os quais acomodam os cistos de células da linhagem germinativa nos diferentes estágios do desenvolvimento da espermatogênese. Foram detectados cistos de espermatogônias, cistos de espermatócitos, cistos de espermátides e feixes de espermatozoides (Figs. 5A, 5B, 5C, 5D, 6A, 6B, 6C, 6D, 7A, 7B, 7C, 7D, 8A, 8B, 8C, 8D), localizados nesta sequência da periferia para o centro do órgão. Foi observado que o desenvolvimento sequencial dos cistos na espermatogênese da broca gigante parece acontecer de forma centrípeta, já que os cistos de espermatogônias são observados próximos à periferia do testículo e os feixes de espermatozoides ocupam a região central do órgão, tal como relatado por Phillips (1971), Mancini & Dolder (2004 a), Alves *et al.* (2006) para outras espécies de Lepidoptera onde ocorre a fusão testicular e Paoli *et al.*, (2014a) para *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae).

Em testículos de adultos, os cistos de espermatogônias e espermatócitos aparecem em quantidade menor do que em testículos de larvas e também é mais difícil a detecção de cistos em processo de divisão celular, como já descrito para testículos de larvas, nesta espécie (Fig. 5C). As características morfológicas das espermatogônias e dos espermatócitos detectados nos testículos de adultos são as mesmas apresentadas anteriormente para os testículos de larvas. Os cistos de espermátides são caracterizados por citoplasma acidófilo e núcleo pequeno, arredondado e intensamente basófilo, típico desta fase de diferenciação celular da espermiogênese, onde é comum a condensação

nuclear e citoplasmática para transformação das espermatídes em espermatozoides (Jamienson, 1987). Além disto, os cistos de espermatídes se encontram em processo de alongamento, evidenciado pela observação de células em cortes longitudinais alongadas (Figs. 7A, 7B, 7C). Os feixes de espermatozoides detectados nos testículos de adultos são compostos por células alongadas e filiformes com citoplasma acidófilo. Alguns feixes possuem núcleo basófilo, filiforme e alongado, enquanto outros feixes de espermatozoides são anucleados (Figs. 8A, 8B, 8C, 8D).

4.3 Espermatogênese em *Telchin licus*

Em *T. licus* o processo da espermatogênese pode ser caracterizado morfológicamente e ocorre no interior de cistos compostos por células da linhagem germinativa, envoltos por células císticas. As diferentes etapas de desenvolvimentos destas células císticas até a formação dos espermatozoides pode ser detalhada dentro dos cistos testiculares (Figs. 9A, 9B). Ao longo deste processo, foram observadas células da linhagem espermatogênica em processo de divisão, conforme relatado anteriormente e interligadas por pontes citoplasmáticas (Figs. 9C, 9D), resultantes da citocinese incompleta que ocorre nestas células durante a formação dos gametas.

O desenvolvimento celular sincrônico das células germinativas que ocorre no interior dos cistos, assim como a presença de pontes citoplasmáticas interligando estas células durante a espermatogênese são fenômenos comuns já descritos em vários outros insetos, durante a formação dos espermatozoides (Wolf *et al.*, 1987; França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004a; Friedländer *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Pereira, 2011, Dallai, 2014, Dallai *et al.*, 2014). As pontes citoplasmáticas existentes entre as células germinativas permitem a troca recíproca de material entre as células de um mesmo cisto e são essenciais para a manutenção do ciclo celular e para o desenvolvimento sincrônico das células (Dallai, 2014).

O processo de espermatogênese nos testículos de *T. licus* será detalhado adiante e a análise dos testículos deste inseto nos permitiu identificar dois tipos de espermatozoides diferentes: apirenes e eupirenes e sendo assim, propomos uma sistematização para a espermatogênese, dividindo o processo em seis (6) estágios/etapas para cada tipo de espermatozoide formado, sendo que os primeiros três (3) estágios (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes iniciais) são comuns para os dois tipos de espermatozoides formados.

Espermatogônia

São células arredondadas, caracterizadas por citoplasma volumoso, rico em mitocôndrias e elétron-denso, núcleo grande, arredondado e elétron-lúcido, característico de cromatina descompactada, apresentando poucos grumos de heterocromatina localizados na periferia nuclear e alguns ao centro. Em alguns cistos é possível notar a cromatina mais compactada, que provavelmente indica o início de divisão celular (Figs. 10A, 10B).

Em *M. feytaudi*, a espermatogônia também é descrita como uma célula grande de núcleo volumoso e nucléolo evidente, com citoplasma apresentando grande quantidade de mitocôndrias situadas próximas ao núcleo (Paoli *et al.*, 2014). Características morfológicas semelhantes foram descritas para as espermatogônias de *R. ferrugineus* por Paoli *et al.*, (2014a) que descreveram a espermatogônia com núcleo grande e arredondado ocupando a maior parte do citoplasma celular, com poucas região de cromatina condensada, as quais estão associadas a membrana interna do envoltório nuclear. Em ampla revisão sobre espermatogênese em Lepidoptera, Friedländer *et al.* (2005), afirmam que a produção de espermatogônias dura por toda a vida do inseto, por isso, os cistos contendo espermatogônias podem ser detectados em testículos de larvas até a fase adulta do inseto, como foi por nós observado em *T. licus*.

Espermatócito

São células arredondadas com citoplasma de menor volume do que as espermatogônias, com núcleo bastante volumoso, porém, menos elétron-lúcido que em espermatogônias. O núcleo possui grumos de heterocromatina espalhados aleatoriamente e nucléolo evidente. Nos cistos de espermatócitos é mais frequente a observação das pontes citoplasmáticas interligando os espermatócitos em desenvolvimento. No citoplasma se observam discretos agrupamentos das mitocôndrias no centro do cisto, que posteriormente formarão o complexo mitocondrial (Figs. 10C, 10D). Tais características morfológicas aqui descritas dos espermatócitos de *T. licus* também foram encontradas em espermatócitos de *M. feytaudi* por Paoli *et al.* (2014) que relataram a existência de cistos compostos por células com núcleo arredondado, envoltas por células císticas e interconectadas por pontes citoplasmáticas. Paoli *et al.*, (2014a) descreve as características morfológicas de espermatócitos de *R. ferrugineus*, e também relata a presença de agrupamentos de mitocôndrias no citoplasma, que segundo

estes autores, as organelas vão se reunindo progressivamente em um local no citoplasma destas células.

Espermátide inicial (início da espermiogênese)

São células pequenas com formato ovalado e núcleo ainda volumoso com grumos de heterocromatina espalhados aleatoriamente e nucléolo evidente. O citoplasma exibe retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e uma estrutura circular bastante elétron-densa com detalhes em formas de faixas elétron-lúcidas, denominado complexo mitocondrial ou “nebenkern”, resultante da aproximação e fusão das mitocôndrias agrupadas em determinadas regiões do citoplasma das células. O axonema é visto em formação a partir do corpúsculo basal (Figs. 11A, 11B, 11C, 11D).

Após a formação do complexo mitocondrial ou “nebenkern”, esta estrutura inicia o processo de alongamento e divisão. Neste estágio, o complexo mitocondrial encontra-se bastante elétron-denso com vesículas internas elétron-lúcidas. Após a divisão, o complexo mitocondrial origina duas estruturas chamadas derivados mitocondriais, que apresentam forma arredondada e pequena área também arredondada, mais elétron-densa, no seu interior. Os dois derivados mitocondriais ladeiam o axonema, que neste momento, apresenta um arranjo microtubular do tipo “9+2”, sendo composto por nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais que se estendem a partir do corpúsculo basal (Figs. 12A, 12B, 12C, 12D). Espermátides iniciais de *E. hegesia* (Mancini & Dolder, 2004a) e *D. saccharalis* (Pereira, 2011) também apresentam arranjo microtubular do tipo “9+2”.

Segundo Dallai (2014) durante o processo de espermatogênese as mitocôndrias passam por algumas transformações tais como agregação e fusão, originando o “nebenkern” que posteriormente se transformam em dois derivados mitocondriais. A formação do “nebenkern” também foi descrita por Lai-Fook (1982), Kawamura *et al.* (1998), Garvey *et al.* (2000), Pereira (2011), Paoli *et al.* (2013) e Paoli *et al.* (2014a). Em *Z. impolitus*, nos estágios iniciais de diferenciação da espermátide, o núcleo se caracteriza por ser elíptico, com aparência granular e rodeado por microtúbulos, com algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e muitas vesículas elétron-transparentes. Nesta etapa também ocorre a fusão das mitocôndrias e formação do “nebenkern”, que em estágios mais tardios originará dois derivados mitocondriais (Dallai *et al.*, 2014a).

De acordo com Garvey *et al.* (2000), em *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) tanto em espermátides apirenes, quanto em espermátides eupirenes, as mitocôndrias se agregam em um dos polos da célula, fusionam suas membranas e formam o “nebenkern”, que em espermátides tardias são transformados em derivados mitocondriais. Em *Calpodex ethlius* (Lepidoptera: Hesperiiidae) as mitocôndrias começam a se agregar no estágio de espermátócito secundário em preparação para a formação do “nebenkern” (Lai-Fook, 1982).

Segundo Kawamura *et al.* (1998) em *Bombyx mori* (Lepidoptera) o “nebenkern” começa a se dividir em dois após o alongamento da espermátide. Porém, ao contrário do que foi descrito para *T. licus*, Kawamura *et al.*, (1998) descreve diferenças marcantes que são detectadas entre os derivados mitocondriais apirenes e eupirenes como o tamanho total e estruturas internas, sendo que o derivado eupirene é retorcido livremente ao redor do axonema alongado e contém um ducto interno de membrana dupla. Este ducto é encontrado somente em eupirenes. O ducto interno desaparece do derivado mitocondrial em um estágio tardio, quando o acrossoma esta presente na região apical do núcleo. Essas estruturas não foram observadas em detalhes para *T. licus*.

Com relação ao polimorfismo espermático, *T. licus*, assim como outros insetos da ordem Lepidoptera, possuem tal polimorfismo no qual são produzidos dois tipos de espermatozoides. Estes espermatozoides diferem principalmente por serem nucleados ou anucleados. O espermatozoide nucleado é dito eupirene e o espermatozoide anucleado é dito apirene. A partir do próximo estágio (espermátide jovem) é possível a diferenciação entre células eupirenes e apirenes através de características morfológicas descritas a seguir.

Espermátide jovem apirene

São células alongadas com dois derivados mitocondriais similares, de formato arredondado, com região interna bastante elétron-densa. Durante a espermiogênese esses derivados mitocondriais são vistos também com formato ovalado, acreditamos que estas estruturas sofrem uma mudança em seu formato, assumindo forma conhecida como “sola de sapato”. Os derivados mitocondriais encontram-se dispostos paralelamente um ao outro, ladeando o axonema, que possui arranjo microtubular do tipo “9+9+2”, sendo composto por nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. Neste estágio não foi

possível a identificação do núcleo, o qual acreditamos ter sido eliminado pela célula nesta fase (Figs. 13A, 13B, 13C).

Espermátide tardia apirene

No decorrer da espermiogênese, é possível notar que os derivados mitocondriais assumem uma disposição em forma de “V”, a região elétron-densa interna aumenta seu tamanho e o axonema continua com arranjo microtubular “9+9+2”, com nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais (Fig. 13D). Em *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae), espermátides apirenes apresentam dois derivados mitocondriais com formato e tamanho similares e com regiões internas elétron-densas (Garvey *et al.*, 2000).

Espermátide jovem eupirene

São células alongadas, compostas por dois derivados mitocondriais elétron-densos de formato riniforme, que ocupam alturas diferentes ao longo do comprimento da espermátide. O axonema possui arranjo microtubular do tipo “9+9+2” composto por nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. Neste estágio acontece a formação do apêndice reticular e o início da formação dos apêndices laciniados, que são estruturas específicas de células eupirenes. É possível a identificação destes apêndices a partir desta etapa. O apêndice reticular é visto como uma estrutura única arredondada e pequena, altamente elétron-densa, localizada lateralmente ao axonema e derivado mitocondrial (Figs. 14A, 14B, 14C).

Espermátide tardia eupirene

São células bastante alongadas com características ultraestruturais semelhantes àquelas descritas anteriormente para espermátide jovem eupirene, entretanto, agora é possível a identificação do apêndice laciniado que é uma estrutura composta por faixas elétron-densas e elétron-lúcidas associada à membrana plasmática. Em cortes transversais na altura do axonema, a disposição destes derivados confere uma bela imagem de aspecto estrelado (Fig. 14D). Dallai (2014) relata que geralmente ao final da espermiogênese as espermátides se tornam individualizadas. Provavelmente a individualização também ocorre em espermátides apirenes e eupirenes em *T. licus*, uma vez que não foram observadas pontes citoplasmáticas interconectando estas células ao final da espermiogênese.

Espermatozoide apirene

Foram identificados espermatozoides anucleados exibindo duas diferentes regiões celulares: anterior e posterior. A região anterior é composta por capuz denso de característica bastante elétron-densa (Figs. 15A, 15B, 15C, 15D) e a região posterior corresponde ao flagelo que é composto por dois derivados mitocondriais elétron-densos com elétron-lúcidas internamente, de tamanhos e formatos similares, e com disposição em forma de “V”. O axonema possui arranjo microtubular “9+9+2” contendo nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais (Figs. 16A, 16B, 16C).

A ausência de núcleo no espermatozoide apirene é a característica mais marcante que define este tipo celular, sendo descrita por vários autores: Friedländer & Miesel (1977), Lai-Fook, (1982), Medeiros, (1997), Pereira (2011), entre outros. De acordo com a literatura, a região anterior do espermatozoide apirene um possui capuz denso ao invés de núcleo e por isso não realiza a fecundação (Riemann, 1970; Phillips, 1970a; Lai-Fook, 1982; Jamieson, 1987; Medeiros & Silveira, 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão, 2000, Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006). Além da ausência do núcleo, as estruturas descritas em espermatozoides apirenes de *T. licus*, tais como axonema com arranjo microtubular do tipo “9+9+2” e derivados mitocondriais com disposição em “V” também foram descritas para outros Lepidoptera (Riemann, 1970; Phillips, 1970a; Friedländer & Miesel, 1977; Lai-Fook, 1982; Jamieson, 1987; Medeiros, 1997; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão, 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedländer *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006).

Espermatozoide eupirene

Foram identificados espermatozoides nucleados exibindo duas diferentes regiões celulares: anterior e posterior. A região anterior é composta por acrossomo bastante elétron-denso e núcleo filiforme, alongado e elétron-denso. Ainda na região anterior encontra-se o apêndice reticular bastante elétron-denso e os apêndices laciniados. Ambos se estendem da parte anterior do espermatozoide para a parte posterior do mesmo (Fig. 16D). A região posterior é composta por axonema “9+9+2”, dois derivados mitocondriais de formatos similares, porém, de tamanhos distintos, que

terminam em alturas diferentes ao longo do espermatozoide. Ainda nesta região encontram-se os apêndices reticular e laciniados (Figs. 17A, 17B, 17C).

Tanto em espermatozoides apirenes quanto em espermatozoides eupirenes o flagelo é composto por dois derivados mitocondriais e axonema. O axonema possui em ambos os tipos de espermatozoides uma composição do tipo “9+9+2”, que se tornam desorganizados na extremidade final da região posterior (Figs. 18A, 18B, 18C, 18D).

As características ultraestruturais aqui descritas para espermatozoides eupirenes de *T. licus*, tais como núcleo filiforme, acrossomo, axonema com arranjo microtubular do tipo “9+9+2”, dois derivados mitocondriais, apêndice reticular e apêndices laciniados também são observadas em outros Lepidoptera (Phillips, 1970; Phillips, 1971; Leviatan & Friedländer, 1979; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedländer *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005; Dallai, 2014).

A primeira descrição do dimorfismo espermático em Lepidoptera foi feita por Meves em 1903. Este processo, conhecido como espermatogênese dicotômica, é responsável pela produção de espermatozoides apirenes (anucleados) e espermatozoides eupirenes (nucleados), assim como acontece em *T. licus* e em outros insetos desta mesma ordem, como *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982), *M. themisto* (Corsatto-Alvarenga *et al.*, 1987), *L. dispar* (Garvey *et al.*, 2000), *E. hegesia* (Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini *et al.*, 2005), *L. coffeella* (Alves *et al.*, 2006) e *D. saccharalis* (Pereira, 2011).

Desde que foi feita a primeira descrição do dimorfismo espermático na ordem Lepidoptera (Meves, 1903) todos os insetos estudados desta ordem tem apresentado os dois tipos de gametas, com exceção do gênero *Micropteryx* (Micropterigidae), um grupo basal onde só se encontraram espermatozóides eupirenes (Sonnenschein & Hauser, 1990; Hamon & Chauvin, 1992).

Na revisão feita por Dallai (2014) sobre o grupo Hexapoda, o autor discorre a respeito da dicotomia espermática na ordem Lepidoptera, nomeando o espermatozoide eupirene como espermatozoide funcional e o espermatozoide apirene como paraespermatozoide não funcional. De acordo com este autor, possivelmente o espermatozoide apirene tem como função o fornecimento de nutrientes para o espermatozoide eupirene, além de ser responsável por ajudar o espermatozoide eupirene a alcançar o trato genital da fêmea e possivelmente desempenha importante papel na competição espermática.

O processo da espermiogênese que culmina com a produção dos espermatozoides apirenes e eupirenes é descrito baseado em características morfológicas ultraestruturais e em *T. licus* a visualização destas características ultraestruturais ao longo do desenvolvimento das células da linhagem germinativa, também nos permitiu caracterizar o processo na broca gigante.

Com relação a estas características presentes nas células durante a espermiogênese, Dallai (2014) menciona que em células eupirenes o núcleo adquire formato alongado durante o processo devido a presença de uma camada de microtúbulos livres ao redor do núcleo que o forçam a reduzir de diâmetro e frequentemente a adquirir o formato helicoidal. Em *T. licus* o núcleo do espermatozoide eupirene também apresenta formato bastante alongado e acreditamos que também tenha passado pelo processo de alongamento tornando-se filiforme, porém não foram observados os microtúbulos livres nem o formato nuclear helicoidal, mencionados por Dallai (2014).

O acrossomo origina-se do Complexo de Golgi no início da espermiogênese, inicialmente essa estrutura é denominada vesícula pro-acrossômica, que ao alcançar seu destino final, no topo do núcleo, pode adquirir diferentes formatos (Dallai, 2014; Dallai *et al.*, 2014). Paoli *et al.*, (2014a) afirma que em *R ferrugineus* após o término da meiose, a espermátide apresenta uma forte atividade no Complexo de Golgi que produz vesículas para a formação do acrossomo. Em *T. licus* a formação do acrossomo é semelhante à descrita por Mancini & Dolder, (2004) em *E. hegesia* e Pereira (2011) em *D. saccharalis*.

O glicocálix associado à membrana plasmática do espermatozoide em insetos apresenta diferença de complexidade, estrutura e espessura. Em espermatozoides de insetos da ordem Lepidoptera, o glicocálix corresponde ao apêndice reticular e aos apêndices laciniados, estruturas associadas à membrana plasmática que estão presentes somente em espermatozoides eupirenes de insetos desta ordem (Dallai, 2014).

Na região posterior dos espermatozoides, o axonema termina de forma desorganizada, primeiramente com a perda dos microtúbulos acessórios, seguidos pelos dois microtúbulos centrais e depois pelas duplas periféricas (Medeiros & Silveira, 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão, 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006, Paoli *et al.*, 2013; Paoli *et al.*, 2014a). Também foi observada essa desorganização em cortes transversais na altura final do axonema em espermatozoides de *T. licus*.

De modo geral as características morfológicas dos espermatozoides apirenes e eupirenes observadas em *T. licus* são semelhantes às descritas para a maioria dos insetos da ordem Lepidoptera, entretanto para as outras ordens de insetos existe uma vasta diferenciação na formação dos gametas, nos tipos de gametas formados e principalmente, na ultraestrutura destes gametas.

Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae), *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Trichogramma atopovirilia* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Solenopsis invicta* (Hymenoptera, Formicidae) e *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) apresentam somente um tipo de espermatozoide o qual é nucleado (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto *et al.*, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini *et al.*, 2006). Em *L. dieloceri* e *Pachysomoides* sp. os espermatozoides são finos e compostos por região da cabeça (núcleo longo, acrossomo e membrana extracelular) e região flagelar (adjunto centriolar, axonema e dois corpos acessórios) (Moreira *et al.*, 2010). Espermatozoides de *Centris* sp. são células alongadas e formadas por duas regiões distintas: cabeça e flagelo. A cabeça é composta por acrossomo em bicamada e núcleo linear. O flagelo é composto por adjunto centriolar, axonema “9+9+2”, dois derivados mitocondriais assimétricos e dois corpos acessórios (Gomes *et al.*, 2012). Espermatozoides de *G. pennsylvanicum* são células com núcleo poligonal e acrossomo com duas camadas e de formato cônico, possui um único derivado mitocondrial de formato cilíndrico e ligeiramente elíptico e axonema “9+9+2” (Paoli *et al.*, 2013). *Z. huxleyi*, *Z. magnicaudelli* e *Zorotypus weidneri* (Zoraptera) também produzem somente um tipo de espermatozoide, o qual é alongado, com acrossomo apical, núcleo cilíndrico, possui dois derivados mitocondriais e axonema com padrão microtubular “9+9+2” (Dallai *et al.*, 2014). Zribi *et al.*, (2014) divide o espermatozoide de *Perinereis macropus* (polychaeta, Nereidae) em três partes: cabeça, espaço intermediário e flagelo. A cabeça do espermatozoide possui citoplasma escasso com núcleo em formato de U e acrossomo com formato de cone. O espaço intermediário é formado por nove a onze mitocôndrias esféricas e centríolo, e o flagelo é formado por axonema com arranjo microtubular “9+2”.

Como se pôde notar, as características morfológicas/ ultraestruturais dos espermatozoides nos insetos são extremamente variadas, dependendo da espécie estudada e apesar deste atual estudo com a broca gigante não ter tido um foco específico em espermiotaxonomia, acreditamos e esperamos que as características ultraestruturais

dos espermatozoides de *T. licus* possam ser uma valiosa contribuição para os estudos taxonômicos e filogenéticos que utilizam os insetos como modelos biológicos.

5. Figuras

Figura 1
Morfologia do testículo de larva de *Telchin licus* em M.E.V. (Microscopia Eletrônica de Varredura)

- A.** Testículo (Te) de larva com formato riniforme.
- B.** Região interna do testículo de larva mostrando células da linhagem germinativa em estágios iniciais do processo de espermatogênese (CI) e cistos de células germinativas em início de formação (C).
- C.** Região interna do testículo de larva mostrando células da linhagem germinativa em estágios iniciais do processo de espermatogênese e cistos de células germinativas em início de formação.

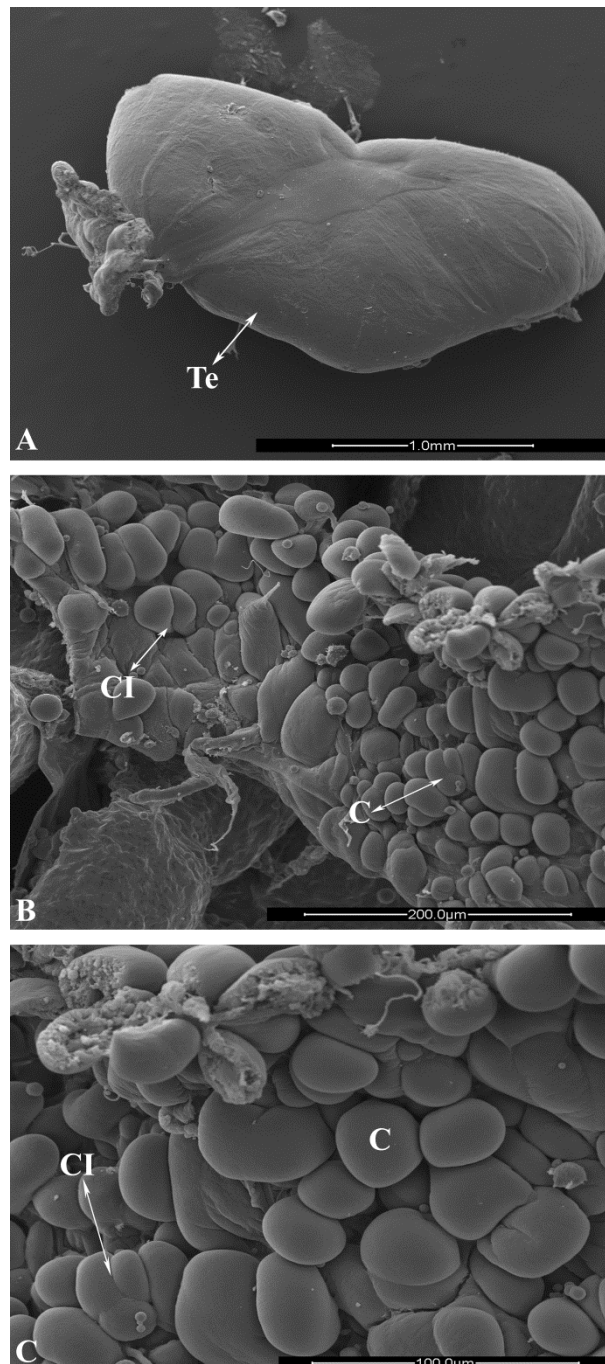


Figura 2

Testículo de larva de *Telchin licus* em Reação de Feulgen e Hematoxilina - Eosina

A. Testículo de formato riniforme (Te) dividido em quatro folículos (Fo1, Fo2, Fo3, Fo4) pela túnica celular (TC). Cada folículo possui extremidade distal (ED) e extremidade proximal (EP); região do germário (Ge), cistos de espermatogônias (Go) e cistos de espermatócitos (Ci).

B. Túnica celular dividindo o testículo em folículos, mostrando extremidade distal e proximal, germário, cistos de espermatogônias e cistos de espermatócitos.

C. Parte do testículo mostrando túnica celular dividindo o testículo em folículos contendo cistos de espermatócitos.

D. Extremidade distal do folículo testicular envolto por túnica celular, mostrando a região do germário com cistos de espermatogônias envolvidos por célula cística.

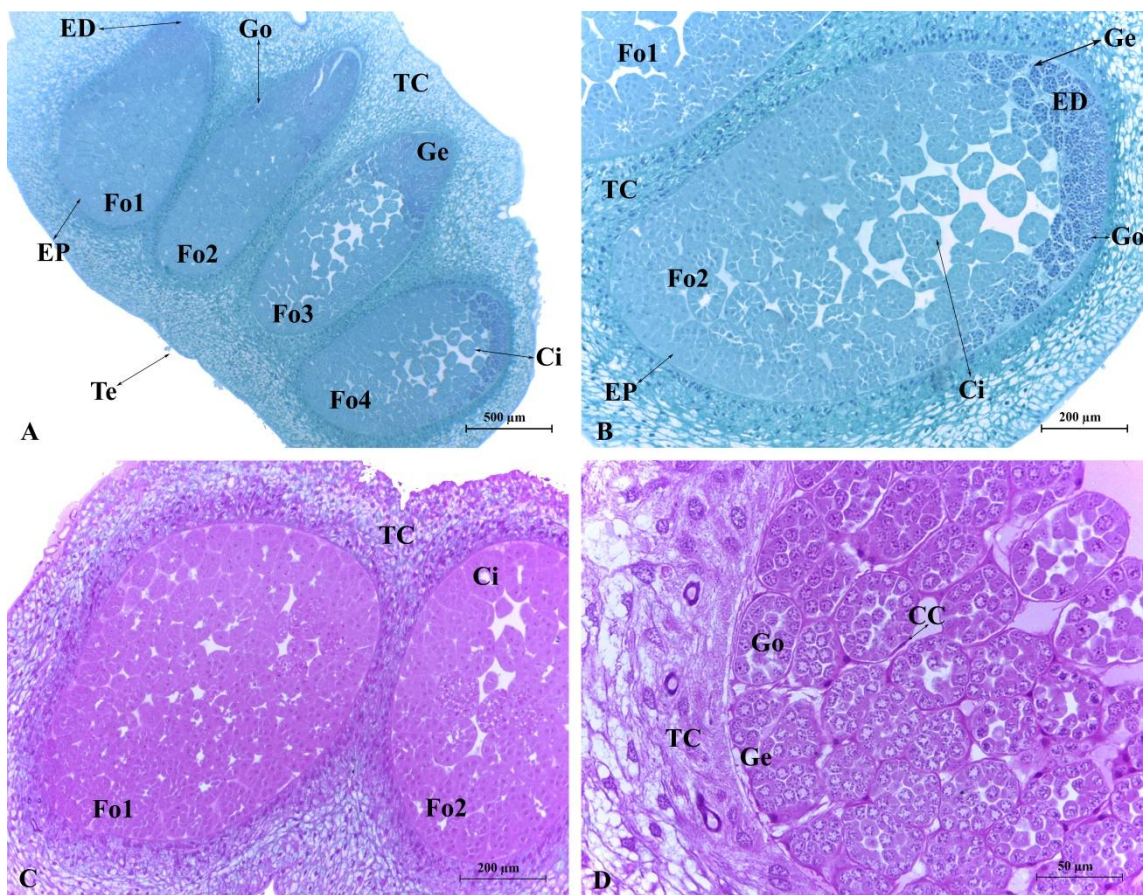


Figura 3

Testículo de larva de *Telchin licus* em Reação de Feulgen e Hematoxilina - Eosina

A. Extremidade distal do folículo testicular envolto por túnica celular (TC). Cistos de espermatogônias em divisão celular (Go) e envolvidos por célula cística (CC).

B. Extremidade distal do folículo testicular coberto por túnica celular, mostrando germário (Ge) com cistos de espermatogônias envolvidos por célula cística e com alguns deles apresentando características de divisão celular (*).

C. Extremidade proximal folicular mostrando túnica celular, cistos de espermatócitos (Ci) envolvidos por célula cística.

D. Extremidade proximal folicular mostrando túnica celular, cistos de espermatócitos envolvidos por célula cística.

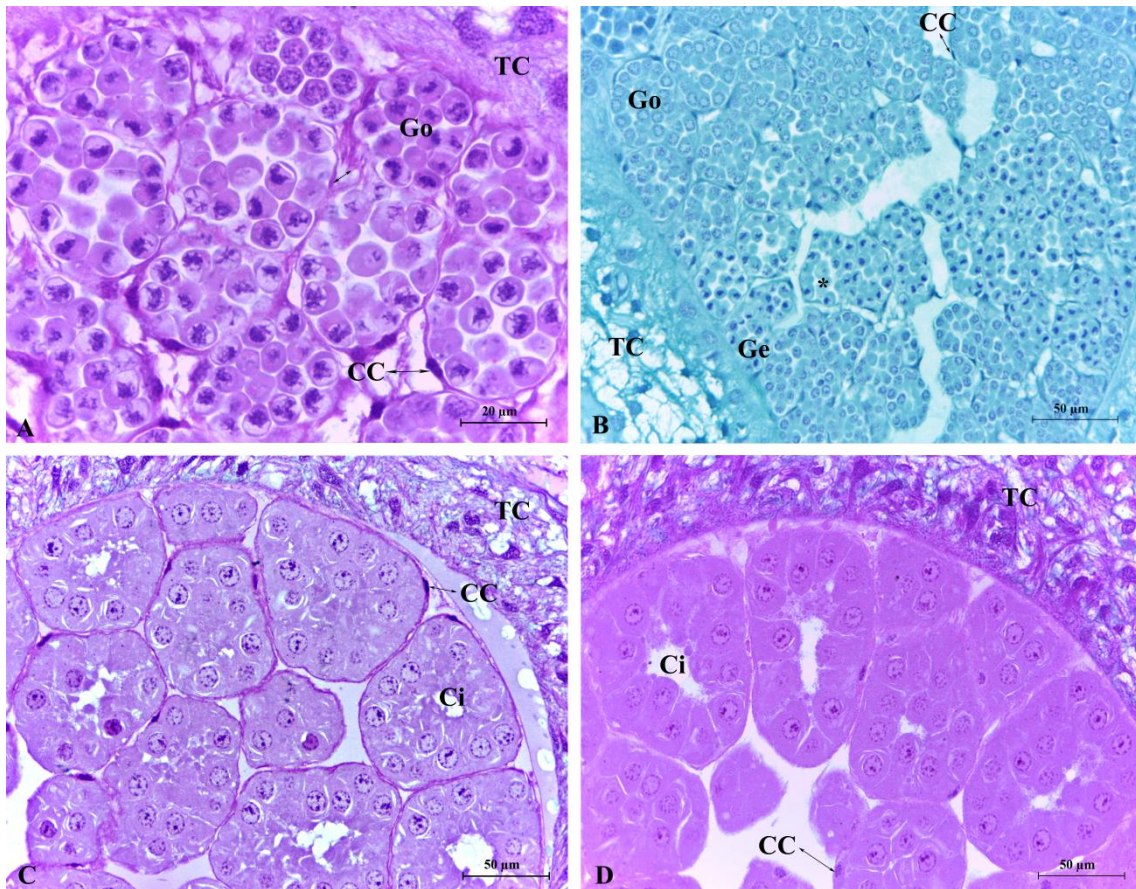


Figura 4
Testículo de larva e adulto de *Telchin licus* em M.E.V.

- A. Testículo fundido de adulto (Te).
- B. Corte transversal de testículo de adulto envolto por túnica celular (TC).
- C. Vaso deferente (VD) de testículo de adulto.
- D. Vaso deferente de testículo de adulto.

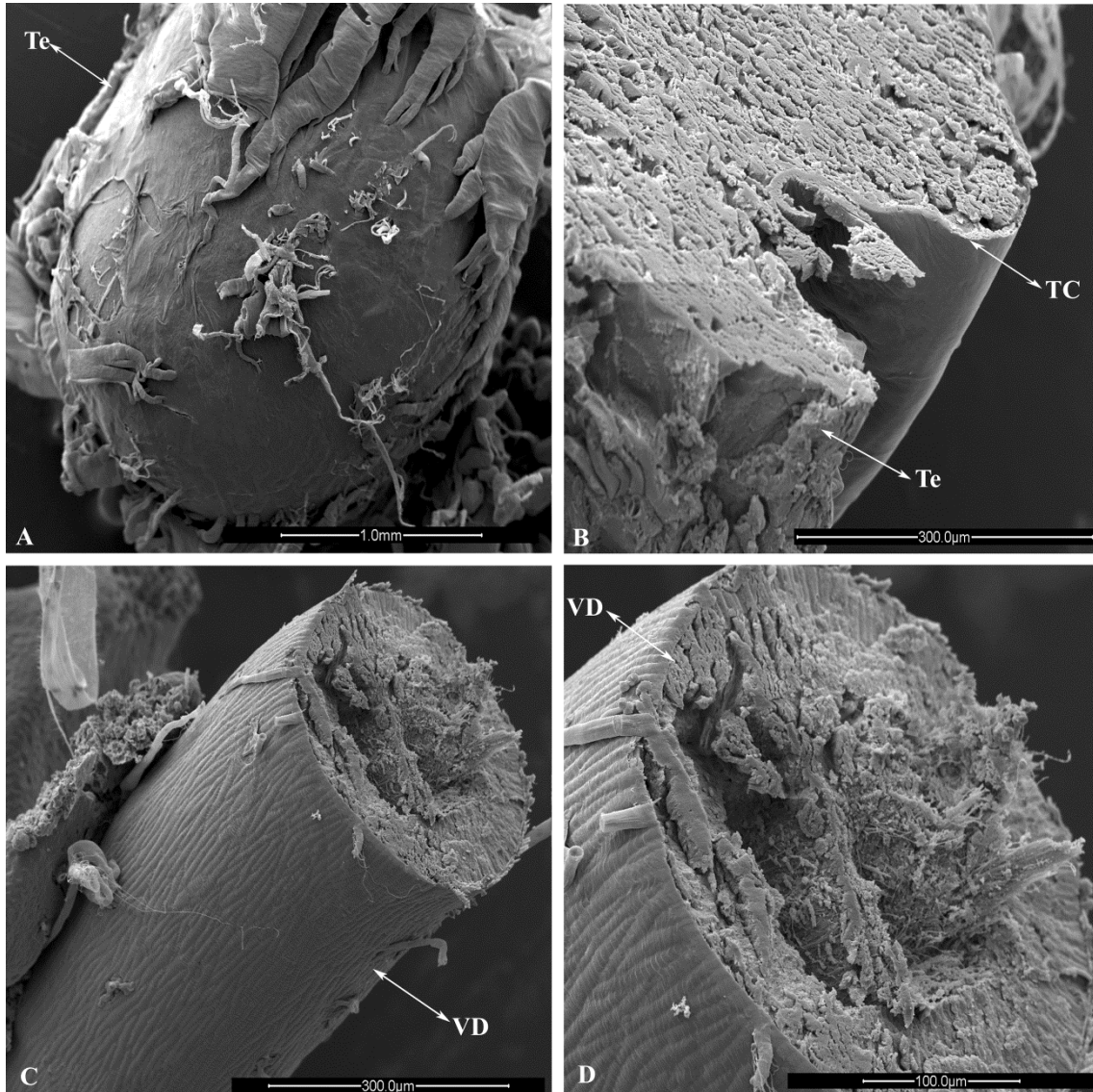


Figura 5

Testículo de adulto de *Telchin licus* em Reação de Feulgen e Hematoxilina - Eosina

- A. Testículo fundido (Te) envolto por túnica celular (TC) e dividido em folículos (Fo).
- B. Testículo envolto por túnica celular e dividido em folículos contendo feixes de espermatozoides (Es) em vários planos de corte.
- C. Região do testículo mostrando túnica celular, cistos de espermatogônias (Go) e cistos de espermatócitos (Ci).
- D. Folículos divididos por túnica celular contendo cistos de espermátides (Ti) e feixes de espermatozoides em diferentes planos de corte.

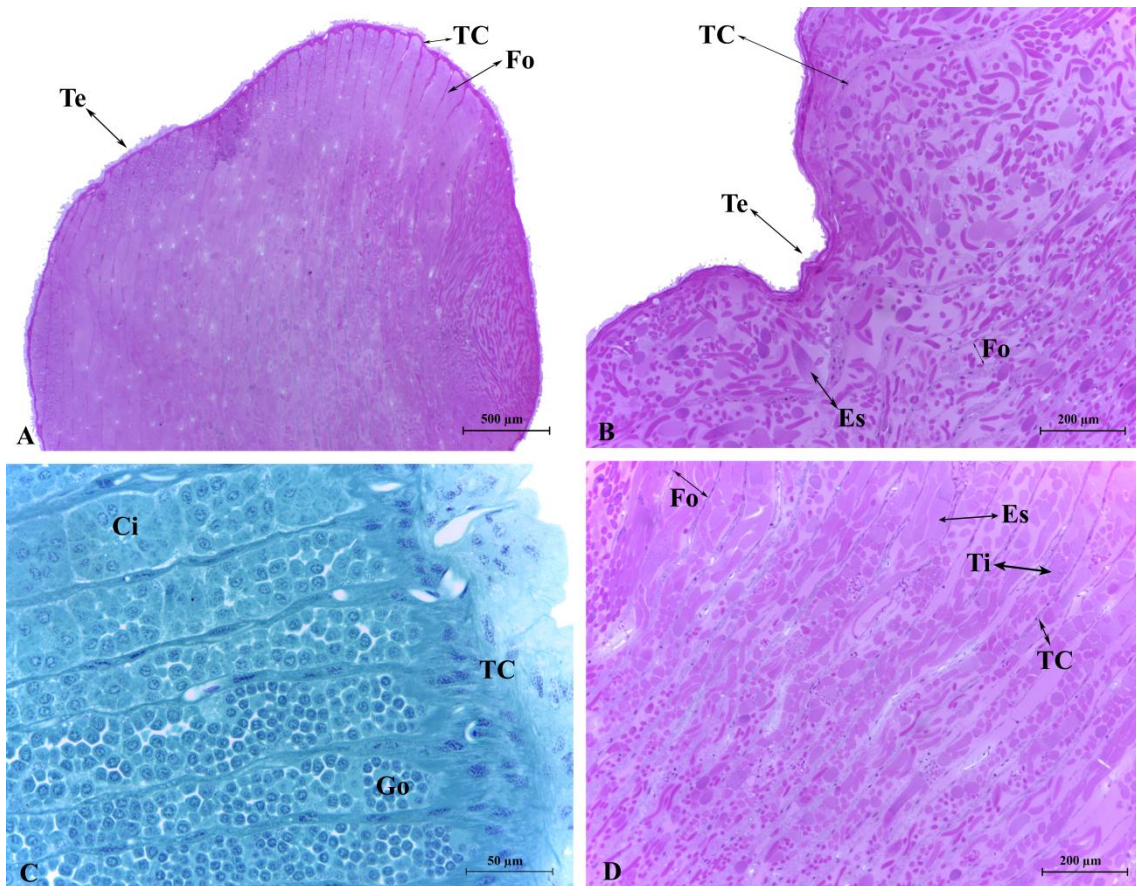


Figura 6
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.V.

- A.** Região interna do testículo de adulto mostrando túnica celular (TC) e feixes de espermatozoides (Es).
- B.** Feixes de espermatozoides no interior do testículo de adulto.
- C.** Feixes de espermatozoides no interior do testículo de adulto.
- D.** Região do folículo testicular dividido por túnica celular e mostrando feixe de espermatozoides (Es).

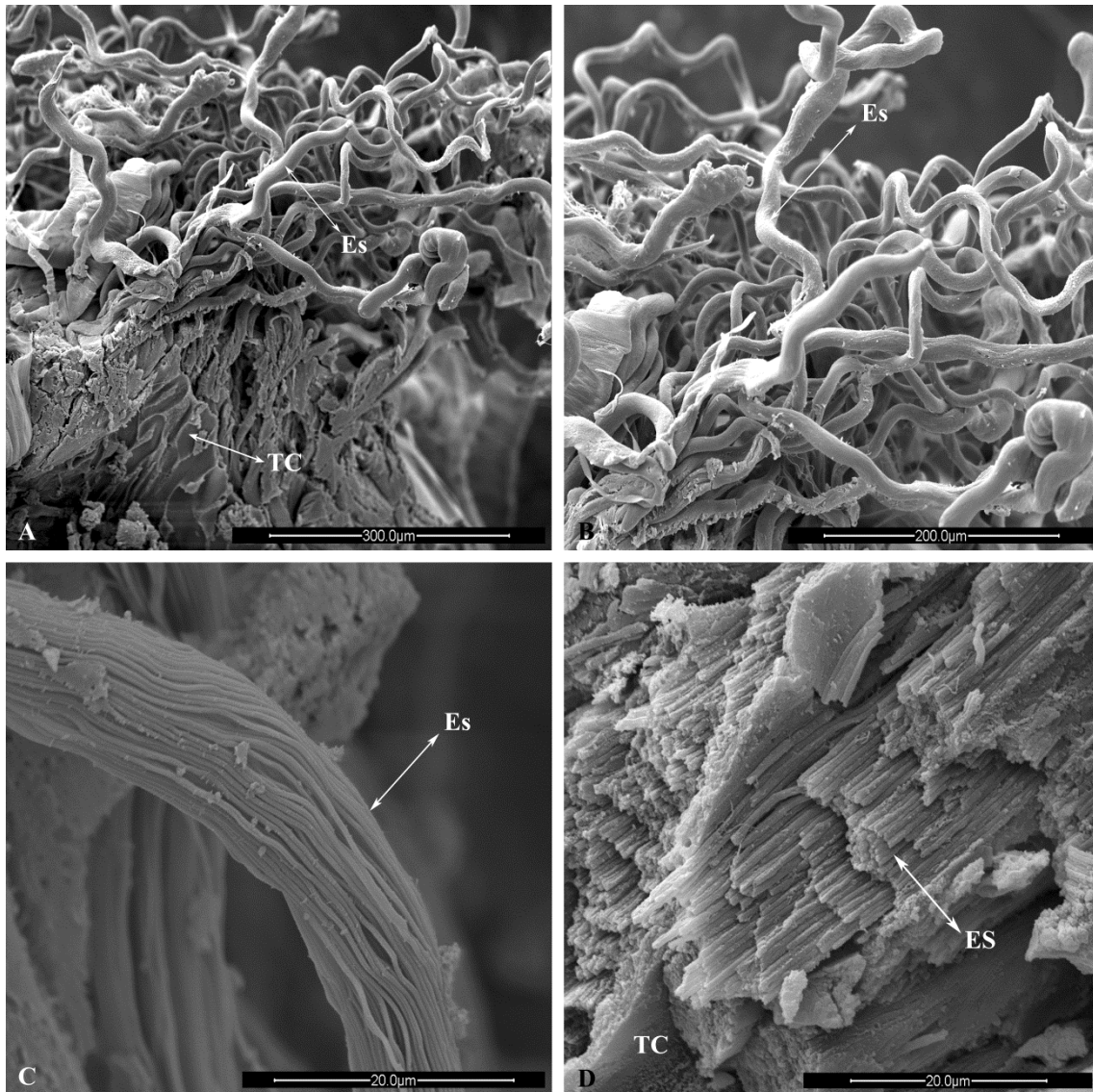


Figura 7

Testículo de adulto de *Telchin licus* em Reação de Feulgen e Hematoxilina - Eosina

- A.** Região mostrando folículos (Fo) divididos por túnica celular (TC) contendo cistos de espermatócitos (Ci), cistos de espermatídes (Ti) e envoltos por célula cística (CC).
- B.** Folículos divididos por túnica celular contendo cistos de espermatócitos, cistos de espermatídes envoltos por célula cística e feixes de espermatozoides (Es).
- C.** Folículos divididos por túnica celular contendo cistos de espermatídes.
- D.** Folículos divididos por túnica celular com cistos de espermatídes.

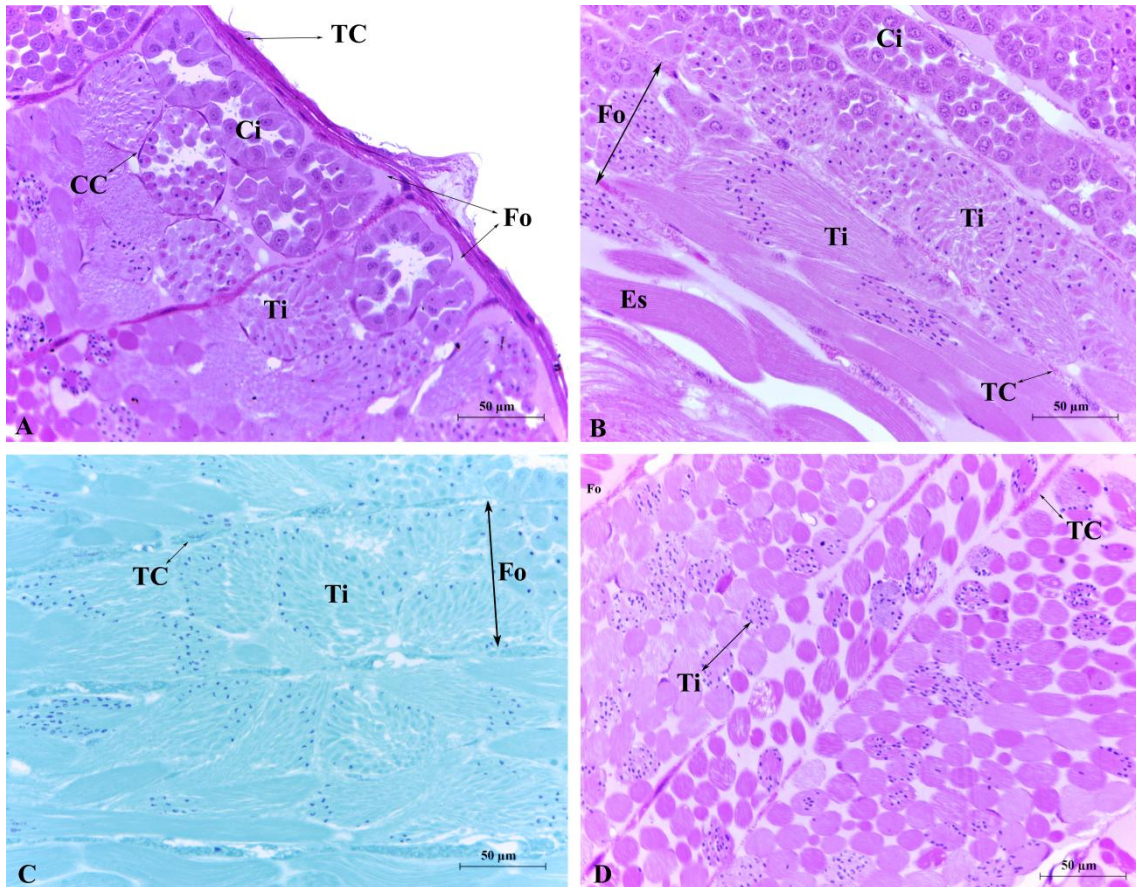


Figura 8

Testículo de adulto de *Telchin licus* em Reação de Feulgen e Hematoxilina - Eosina

- A. Feixes de espermatozoides (Es) em diversos planos de corte com alguns feixes apresentando núcleo (N).
- B. Região do testículo mostrando feixes de espermatozoides com alguns feixes apresentando núcleo.
- C. Folículos (Fo) divididos por túnica celular (TC) contendo feixes de espermatozoides em diversos planos de corte com alguns apresentando núcleo.
- D. Feixes de espermatozoides em cortes transversal e longitudinal mostrando núcleo.

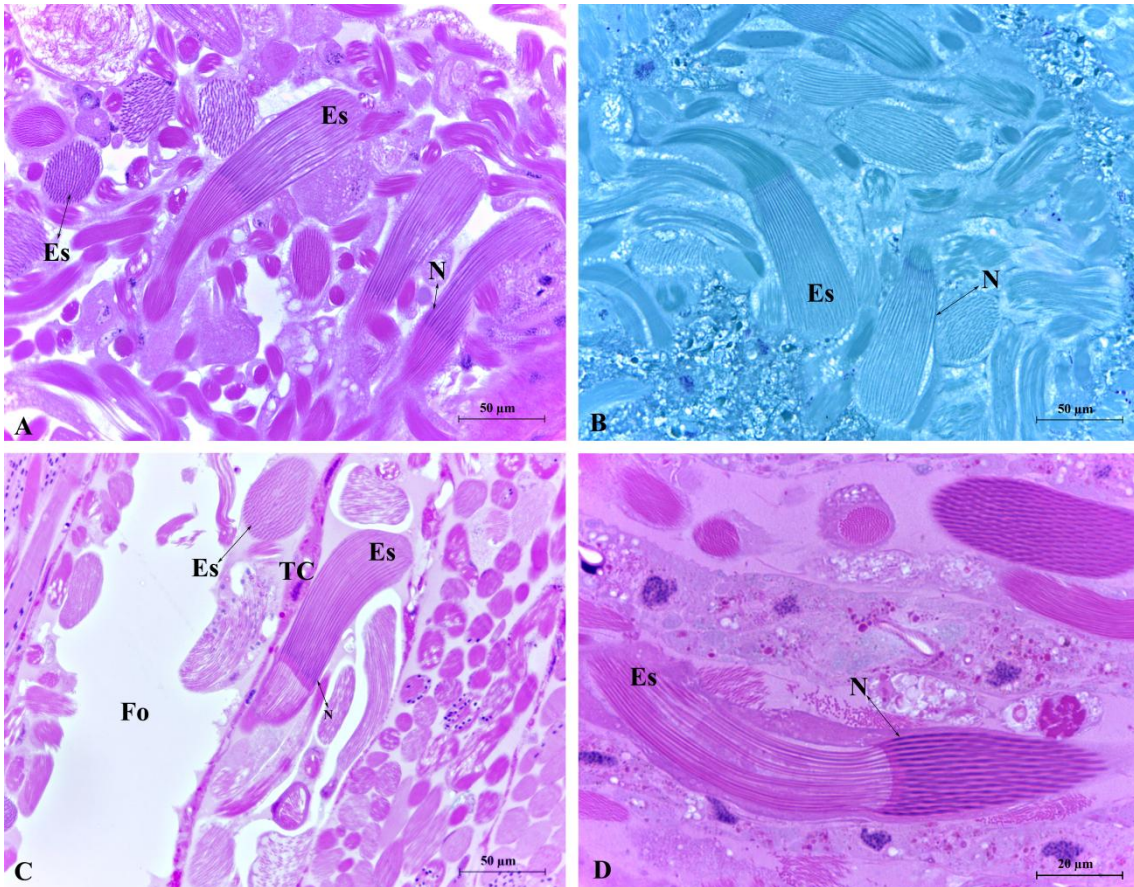


Figura 9

Testículo de larva e adulto de *Telchin licus* em M.E.T. (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

- A. Cistos (C) de célula da linhagem germinativa envoltos por célula cística (CC) contendo mitocôndrias (Mi).
- B. Cistos de célula da linhagem germinativa envoltos por célula cística contendo mitocôndrias.
- C. Espermatócitos com pontes citoplasmáticas (PC), núcleo (N), complexo de Golgi (CG) e mitocôndria.
- D. Espermatócitos com pontes citoplasmáticas, núcleo e mitocôndria.

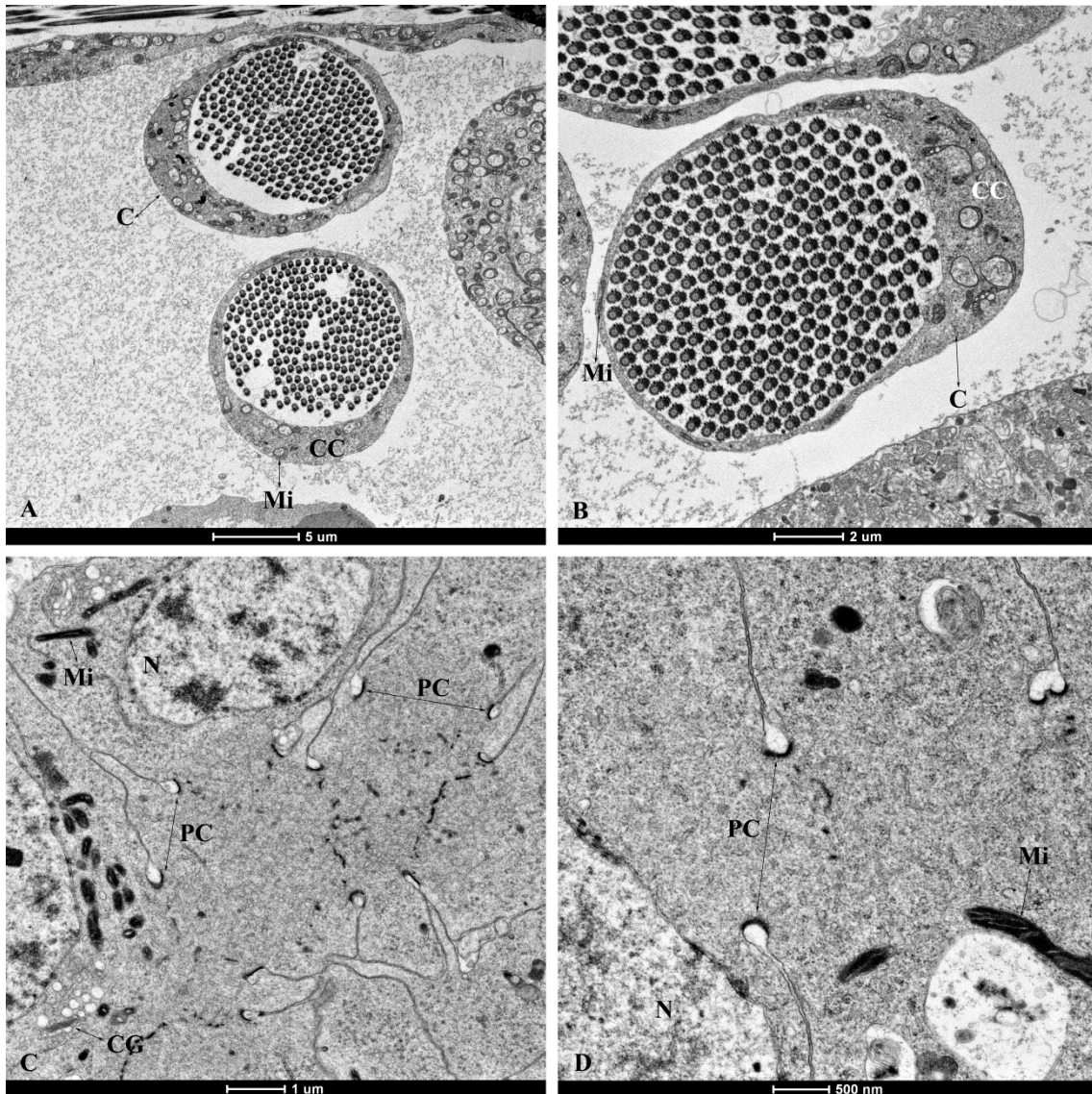


Figura 10
Testículo de larva de *Telchin licus* em M.E.T.

- A. Cisto de espermatogônia (Go), núcleo (N).
- B. Cisto de espermatogônia em divisão celular (Go), núcleo (N).
- C. Cisto de espermatócito (Ci), núcleo e nucléolo evidente (Nu).
- D. Cisto de espermatócito com núcleo, nucléolo evidente, mitocôndria (Mi), ponte citoplasmática (PC).

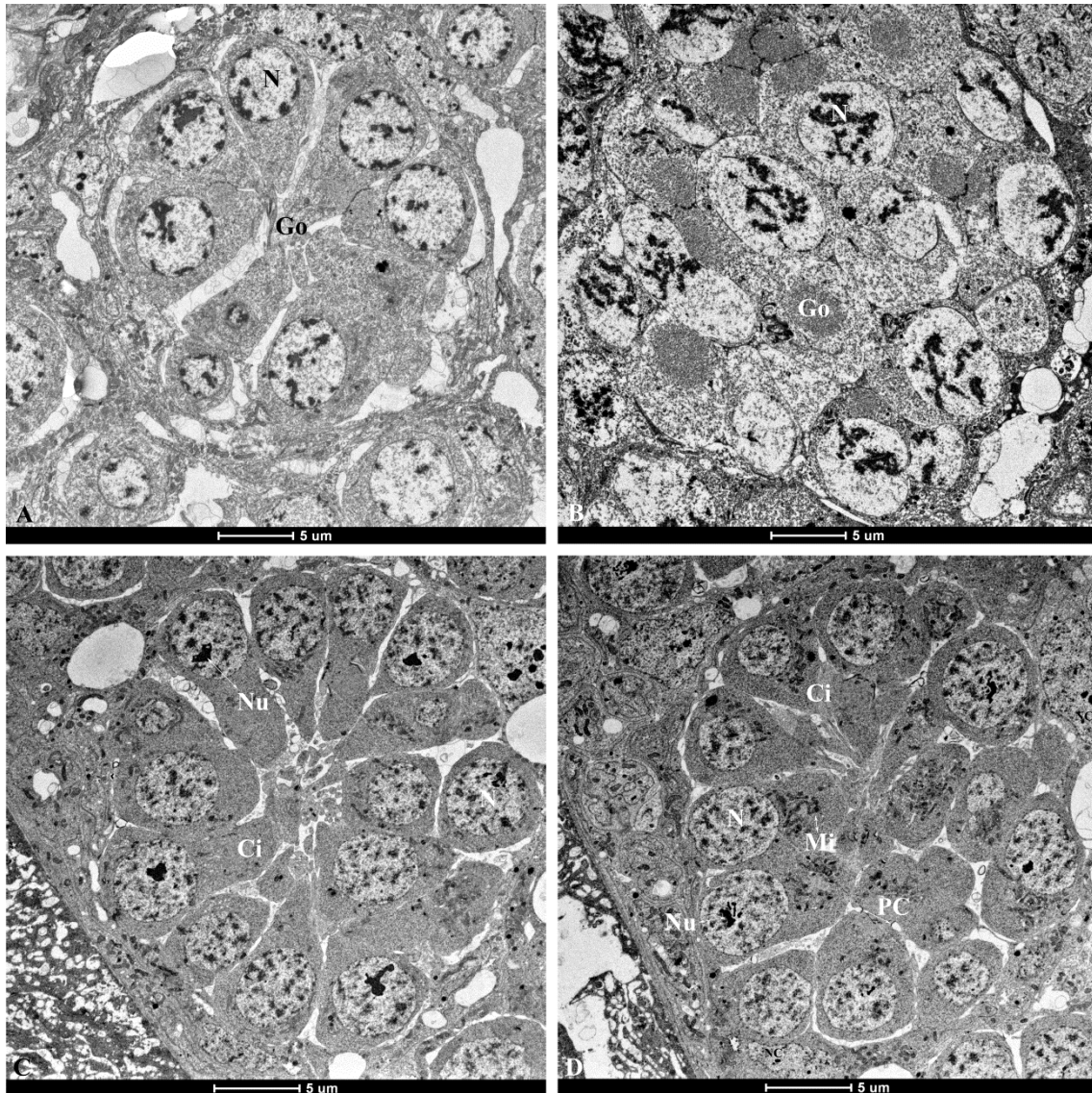


Figura 11
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A. Espermátide inicial evidenciando núcleo (N) e nebenkern (Nk).
- B. Espermátide inicial evidenciando núcleo, nebenkern e retículo endoplasmático rugoso (RR).
- C. Região de espermátide inicial mostrando parte do núcleo com nucléolo evidente (Nu), parte do nebenkern, complexo de Golgi (CG) e retículo endoplasmático rugoso.
- D. Região de espermátide inicial evidenciando ponte citoplasmática (PC), corpúsculo basal (CB) e axonema (Ax).

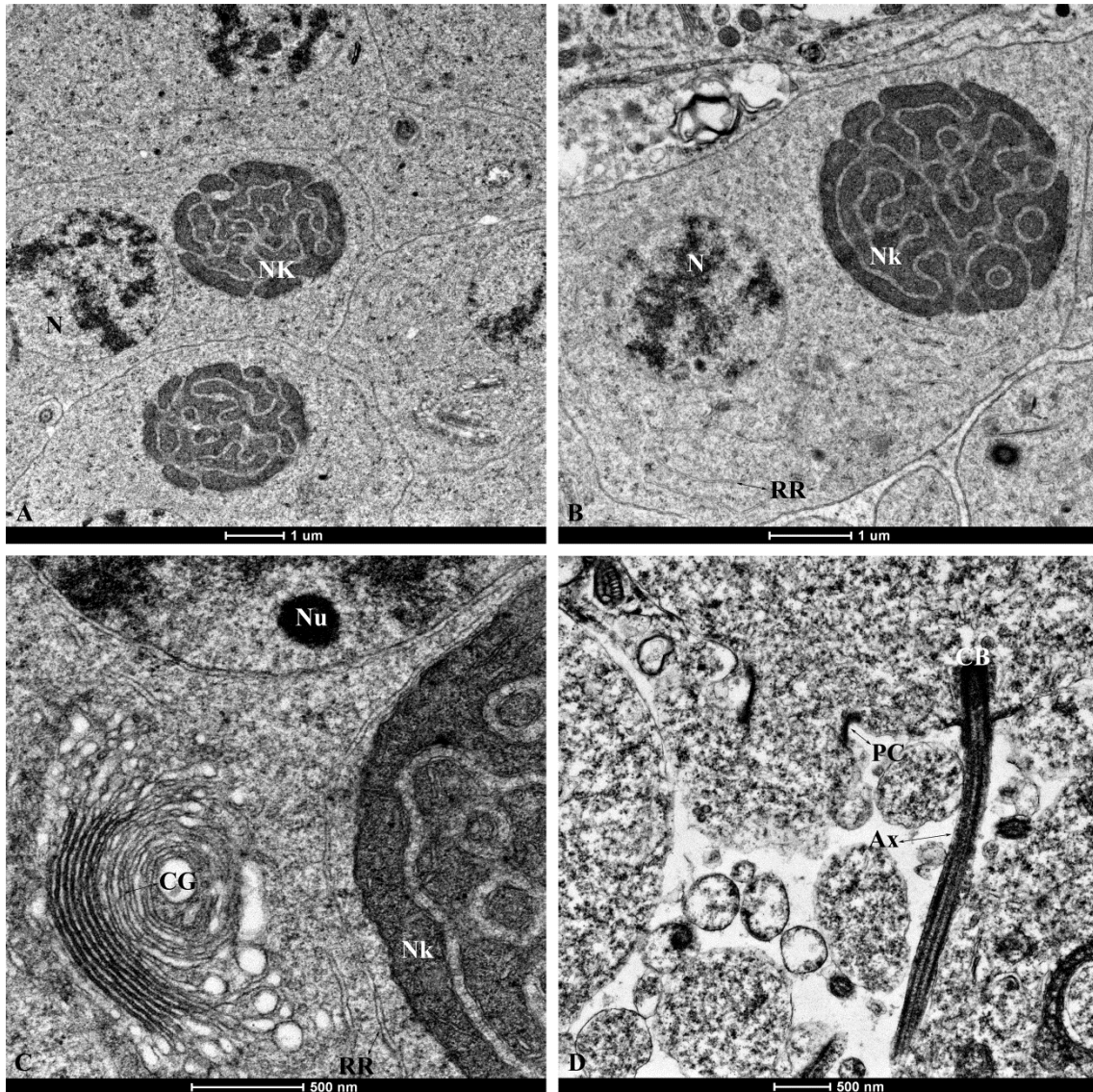


Figura 12
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A.** Região de espermatíde inicial mostrando núcleo (N), nebenkern/ complexo mitocondrial em processo de divisão (Nk).
- B.** Nebenkern em processo de divisão finalizado, agora denominado derivado mitocondrial (DM), axonema (Ax).
- C.** Corte longitudinal e transversal de derivado mitocondrial.
- D.** Corte transversal de derivado mitocondrial e axonema com arranjo microtubular “9+2”.

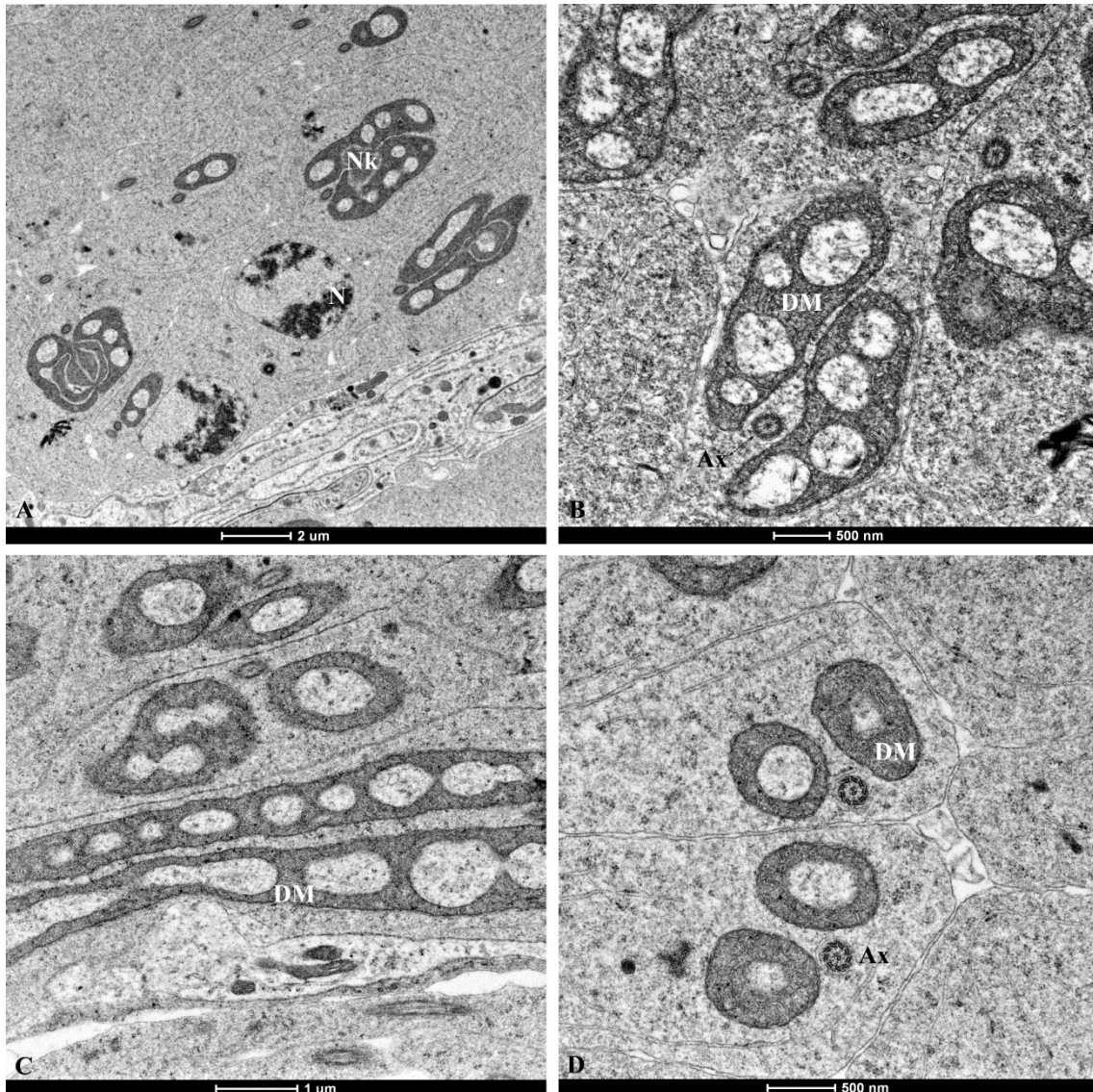


Figura 13
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A.** Espermátide apirene jovem com axonema (Ax), derivado mitocondrial (DM), membrana plasmática (MP).
- B.** Espermátide apirene jovem com axonema e derivados mitocondriais dispostos paralelamente.
- C.** Espermátide apirene jovem mostrando axonema com arranjo microtubular do tipo “9+9+2”, derivados mitocondriais e membrana plasmática.
- D.** Espermátide apirene tardia com axonema, derivado mitocondrial, membrana plasmática.

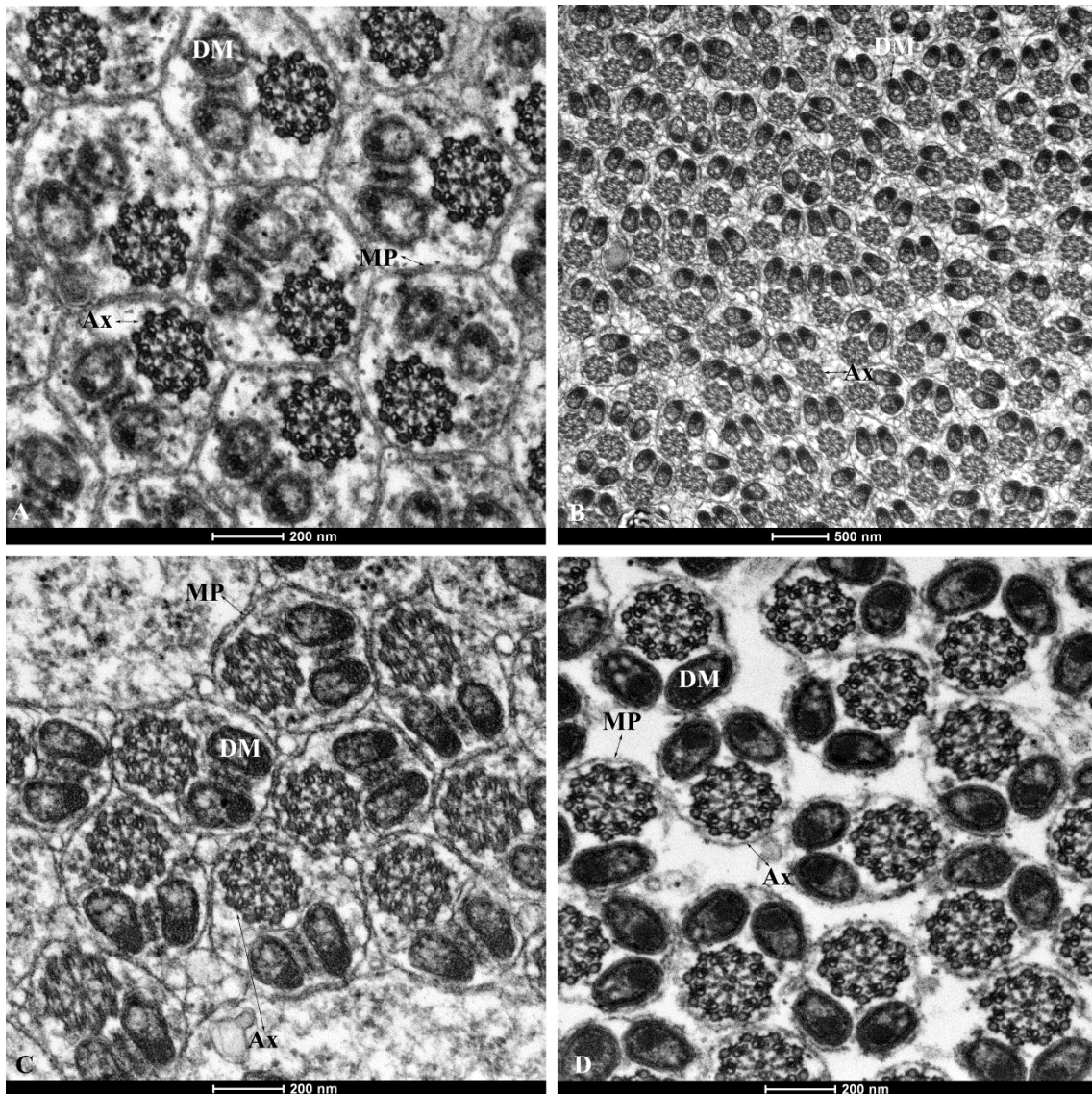


Figura 14
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A.** Espermátide eupirene com derivados mitocondriais (DM), axonema (Ax), apêndice reticular (AR) e apêndice laciniado em início de formação (AL).
- B.** Espermátide eupirene com derivados mitocondriais, axonema, apêndice reticular e apêndice laciniado em início de formação.
- C.** Fotomicrografia em maior aumento de espermátide eupirene mostrando axonema, derivados mitocondriais, apêndice reticular e apêndice laciniado em início de formação.
- D.** Axonema, derivados mitocondriais, apêndice reticular e apêndices laciniados em espermátide eupirene.

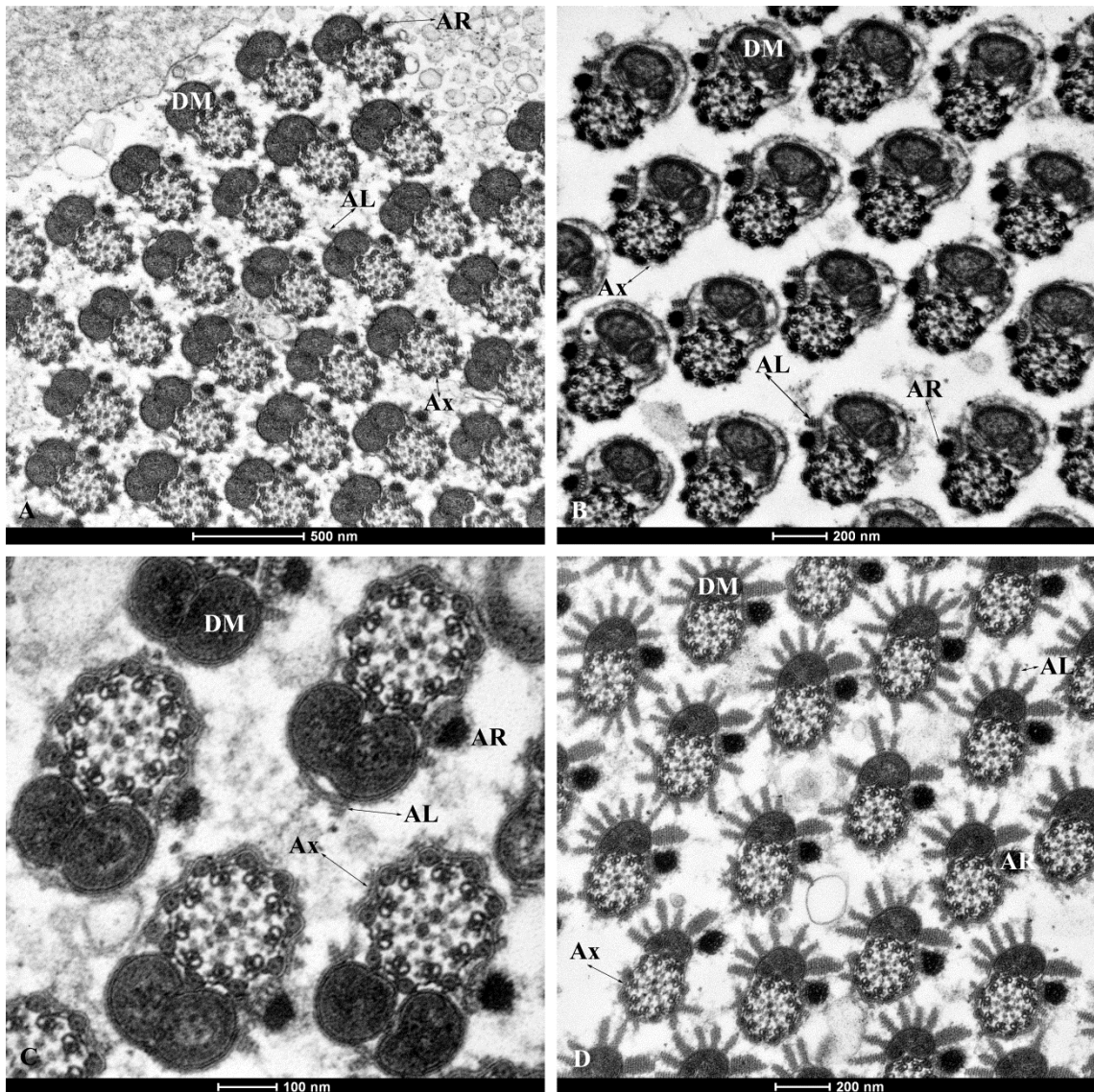


Figura 15
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A. Feixe de espermatozoide apirene (Ap) em corte transversal da extremidade anterior mostrando capuz denso (CD) e axonema (Ax).
- B. Corte transversal de feixe de espermatozoide apirene na extremidade anterior mostrando capuz denso e axonema.
- C. Espermatozoide apirene em corte longitudinal mostrando capuz denso e axonema.
- D. Corte longitudinal mostrando capuz denso em espermatozoide apirene.

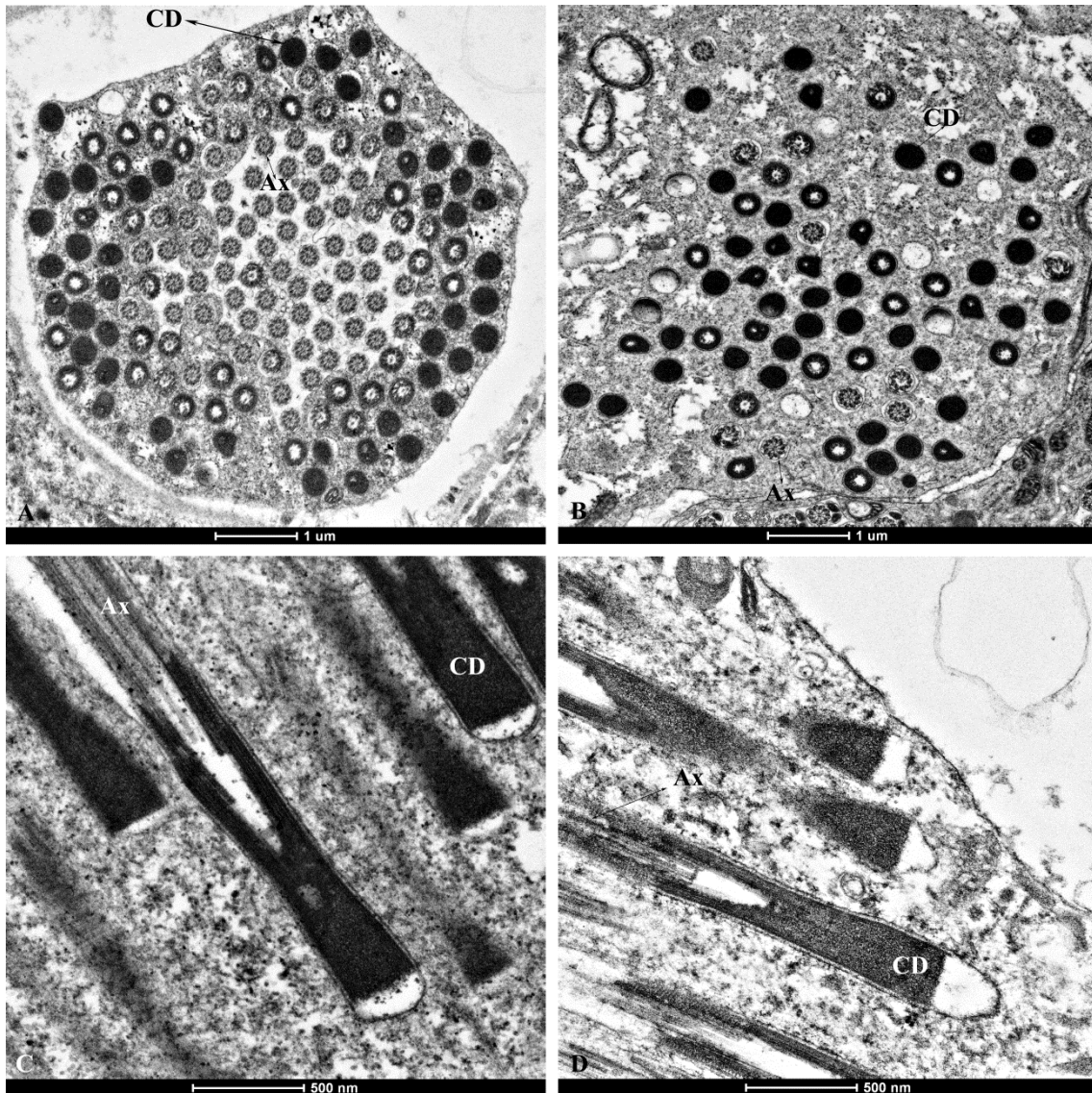


Figura 16
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

A. Corte transversal de feixe de espermatozoide apirene na região posterior do espermatozoide mostrando flagelo formado por derivados mitocondriais (DM) e axonema (Ax).

B. Corte transversal de feixe de espermatozoide apirene mostrando membrana plasmática (MP), flagelo formado por derivados mitocondriais e axonema “9+9+2”.

C. Corte transversal de espermatozoide apirene mostrando flagelo formado por derivados mitocondriais, axonema e envolto por membrana plasmática.

D. Corte transversal da região anterior do espermatozoide eupirene evidenciando membrana plasmática, acrossomo (Ac), núcleo (N), apêndice reticular (AR) e apêndice laciniado (AL).

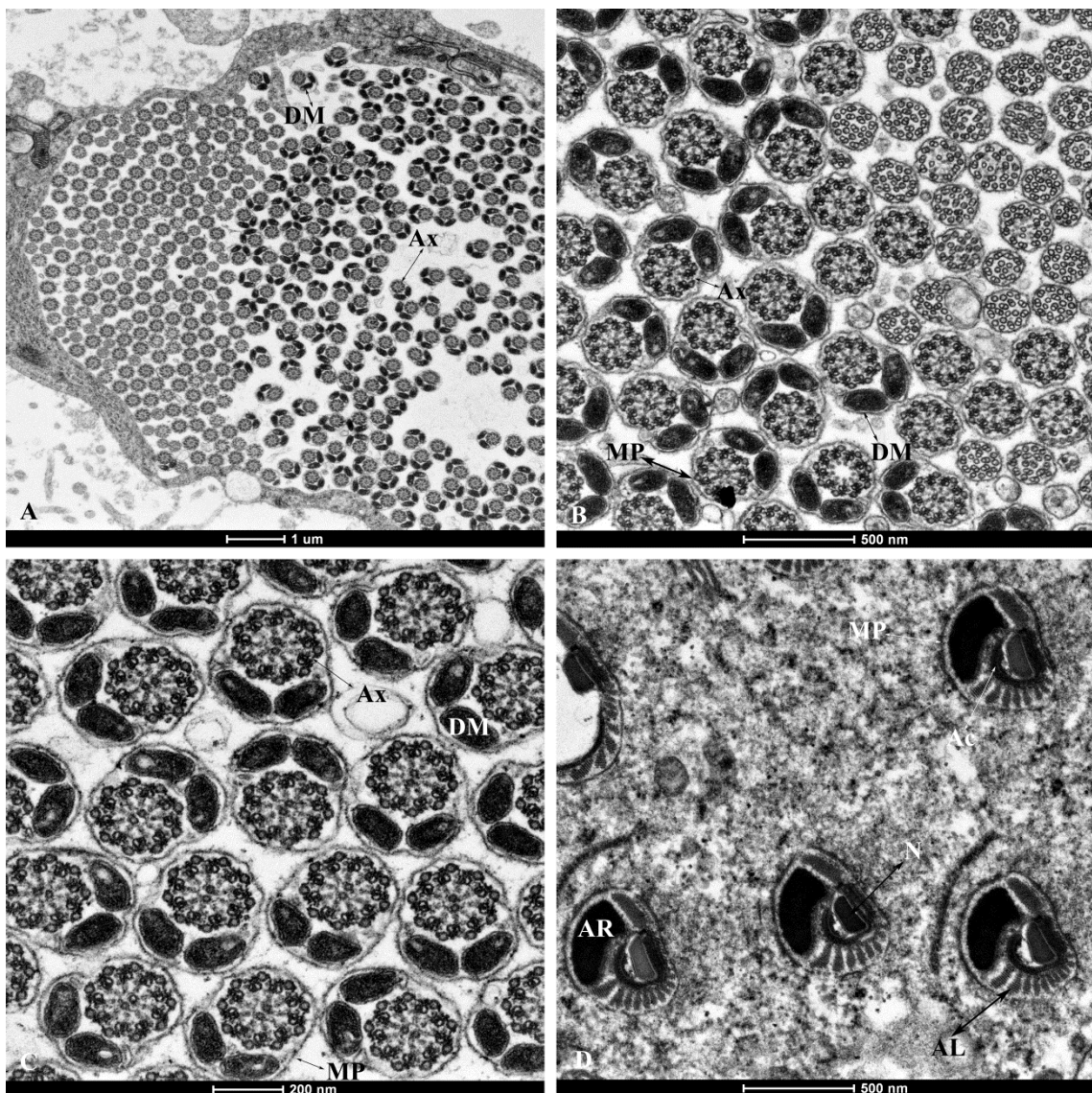


Figura 17
Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A.** Feixe de espermatozoide eupirene (Eu) em corte transversal mostrando região anterior um pouco abaixo da região mostrada na micrografia 17D.
- B.** Feixe de espermatozoide eupirene em corte transversal mostrando região anterior com núcleo (N), apêndice reticular (AR), apêndice laciniado (AL) e membrana plasmática (MP).
- C.** Corte transversal de espermatozoide eupirene mostrando a região do flagelo composto por axonema (Ax), derivado mitocondrial (DM), apêndice reticular e apêndice laciniado.

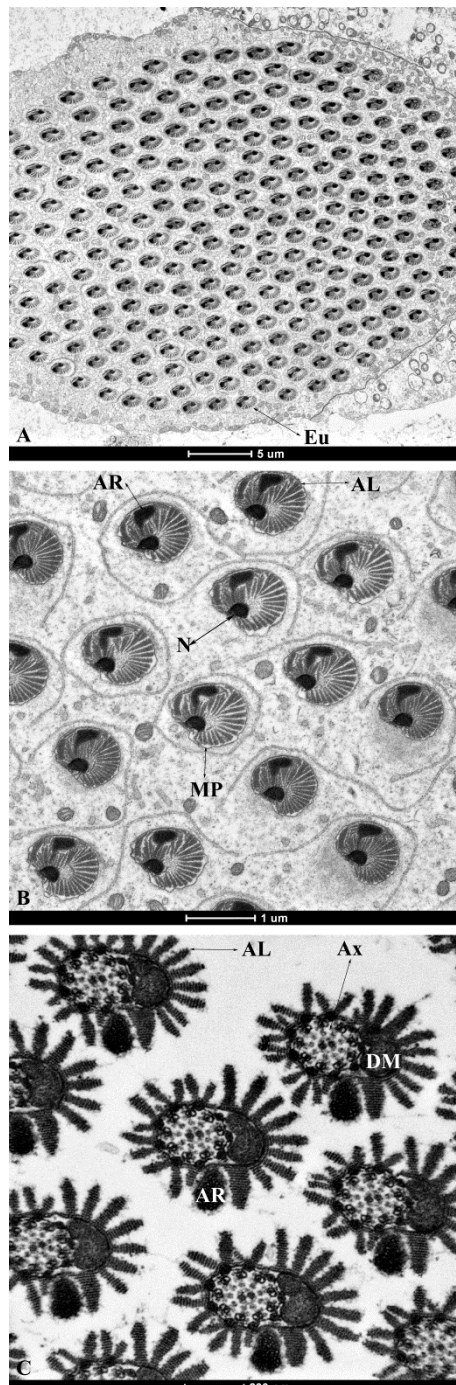
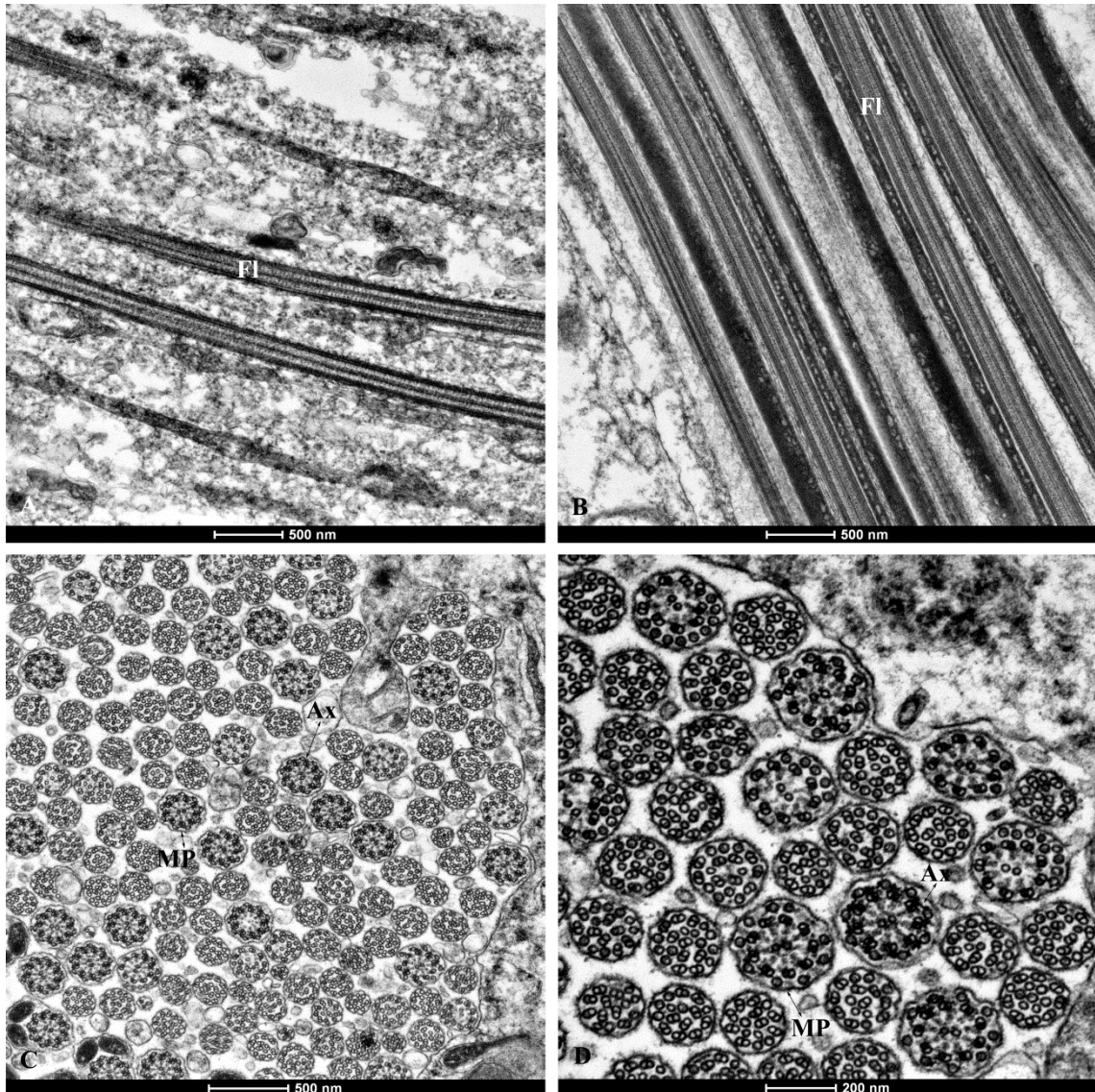


Figura 18

Testículo de adulto de *Telchin licus* em M.E.T.

- A. Corte longitudinal de flagelo (Fl) de espermatozoide.
- B. Corte longitudinal de flagelo de espermatozoide.
- C. Corte transversal de axonema (Ax) em várias alturas mostrando desde a organização do tipo “9+9+2” até a terminação desorganizada; membrana plasmática (MP).
- D. Corte transversal do axonema em diferentes alturas mostrando desde a organização do tipo “9+9+2” até a terminação desorganizada; membrana plasmática.



6. Conclusões

Os resultados obtidos através da análise morfológica dos testículos de *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae) permitiram-nos concluir que:

- As características morfológicas dos testículos de larvas e adultos de *T. licus* são semelhantes às descritas para outros Lepidoptera, sendo que em larvas de *T. licus* existem dois testículos riniformes divididos em quatro folículos testiculares cada um e em adultos de *T. licus* existe apenas um testículo, provavelmente resultante da fusão dos testículos larvais, dividido em mais de quatro folículos testiculares.

- O processo da espermatogênese em *T. licus* tem início na fase de larva e se mantém até a fase adulta, sendo um processo centrípeto, com desenvolvimento sincrônico das células germinativas de um mesmo cisto testicular.

- A espermatogênese em *T. licus* pôde ser sistematizada em seis estágios de desenvolvimento das células germinativas, sendo os três primeiros estágios comuns para os espermatozoides eupirenes e apirenes.

- A partir do estágio de espermatíde jovem é possível diferenciar as espermatídes eupirenes das apirenes.

- *T. licus* apresenta espermatogênese dicotômica, produzindo espermatozoides eupirenes (nucleados) e espermatozoides apirenes (anucleados).

Referências

- ALMEIDA L. C.; ARRIGONI, E. B. Parâmetros biológicos da broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus* (Drury, 1773). **Revista de Agricultura**, p. 56-61. 2009.
- ALMEIDA L. C.; DIAS FILHO, M. M.; ARRIGONI, E. B. Primeira ocorrência de *Telchin licus* (Drury, 1773), a broca gigante da cana-de-açúcar, no estado de São Paulo. **Revista de agricultura**, v. 82, n. 2, p. 223-225, 2007.
- ALMEIDA, M. C.; CRUZ-LANDIM, C. Spermiogenesis in *Palembus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) with emphasis on the formation of mitochondrial derivatives. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 17, p. 75-80, 2000.
- ALVES, L. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Acta Zoologica**, v. 87, p. 131-139, 2006.
- BACCETTI, B. Insect sperm cells. **Adv. Insect Physiol.**, v. 9, p. 315-397, 1972.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B. A. The biology of the sperm cell. **Monogr Dev Biol**, v. 10, p. 1-254, 1976.
- BENEDINI, M. S.; CONDE, A. J. Broca gigante nova praga da cana-de-açúcar na região centro-sul. **Revista Coplana**, Guariba. n. 24, p. 24-25, 2008.
- BOTELHO, P. S.; GARCIA, J. F.; MACEDO, L. P. M. Outras lagartas que atacam a cana-de-açúcar. In: PINTO, A. S. (Org.). Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho: [s. n.], p. 25-28, 2006. (Boletim técnico biocontrol, 1).
- CORSATTO-ALVARENGA, L. B. F.; CESTARI, A. N.; RIBEIRO, A. F. Apyrene and eupyrene spermatogenesis in *Methona themisto* (Lepidoptera: Ithomiinae). **Rev. Bras. Genet.**, v. 10, p. 655-672, 1987.
- DALLAI R.; GOTTARDO M.; MERCATI D.; MACHIDA R.; MASHIMO Y.; MATSUMURA Y.; BEUTEL R.G. Giant spermatozoa and a huge spermatheca: A case of coevolution of male and female reproductive organs in the ground louse *Zorotypus impolitus* (Insecta, Zoraptera). **Arthropod Structure & Development** v. 43, p. 135-151, 2014a.
- DALLAI R.; GOTTARDO M.; MERCATI D.; MACHIDA R.; MASHIMO Y.; MATSUMURA Y.; RAFAEL J. A.; BEUTEL R. G. Comparative morphology of spermatozoa and reproductive systems of zorapteran species from different world regions (Insecta, Zoraptera). **Arthropod Structure & Development**, v. 43, p. 371-83, 2014.
- DALLAI, R. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. **Arthropod Structure & Development** v.43, p. 257-290, 2014.

- DIAS FILHO, M.M.; TANGERINI, N. Redicouverte de *Castnia geron* (Kollar, 1839) et description de la femelle de cette espèce (Lepidoptera: Castniidae). **Bulletin de la Societe Entomologique de France**, v. 96, n. 1, p. 41-47, 1991.
- FRANÇA, R. G. R.; BÁO, S. N. Dimorphism in spermatozoa of *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1918 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 17, p. 5-10, 2000.
- FRIEDLÄNDER, M. Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. **J. Insect Physiol.**, v. 43, n. 12, p. 1085-1092, 1997.
- FRIEDLÄNDER, M.; MIESEL, S. Spermatid anucleation during the normal atypical spermatogenesis of the warehouse moth *Ephestia cautella*. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 9, p. 173-185, 1977.
- FRIEDLÄNDER, M.; SETH, R. K., REYNOLDS, S. E. Eupyrene and Apyrene Sperm: Dichotomous Spermatogenesis in Lepidoptera. **Adv. Insect Physiol.**, v. 32, p. 206-308, 2005.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GARCIA, J.F.; BOTELHO, P.S.M. Broca gigante da cana-de-açúcar. **Revista Protec**, ed. especial, p. 17-20, 2009.
- GARVEY, L. K.; GUTIERREZ, G. M.; KRIDER, H. M. Ultrastructure and morphogenesis of the apyrene and eupyrene spermatozoa in the gypsy moth. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 93, p. 1147-1155, 2000.
- GOMES A.D.; BADKE J.P.; ZAMA U.; DOLDER, H.; LINO-NETO J. Morphology of the male reproductive system and spermatozoa in *Centris Fabricius*, 1804 (Hymenoptera: Apidae, Centridini). **Micron**, v. 43, p. 695–704, 2012.
- GUAGLIUMI, P. Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Açúcar e Alcool, 1972-1973. 622 p. (Coleção Canavieira, 10).
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P.S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007. 440p.
- HAMON, C.; CHAUVIN, G. Ultrastructural analysis of spermatozoa of *Karscheltellus lupulinus* L. (Lepidoptera: Micropterigidae). **J. Insect Morphol. Embryol.**, v. 21, p. 149-160, 1992.

IBGE. **Indicadores IBGE**: estatística da produção agrícola: junho 2008. [Rio de Janeiro, 2008]. 48p.

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

JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Enfield: 1999. New Hampshire, USA.

KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae) V. The factor related to the separation of eupyrene sperm bundles. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 12, n. 4, p. 370-371, 1977.

KAWAMURA, N.; YAMASHIKI, N.; BANDO, H. Behavior of mitochondria during eupyrene and apyrene spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera), investigated by fluorescence in situ hybridization and electron microscopy. **Protoplasma**, v. 202, p. 223-231, 1998.

KING, R. C.; AKAI, H. Spermatogenesis in *Bombyx mori*. I. The canal system joining sister spermatocytes. **J. Morphol.**, v. 134, p. 47-56, 1971.

KING, R. C.; CASSIDY, J. D.; ROUSSET, A. The formation of clones of interconnected cells during gametogenesis in insects. In: KING, R. C.; AKAI, H. (Eds.). **Insect ultrastructure**. New York: Plenum, 1982, p. 3-31.

KUBO-IRIE, M.; IRIE, M.; NAKAZAWA, T.; MOHRI, H. Morphological changes in eupyrene and apyrene spermatozoa in the reproductive tract of the male butterfly *Atrophaneura alcinous* Klug. **Invertebr. Reprod. Dev.**, v. 34, p. 259-268, 1998.

LaCHANCE, L. E.; OLSTAD, G. Spermiogenesis of eupyrene sperm in pre-pupae, pupae, and adults of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Nocutidae): an ultrastructural study. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 81, n.2, p. 292 – 300, 1988.

LaCHANCE, L. E.; OLSTAD, G. Spermiogenesis of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Nocutidae): an ultrastructural study of eupyrene sperm in sterile backcross males. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1988 a.

LAI-FOOK, J. Structural comparison between eupyrene and apyrene spermiogenesis in *Calpododes ethlius* (Hesperiidae: Lepidoptera). **Can. J. Zool.**, v. 60, p. 1216-1230, 1982.

LEVIATAN, R.; FRIEDLANDER, M. The eupyrene-apyrene dichotomous spermatogenesis. I. The relationship with postembryonic development and the role of the decline in juvenile hormone titer toward pupation. **Dev. Biol.**, v. 68, p. 515-524, 1979.

- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagelum transition region. **Tissue & Cell**, v. 32, n. 4, p. 322-327, 2000a
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Zool. (Stockholm)**, v. 81, p. 205-211, 2000.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). **Tissue & Cell**, v. 34, n. 2, p. 124-128, 2002
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Protein detection in spermatids and spermatozoa of the butterfly *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera). **Biocell**, v.28, n. 3, p. 299-310, 2004.
- MANCINI, K.; BÁO, S. N.; FERNANDES, A. P.; DOLDER, H. Immunocytochemical localization of tubulins in spermatids and spermatozoa of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Tissue & Cell**, v. 37, p. 81-89, 2005.
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Dichotomic Spermiogenesis in *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 21, n. 1, p. 13-23, 2004 a.
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Sperm morphology and arrangement along the male reproductive tract of the butterfly *Euptoieta hegesia* (Insecta: Lepidoptera). **Invertebr Reprod Dev.**, v. 44, p. 107-117, 2003.
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Ultrastructure of apirene and eupirene spermatozoa from the seminal vesicle of *Eupitoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Tissue & Cell**, v. 33, n. 3, p. 301-308, 2001.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L.A.O.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). **Insect. Soc.**, v. 53, p. 333-338, 2006.
- MANDELBAUM, I. Intercellular bridges and the fusome in the germ cells of the *Cecropia moth*. **J. Morphol.**, v. 166, p. 37-50, 1980.
- MEDEIROS, M. **Estudo ultra-estrutural da espermiogênese dicotômica de *Alabama argillacea* Hübner, 1818.** 1997. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1997.
- MEDEIROS, M.; SILVEIRA, M. Ultrastructural study of apyrene spermatozoa of *Alabama argillacea* (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae) with tannic acid containing fixative. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 28, p. 133-140, 1996.

- MENDONÇA, A.F.; VIVEIROS, A.J.A.; FRANCISCO, F.S. A broca gigante de cana de açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). In: MENDONÇA A.F. (Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos e Cia, 1996. p. 131-167.
- MEVES, F. Ueber oligopyrene und apirene Spermien und über ihre Entsehung, nach Beobachtungen an *Paludina* und *Pygaera*. **Arch. Mikrosk. Anat Entwicklungsmechanik**, v. 61, p. 1-82. 1903.
- MORAES, S.S.; DUARTE, M. Morfologia externa comparada das três espécies do complexo *Telchin licus* (Drury) (Lepidoptera, Castniidae) com uma sinonímia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 245-265, 2009.
- MOREIRA J.; ARAÚJO V.A.; BÁO S.N.; LINO-NETO J. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Micron**, v. 41, p. 187–192, 2010.
- OLIVEIRA, H. N., Pragas da cana-de-açúcar podem ser introduzidas em Mato Grosso do Sul e causar prejuízos à cultura. Comunicado Técnico Embrapa, Dourados - MS, março, 2009.
- OSANAI, M.; KASUGA, H.; AIGAKI, T. Physiological role of apyrene spermatozoa of *Bombyx mori*. **Experientia** (Basel), v. 43, n. 6, p. 593-596, 1987.
- PAOLI F.; DALLAI R.; CRISTOFARO M.; ARNONE S.; FRANCARDI A.; ROVERSI F. Morphology of the male reproductive system, sperm ultrastructure and Y-irradiation of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Dryophthoridae). **Tissue and Cell**, v. 46, p. 274–285, 2014a.
- PAOLI F.; GOTTARDO M.; DALLAI R.; ROVERSI P.F. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of the egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygastridae). **Arthropod Structure & Development**, v. 42, p. 297-308, 2013.
- PAOLI F.; ROVERSI P.F.; BENASSAI D.; SQUARCINI M.; MERCATI D.; DALLAI R. The sperm of *Matsucoccus feytaudi* (Insecta, Coccoidea): Can the microtubular bundle be considered as a true flagellum? **Arthropod Structure & Development**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.asd.2014.11.005>
- PEREIRA, M. C. Morfologia do testículo e espermatogênese em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): estudo citoquímico e ultraestrutural. Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/ SP, 2011. 110p

- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **J. Cell Biol.**, v. 44, p. 243-277, 1970.
- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **J. Cell Biol.**, v. 44, p. 243-277, 1970a.
- PHILLIPS, D. M. Morphogenesis of the laciniate appendages of lepidopteran spermatozoa. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 34, p. 567-585, 1971.
- PHILLIPS, D. M. **Spermiogenesis**. New York: Academic, 1974. 68p.
- RIEMANN, J. G. Metamorphosis of sperm of the cabbage looper *Trichoplusia ni* during passage from the testes to the female spermatheca. In: BACCETTI, B. (Ed.). **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, 1970. p. 321-331.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7^o ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.
- SILVA JÚNIOR, M. P.; NICOLA, M. V.; ROSSI, M. M.. Broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) na região Centro-Sul: preocupação para os produtores. **Nucleus**, edição especial, p. 49-54, 2008.
- SILVA-BRANDÃO, K.L.; ALMEIDA, L.C.; MORAES, S.S.; CÔNSOLI, L.F. Using population genetic methods to identify the origin of an invasive population and to diagnose cryptic subspecies of *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 103, P. 89–97, 2013.
- SONNENSCHNEIN, M.; HAUSER, C. L. Presence of only eupyrene spermatozoa in adult males of the genus *Micropteryx* Hubner and its phylogenetic significance. **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, v. 19, p. 269-276, 1990.
- SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphism in insects. **Biol. Rev.**, v. 77, p. 153-182, 2002.
- SZÖLLOSI, A. Relationships between germ and somatic cells in the testis of locusts and moths. In: KING, R. C.; AKAI, H. (Eds.). **Insect ultrastructure**. New York: Plenum, v. 1, p. 32-60, 1982.
- VENZON, M.; JÚNIOR, T. J. de P.; PALLINI, A. **Avanços no controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG - CTZM, 2008. 284p.
- WADT, L. Comportamento reprodutivo da broca gigante de cana-de-açúcar, *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), como base para seu controle. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba/SP, 2012. 77p.

WIGGLESWORTH, V. B. **Insect physiology**. 8° ed. New York: Chapman & Hall, 1984. 191p.

WOLF, K. W.; BAUMGART, K.; TRAUT, W. Cytology of Lepidoptera. II. Fine structure of eupirene and apirene primary spermatocytes in *Orgyia thyellina*. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 44, p. 57-67, 1987.

ZRIBI S.; QUILICHINIB Y.; TEKAYAA S.; MARCHAND B. Fine structure of the spermatozoon of *Perinereis macropus* (Claparède, 1870) (polychaeta, Nereidae). **Micron**, v. 66, p. 80–86, 2014.

Anexos

Esta seção é formada por dois anexos:

Anexo I - Este anexo corresponde ao Artigo Científico resultante deste estudo de doutorado, intitulado “Testes Morphology and Dicothomic Spermatogenesis in *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castiniidae)”.

Anexo II - Este anexo corresponde ao Artigo Científico resultante do estudo de doutorado sanduíche realizado na Universidade Nacional da Austrália (Canberra, ACT – Australia) no período de Janeiro/2014 a Julho/2014 sob orientação do Dr. Paul Douglas Cooper. O trabalho intitula-se “New finding: the head capsule salivary gland of black field cricket *Teleogryllus commodus* (Walker) and your possible function” e teve suporte financeiro CAPES - Bolsa PDSE, Processo BEX 11578/13-0.

Ambos os artigos científicos serão submetidos para a publicação após a defesa de doutorado que ocorrerá em 27 de fevereiro de 2015. Pretendemos enviar os artigos para periódicos com ênfase em estudos morfo-fisiológicos de insetos, em março de 2015.

Anexo I

**Testes Morphology and Dicothomic Spermatogenesis in
Telchin licus (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castiniidae)**

MC PEREIRA^{a*}, LC ALMEIDA^b, DC SANTOS^a

^aEntomology Laboratory, Department of Morphology, Bioscience Institute, UNESP -
São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

^bCentro de Tecnologia Canavieira, Fazenda Santo Antônio, Piracicaba, SP, Brazil

*Corresponding author at: Laboratório de Insetos, Departamento de Morfologia,
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu – SP, Brasil. CEP: 18618-970. Tel: + 55 14
38800492; fax: + 55 14 38153744.

E-mail address: monique@ibb.unesp.br

Running title: Sperm heteromorphism in *Telchin licus*

Abstract

Telchin licus (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) is a sugarcane crop pest known as giant sugarcane borer. In Brazil the production of sugar and alcohol is considered one of the main activities of the national economy. Despite the economy importance of sugarcane to the country, large amount of sugarcane production is lost because of damage caused by insect pests. The giant sugarcane borer is widespread in an area about 320 thousands of hectares and can affect from 20% to 60% of the production where it occurs, causing losses up to R\$ 34,5 million each harvest. In the larval stage this insect can causes huge losses for crop and because of your body size it is known as “giant borer”. It can mention “podridão vermelha” among the main damages caused by fungi that enter in the hollow open by the larvae in sugarcane, thus decreasing the sugar and alcohol production. The expansion of knowledge about the reproduction biology of this insect has become a requirement to support research on the development and improvement of control methods to this pest and faced with we set out to characterize morphologically the testis and investigate the formation process of male gametes (spermatogenesis) in this specie. The Lepidopteran order has the dichotomous spermatogenesis with the production of eupyrene and apyrene sperm (nucleate and enucleated). In this study it was made the morphological and ultrastructural description of *T. licus* testis and the characterization of different spermatogenesis steps and the characterization of the two sperm types. It was used larvae and adults to the research. The spermatogenesis process can be organized and characterized in six steps (spermatogonia, spermatocyte, early spermatid, young spermatid, late spermatid and sperm), resulting in two sperm types, the eupyrene and apyrene ones.

Keywords: Apyrene; Eupyrene; Lepidoptera; Spermatogenesis; *Telchin licus*; Testis morphology.

Introduction

The *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae) is a sugarcane crop pest popularly known as giant sugarcane borer (Silva Júnior, M. P., Nicola, M. V., Rossi, M. M., 2008). The damage caused by *T. licus* can reach 20-60% to the production of sugarcane on the places where they occur (Gallo *et al.*, 2002).

The larvae of Lepidopteran order contain paired testes which in adult can remain separated or fuse into a single structure (Friedländer *et al.*, 2005; LaChance and Olstad, 1988). The Lepidopteran insects are able to produce two sperm types, apyrene and eupyrene sperm, that have as a main feature respectively the lack or presence of nucleus (Riemann, J. G., 1970; Lai-Fook, J., 1982; Kubo-Irie, M. *et al.*, 1998; Jamieson, B. G. M. *et al.* 1999; França, R. G. R.; Bão, S. N., 2000; Mancini, K.; Dolder, H., 2001, 2003, 2004, 2004a; Friedländer, M. *et al.*, 2005; Mancini, K. *et al.*, 2005).

In view of the wide damage caused by giant sugarcane borer in sugarcane crop and in view that there is no effective control to this pest, the knowledge of testis morphology and spermatogenesis in *T. licus* is important to collaborate with research aimed at biological control of this pest.

This research aimed to the description at microscopy light level, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy of dichotomic spermatogenesis and testis morphology in *T. licus*.

Material and Methods

Larvae male and adults male of *T. licus* were obtained from Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, S.P. Egg and testes were collected and processed for light microscopy, transmission and scanning electron microscopy as described below.

Light microscopy. Specimens were set in paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (2,5%) in 0,1M phosphate buffer, with pH 7,3 for 24 hours, and then dehydrated in ethanol solution and embedded in glycol methacrylate resin. The samples were sectioned at 3µm, which were set up on microscope slides and stained with Hematoxylin-Eosin (Pearse, 1972) and Feulgen Reaction (Pearse, 1972). The permanent slides were put together with Permount, examined and photographed using Olympus Photomicroscope.

Transmission electron microscopy. The samples collected were immersed in paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (2,5%) in 0,1M phosphate buffer, with pH 7,3 for 24 hours, post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hour at 25°C, dehydrated through an acetone series and embedded in araldite resin. Ultra-thin sections were obtained with a Diatome knife and stained afterwards with uranyl acetate and lead citrate. The material was examined and photographed using a Transmission Electron Microscope TECNAI Spirit.

Scanning electron microscopy. The samples were allowed to stay for 48 hours at room temperature in glutaraldehyde (2.5%) in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) and washed in distilled water. They were post-fixed in osmium tetroxide (1%) diluted in distilled water, dehydrated through a graded series of ethanol, critical point-dried with CO₂, coated with gold and examined in Quanta 200 Scanning Electron Microscope.

Results

Tetis morphology. *T. licus* larva has a pair of kidney-shaped testis covered by tunica cell that divide the testis in four follicles, each follicle has apical extremity and basal extremity. At apical extremity is the germarium that is a region constituted by early germline cells and spermatogonia cysts, at basal extremity are the spermatocyte cysts. Cysts of late germline cells (spermatid cyst and sperm bundle) were not observed in larva testis (Fig. 1a, 1b, 1c, 1d).

The spermatogenesis process occurs from the apical extremity to the basal extremity of follicle and occurs inside cysts, which are delimited by cystic cell (somatic cell). The cystic cell is thin and contain basophilic nucleus as can be seen on (Fig. 1c, 1d, 1e).

The spermatogonia have rounded shape, acidophilic cytoplasm, rounded and basophilic nucleus and some spermatogonia cysts contain cells with condensed chromosomes, a feature of cell division as was shown in (Fig. 1e).

The spermatocytes have voluminous cytoplasm and his nucleus is bigger than spermatogonia nucleus. The cytoplasm is acidophilic with large rounded basophilic nucleus (Fig. 1f).

The adult has a single, fused and spherical testis divided in several follicles which contain germline cell cysts at different stages of development. Inside the follicles are arranged spermatogonia cysts, spermatocyte cysts, spermatid cysts and sperm bundles as was observed in (Fig. 2a, 2b, 2c).

Spermatid has acidophilic cytoplasm, basophilic and rounded nucleus. These cells pass through elongation process, so some cysts are in beginning of the process and others in a more advanced stage of the process was observed as in (Fig. 2d, 2e).

The sperm bundles have elongated and filiform cells with acidophilic cytoplasm. Some sperm bundles have filiform and basophilic nucleus while others are enucleated sperm bundles in (Fig. 2f).

Spermatogonia. Inside the spermatogonia cysts the cells maintain arranged into interconnected groups by cytoplasmic bridges and these germ cells develop synchronously with all the cells inside the cyst in the same stage of development as in (Fig. 3a).

The spermatogonia have electron-dense cytoplasm and rounded nucleus with some heterochromatin clusters scattered mainly on periphery of the same. Some spermatogonia cysts have a feature of cell division (Fig. 3b, 3c). After characteristic number of mitotic divisions, the spermatogonia pass through the more advanced stage, the spermatocyte stage.

Spermatocyte. The spermatocyte has electron-dense cytoplasm, rounded nucleus with heterochromatin clusters scattered randomly and prominent nucleolus. The cells inside the cyst remain interconnected by cytoplasmic bridges. It can see mitochondria cluster in a specific region of the cell as observed in (Fig. 3d).

Early spermatid. At this stage occurs the formation of mitochondrial complex that is a rounded structure, very electron-dense with electron-lucent cisterns internally. The early spermatid has rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and is interconnected by cytoplasmic bridges. The nucleus is rounded and voluminous with heterochromatin clusters spreads randomly and with prominent nucleolus. The axoneme is in growth from basal body as can be visualized through (Fig. 3e, 3f).

After the mitochondrial complex formation, these structure start the stretching and division process. At this stage, the mitochondrial complex is very electron-dense with inner electron-lucent vesicles. After the division, the mitochondrial complex gives rise to two mitochondrial derivatives that flank the axoneme that has in this moment a “9+2” microtubular arrangement, with nine peripheral doublets and two central microtubules as can be seen in (Fig. 3g, 3h).

T. licus as other Lepidopteran order insects has dichotomic spermatogenesis which is responsible for production of two sperm types. From the young spermatid stage it is

possible to differentiate between apyrene and eupyrene cell through characteristics that will be described below.

Apyrene young spermatid. During apyrene spermiogenesis occur the nucleus elimination. At this stage, these cells have two similar mitochondrial derivatives with rounded shape and the inner region very electron-dense. Throughout the process of spermiogenesis, these mitochondrial derivatives undergo change in its format, becoming oval. This format is known as the “shoe soles”. The mitochondrial derivatives are arranged in parallel form with another and flanking the axoneme. Axoneme has “9+9+2” microtubular pattern that consists of nine accessory microtubules, nine peripheral doublets and two central microtubules (Fig. 4a).

Apyrene late spermatid. At this stage, the arrangement of the two mitochondrial derivatives move to “V” position, the inner electron-dense region increases its size and the axoneme maintains “9+9+2” microtubular pattern as in (Fig. 4b).

Eupyrene young spermatid. These cells are composed by two electron-dense mitochondrial derivatives kidney-shaped that ending at different high along the spermatid and the axoneme has “9+9+2” microtubular pattern as can be seen in (Fig. 4c).

At this stage occur reticular appendage formation and the initiation of laciniate appendage formation, which are specific structures of eupyrene cell (Fig. 4C).

Eupyrene late spermatid. The cells are formed by two electron-dense mitochondrial derivatives that have kidney-shaped ending at different high. The axoneme has “9+9+2” microtubular pattern, reticular appendage and laciniate appendages as in (Fig. 4d).

Apyrene sperm. The apyrene sperm has two regions: the anterior region and the posterior region. The anterior region is composed by very electron-dense dense cap (Fig. 5a, 5b). The posterior region which corresponds to the tail is composed by two electron-dense mitochondrial derivatives with “V” arrangement, similar in size and shape, with inner electron-lucent regions. The axoneme is composed by “9+9+2” microtubular pattern with nine accessory microtubules, nine peripheral doublets and two central microtubules as can be seen in (Fig 5c).

Eupyrene sperm. The mature eupyrene sperm is also divided in two regions: anterior region and the posterior region. The anterior region is composed by very electron-dense acrosome and filiform, elongated and electron-dense nucleus. The anterior region also has reticular appendage and laciniate appendages, both extend from

anterior region to posterior region of sperm. The laciniate appendages are formed by electron-dense bands interspersed to electron-lucent bands (Fig. 5d). The posterior region is composed by “9+9+2” microtubular pattern with nine accessory microtubules, nine peripheral doublets and two central microtubules; two mitochondrial derivatives with similar formats and different sizes that ending in different high. This region also has the reticular appendage and laciniate appendages (Fig. 5e).

Both apyrene sperm and eupyrene sperm flagellum is composed by two mitochondrial derivatives and “9+9+2” axoneme that become disorganized at final portion of sperm (Fig. 5f).

Discussion

The morphology features of *T. licus* larvae testis as shape, covering and follicles number are similar the description done by Lai-Fook (1982) in *Calpodus ethlius* (Lepidoptera: Hesperidae), Corsato-Alvarenga *et al.* (1987) in *Methona themisto* (Lepidoptera: Ithomiidae), Friedländer *et al.* (2005) in a review about Lepidopteran spermatogenesis and Dallai (2014) in a review about Hexapod.

The number of testicular follicles is variable depending on the specie, for example *Palembus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) has six follicles each testis (Almeida & Cruz-Landin, 2000) and in some insects of Dipterans order, each testis has just one follicle (Phillips, 1970).

In relation to the testis shape, there is some variance compared with insect of different order. According to Paoli *et al.*, (2013), *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera, Platygasteridae) have two narrow and slightly cone-shaped testes, but the features described to the spermatogonia in this insect are similar to the giant borer spermatogonia.

Mancini & Dolder (2004 a) and Friedländer *et al.* (2005) described two follicles regions to the larva testis (distal and proximal end) in Lepidoptera order like found in *T. licus* larva testis. Probably the region with cysts on cellular division observed in giant borer corresponds to the germarium described by Friedländer *et al.* (2005) to Lepidopteran order and Dallai (2014) to Hexapod.

The fusion of adult testes seems to be a common process in some species of Lepidopteran order. According to Friedländer *et al.* (2005), the paired testes may either remain separate, as in Hepialidae and Zeugloptera or fuse together into a single structure

like happens in adult of *C. ethlius*, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) (Lai-Fook, 1982; Alves *et al.*, 2006; Mancini & Dolder, 2004a).

The centripetal spermatogenesis was observed in *T. licus* as cited by the follow authors Phillips (1971), Mancini & Dolder (2004a), Alves *et al.* (2006) to the other Lepidopteran species and by Paoli *et. al.*, (2014a) to *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae).

The synchronous development of germ cells that occurs inside the cyst, as well as the presence of cytoplasmic bridges interconnecting these cells during spermatogenesis are common features previously described in several other insects, during formation of sperm (Wolf *et al.*, 1987; França & Bao, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Friedlander *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Dallai, 2014; Dallai *et al.*, 2014). The cytoplasmic bridges between germ cells permit reciprocal exchange of material between the cells of a single cyst and are essential for the maintenance of the cell cycle and the synchronous development of cells (Dallai, 2014).

In *M. feytaudi*, the spermatogonia is also described as a large cell with voluminous nucleus and prominent nucleolus, with cytoplasm showing large amount of mitochondria situated close to the nucleus (Paoli *et al.*, 2014), characteristics similar to those described to spermatogonia in *R. ferrugineus* by Paoli *et al.*, (2014a). In review on spermatogenesis in Lepidoptera, Friedlander *et al.* (2005) affirm that the spermatogonia production occurs throughout the insect life, so the cysts containing spermatogonia can be detected in larval testes to the adult insect stage, as was observed in *T. licus*.

The morphological characteristics described to *T. licus* spermatocyte were also found in spermatocyte of *M. feytaudi* by Paoli *et al.* (2014). Paoli *et al.*, (2014a) describes the morphological characteristics to spermatocytes of *R. ferrugineus*, and also reports the presence of mitochondria groups in cytoplasm, which according to these authors, the organelles will gradually gathering in one place in the cytoplasm of these cells, like happens in *T. licus*. Early spermatids of *E. hegesia* also have ‘9+2’ microtubular pattern (Mancini & Dolder, 2004a)

According to Dallai (2014) during the spermatogenesis process mitochondria undergo some changes such as aggregation and fusion, resulting in the "nebenkern" which later turn into two mitochondrial derivatives. The formation of "nebenkern" was also described by Lai-Fook (1982), Kawamura *et al.* (1998), Garvey *et al.* (2000), Paoli *et al.* (2013) and Paoli *et al.* (2014a). According to Garvey *et al.* (2000) in *Lymantria*

dispar (Lepidoptera: Lymantriidae), both apyrene spermatids and in eupyrene spermatids, the mitochondria aggregate to one pole of the cell, their membranes fuse and form the "nebenkern", which are transformed into mitochondrial derivatives in late spermatids. In *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperiiidae) mitochondria begin to aggregate on secondary spermatocyte stage in preparation for the formation of the "nebenkern" (Lai-Fook, 1982).

According to Kawamura *et al.* (1998) in *Bombyx mori* (Lepidoptera) the "nebenkern" begins to split in two after stretching of the spermatid. However, unlike what was described for *T. licus*, the author described distinct differences that are detected between apyrene and eupyrene mitochondrial derivatives, as the total size and internal structure. *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) have two mitochondrial derivatives in apyrene spermatid with similar size, shape and with inner electron-dense regions (Garvey *et al.*, 2000).

Dallai (2014) reports that generally in the end of spermiogenesis spermatid become individualized. Probably the individualization also occurs in apyrene and eupyrene spermatids in *T. licus*, since they were not observed cytoplasmic bridges interconnecting these cells at the end of spermiogenesis.

The absence of nucleus in apyrene sperm is the most striking feature that sets this cell type, being described by several authors: Friedlander & Miesel (1977), Lai-Fook (1982), Medeiros (1997), among others. According to the literature, the anterior region of the apyrene sperm has a dense cap and therefore does not accomplish fertilization (Riemann, 1970; Phillips, 1970a; Lai-Fook, 1982; Jamieson, 1987; Medeiros & Silveira 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bao, 2000; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini & Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006).

The ultrastructural features described here for eupyrene sperm of *T. licus* such as filiform nucleus, acrosome, axoneme with microtubular arrangement "9+9+2", two mitochondrial derivatives, reticular appendage and laciniate appendage are also observed in other Lepidoptera (Phillips, 1970; Phillips, 1971; Leviathan & Friedlander, 1979; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bao, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Friedlander *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2005; Dallai, 2014).

The first description of the sperm dimorphism in Lepidoptera was made by Meves in 1903. This process, known as dichotomous spermatogenesis, is responsible for producing apyrene sperm (enucleated) and eupyrene sperm (nucleated), as well as in *T. licus* and other insects of the same order as *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982), *M. themisto*

(Corsatto-Alvarenga *et al.*, 1987), *L. díspar* (Garvey *et al.*, 2000), *E. hegesia* (Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini *et al.*, 2005) and *L. coffeella* (Alves *et al.*, 2006).

Since it was made the first description of the spermatic dimorphism in the Lepidopteran order (Meves, 1903) all the insects studied in this order has presented both types of gametes, except Micropteryx gender (Micropterigidae) a basal group where only met eupyrene sperm (Sonnenschein & Hauser, 1990; Hamon & Chauvin, 1992).

In the review by Dallai (2014) on the Hexapod group, the author talks about the sperm dichotomy in order Lepidoptera, naming the eupirene sperm as functional sperm and the sperm apirene as non functional parasperm. According to this author, possibly the apirene sperm function is to supply nutrients to the eupirene sperm, and is responsible for helping the sperm eupirene to reach the genital tract of the female and possibly plays an important role in sperm competition.

With respect to these features present in cells during spermiogenesis, Dallai (2014) mentions that in the eupyrene nucleus acquires an elongated format during spermiogenesis due to the presence of a free layer of microtubules around the nucleus that force and reduce diameter often acquire helical format. In the nucleus of eupyrene sperm also has very elongated shape and we believe that also has passed through the stretching process becoming filiform, but were not observed free microtubules or the helical nuclear format, mentioned by Dallai (2014).

The acrosome originates in the Golgi apparatus at the beginning of spermiogenesis, initially this structure is called pro-acrosome vesicle, are able to reach their final destination at the top of the core, can acquire different formats (Dallai, 2014; Dallai *et al.*, 2014). Paoli *et al.*, (2014a) states that *R. ferrugineus* after the end of meiosis, the spermatid has a strong activity in the Golgi apparatus that produces vesicles to the formation of the acrosome. In thorax acrosome formation is similar to that described by Mancini & Dolder (2004) in *E. hegesia*.

The glycocalyx associated with the plasma membrane of the sperm in insects has difference of complexity, structure and thickness. In sperm insects of the order Lepidoptera, the glycocalyx corresponds to reticular appendage and laciniate appendage, structures associated with the plasma membrane that are present only in eupirenes sperm insects of the order Lepidoptera (Dallai, 2014).

In the posterior region of the sperm, the axoneme ends disorganized, first with the loss of microtubules accessories, followed by the two central microtubules and then by

peripheral double (Medeiros & Silveira, 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Paoli *et al.*, 2013; Paoli *et al.*, 2014a). It was also observed the axoneme disorganization in cross sections in the final high of *T. licus* sperm.

In general, the morphological characteristics of sperm and apirenes eupirenes observed in *T. licus* are similar to those described for most insects of the order Lepidoptera, however for the other orders of insects there is a vast difference in the formation of gametes, the types of gametes formed and especially in the ultrastructure of these gametes.

Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae), *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Trichogramma atopovirilia* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Solenopsis invicta* (Hymenoptera, Formicidae) e *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) have just one sperm type which is nucleated (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto *et al.*, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini *et al.*, 2006).

In *L. dieloceri* and *Pachysomoides* sp. sperm are thin and composed of the head (long nucleus, acrosome membrane and extracellular) and flagellar region (centriolar adjunct, axoneme and two accessory bodies) (Moreira *et al.*, 2010). Sperm *Centris* sp. elongated cells are formed by two distinct regions: head and flagella. The head is formed by bilayered acrosome and linear nucleus. The flagellum is composed by centriolar adjunct, axoneme "9+9+2", two asymmetric mitochondrial derivatives and two accessory bodies (Gomes *et al.*, 2012).

G. pennsylvanicum sperm are polygonal cells with nucleus and acrosome with two layers and conical shape, has a unique mitochondrial derived from cylindrical and slightly elliptical and axoneme "9+9+2" (Paoli *et al.*, 2013). *Z. huxleyi*, *Z. magnicaudelli* and *Zorotypus weidneri* (Zoraptera) also produce only one type of sperm, which is elongated, with apical acrosome, cylindrical nucleus, has two mitochondrial derivatives and the axoneme with microtubule standard "9+9+2" (Dallai *et al.*, 2014).

Zribi *et al.*, (2014) divides the sperm of *Perinereis macropus* (Polychaeta, Nereidae) into three parts: head, intermediate space and flagella. The head of the sperm nucleus with scant cytoplasm has U-shaped and cone-shaped acrosome. The intermediate space is formed by nine to eleven spherical mitochondria and centriole, and the flagellum is formed by axoneme with microtubular arrangement "9+2".

As we have noted, the morphological/ ultrastructural characteristics of sperm in insects are extremely varied, depending on the species studied and despite this current study with the giant borer did not have a specific focus on espermiotaxonomia, we believe and hope that the ultrastructural characteristics of *T. licus* sperm can be a valuable contribution to the taxonomic and phylogenetic studies using insects as biological models.

Conclusion

The results obtained by morphological analysis of the testes of *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae) allowed us to conclude that the morphological characteristics of the *T. licus* larvae testes and adults are similar to those described for other Lepidopteran, and in larvae of *T. licus* have a pair of kidney-shaped testis divided into four testicular follicles each and adults of *T. licus* has only one testis, probably resulting from the fusion of larval testes, divided into more than four testicular follicles. The spermatogenesis process in *T. licus* begins at larval stage and continues into adulthood, being a centripetal process, with synchronous development of germ cells of the same testicular cyst. The spermatogenesis in *T. licus* could be systematized in six stages of germ cell development, with the first three stages common for eupyrene and apyrene sperm. From the young spermatid stage is possible to differentiate eupyrene spermatids from apyrene ones. *T. licus* presents dichotomous spermatogenesis, producing eupyrene (nucleate) and apyrene sperm (enucleated).

Figures

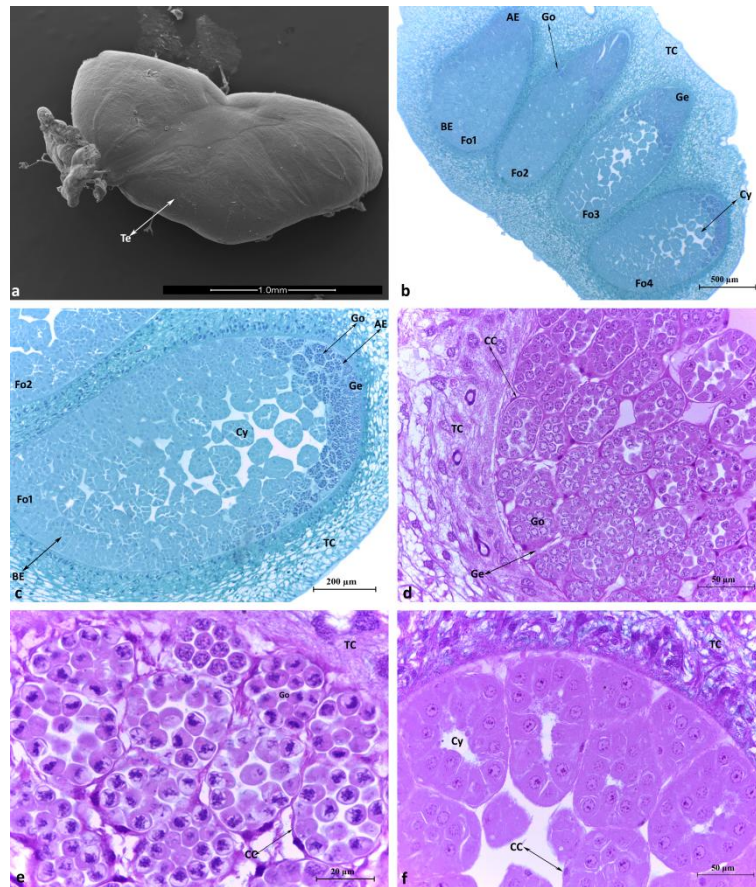


Figure 1. Scanning electron microscopy (a) and light microscopy of *Telchin licus* testis stained with Feulgen Reaction (b, c) and Hematoxylin-Eosin (d, e, f). (a) Larva kidney-shaped testis; scale bar 1.0mm. (b) Larva kidney-shaped testis coated by tunica cell (TC) dividing the testis in four follicles (Fo1, Fo2, Fo3, Fo4), germarium (Ge), basal extremity (BE), apical extremity (AE), spermatogonia cyst (Go), spermatocyte cyst (Cy); scale bar 500µm. (c) Larva testis showing tunica cell, follicles, germarium, spermatogonia cyst, spermatocyte cyst, basal extremity and apical extremity; scale bar 200 µm. (d) Region of testicular follicle showing tunica cell, germarium, spermatogonia cyst surrounded by cystic cell (CC) with nucleus; scale bar 50µm. (e) Region of germarium in the testicular follicle showing tunica cell, spermatogonia cysts on cell division and cystic cell with nucleus; scale bar 20µm. (f) Basal extremity of follicle showing tunica cell, spermatocyte cyst and cystic cell with nucleus; scale bar 50µm.

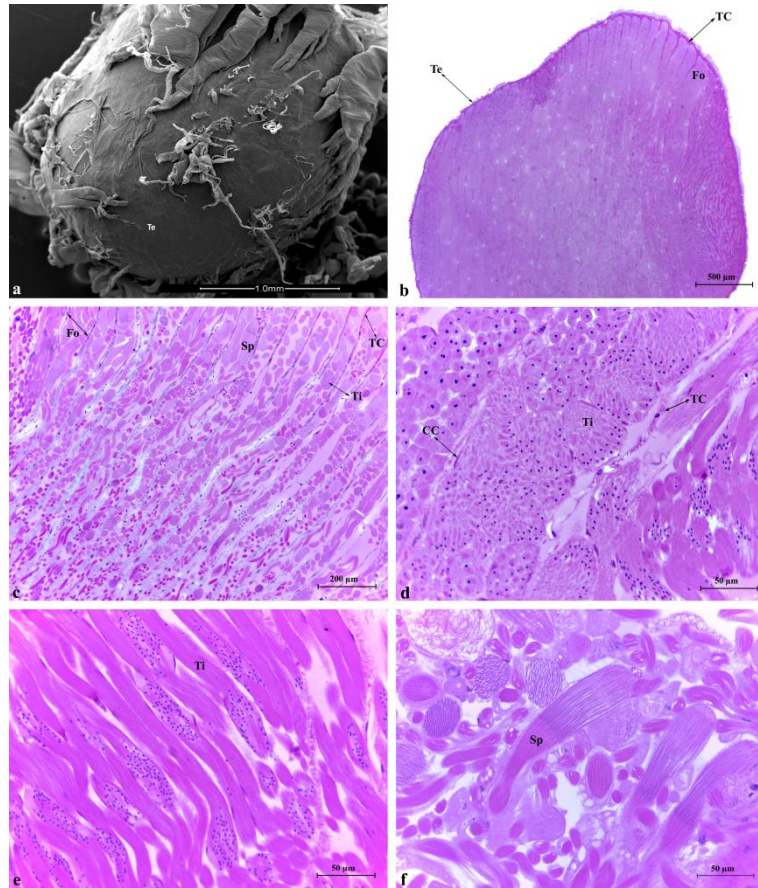


Figure 2. Scanning electron microscopy (a) and light microscopy of *Telchin licus* adult testis stained with Hematoxylin-Eosin (b, c, d, e, f). (a) Adult testis; scale bar 1.0mm. (b) Adult testis showing tunica cell (TC) and follicle (Fo); scale bar 500µm. (c) Adult testis with tunica cell, follicle, spermatid cyst (Ti) and sperm bundles (Sp); scale bar 200µm. (d) Adult testis with spermatid cysts, cystic cell (CC) and tunica cell; scale bar 50µm. (e) Spermatid cysts in adult testis; scale bar 50µm. (f) Sperm bundles in adult testis; scale bar 50µm.

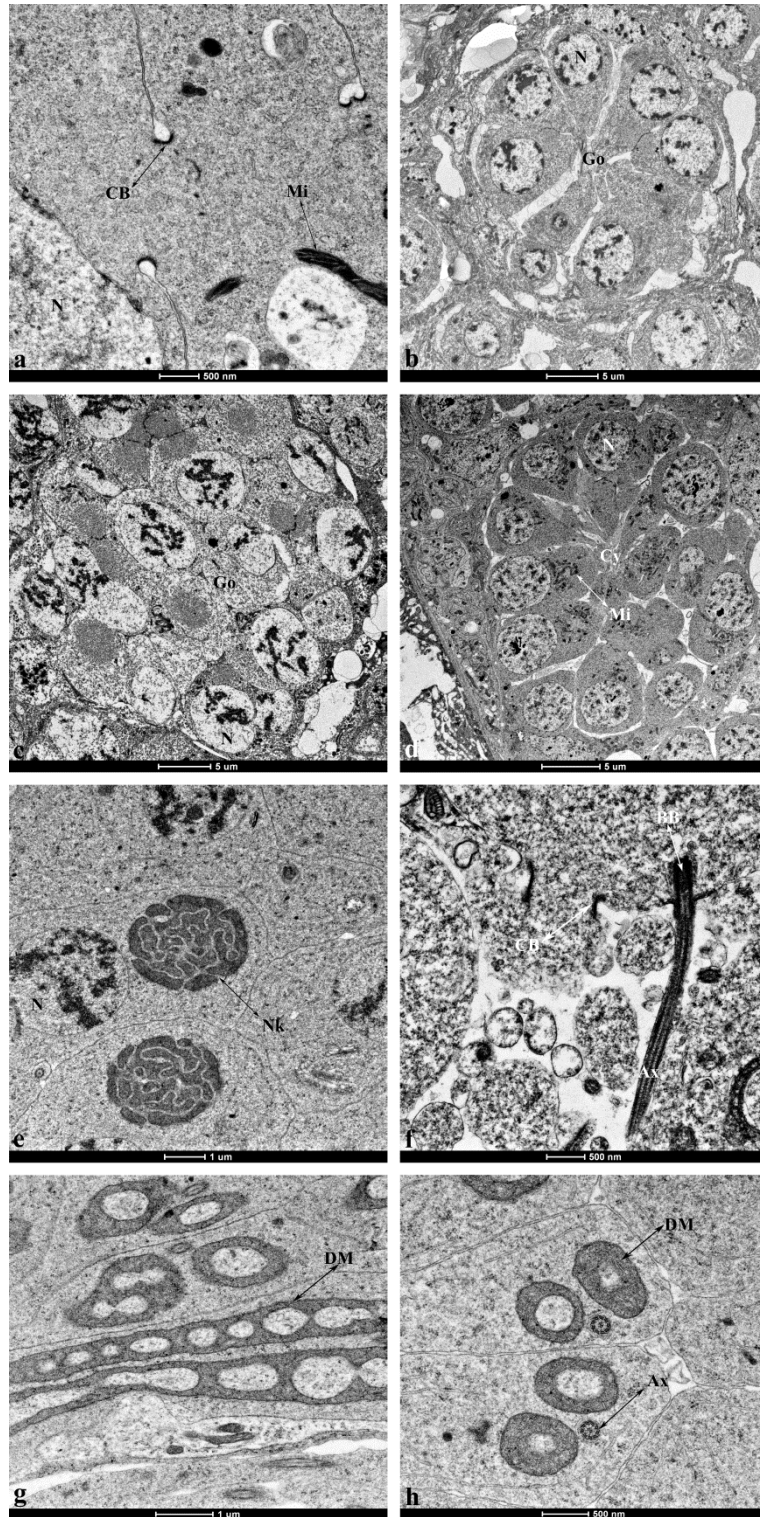


Figure 3. Transmission electron microscopy of *T. licus* testis. (a) Cytoplasmic bridge (CB), nuclei (N) and mitochondria (Mi); scale bar 500nm. (b) Spermatogonia cyst (Go) with nuclei; scale bar 5μm. (c) Spermatogonia cyst in cell division process with nuclei; scale bar 5μm. (d) Spermatocyte cyst (Cy) with mitochondria scattered in one cytoplasm region, nuclei with prominent nucleolus; scale bar 5μm. (e) Early spermatid with nuclei and nebenkern (Nk); scale bar 1 μm. (f) Region of early spermatid showing cytoplasmic bridge (CB), basal body (BB) and axoneme (Ax); scale bar 500nm. (g) Longitudinal section of mitochondrial derivatives (MD); scale bar 1μm. (h) Transversal section of mitochondrial derivatives and axoneme “9+2”; scale bar 500nm.

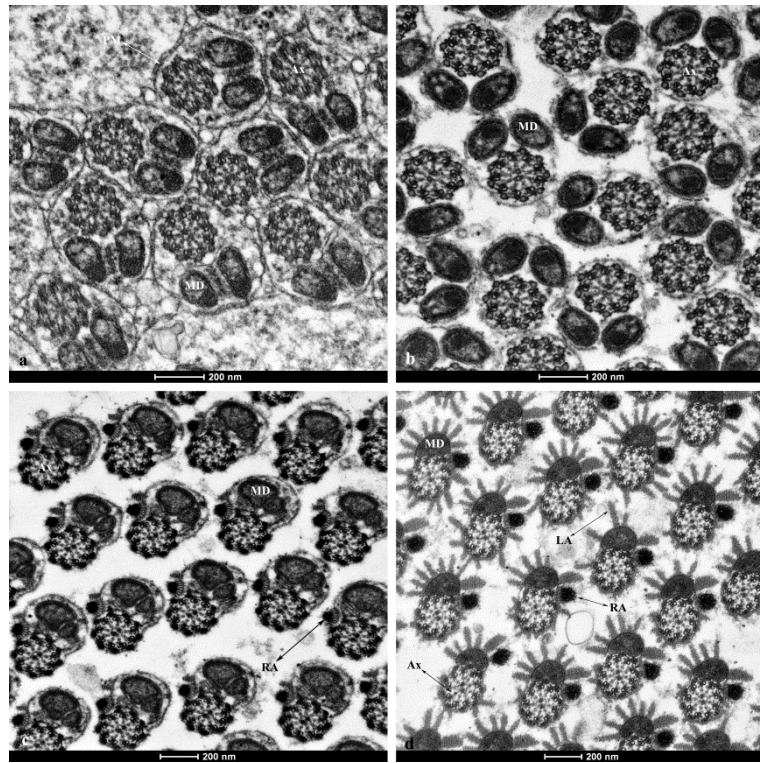


Figure 4. Transmission electron microscopy of *Telchin licus* testis. **(a)** Apyrene young spermatid showing axoneme with microtubular pattern “9+9+2” (Ax), mitochondrial derivatives (MD), plasma membrane (PM); scale bar 200nm. **(b)** Apyrene late spermatid with axoneme “9+9+2”, mitochondrial derivatives and plasma membrane; scale bar 200nm. **(c)** Eupyrene young spermatid with mitochondrial derivatives, axoneme and reticular appendage (RA); scale bar 200nm. **(d)** Eupyrene late spermatid with mitochondrial derivatives, reticular appendage and laciniate appendage (LA); scale bar 200nm.

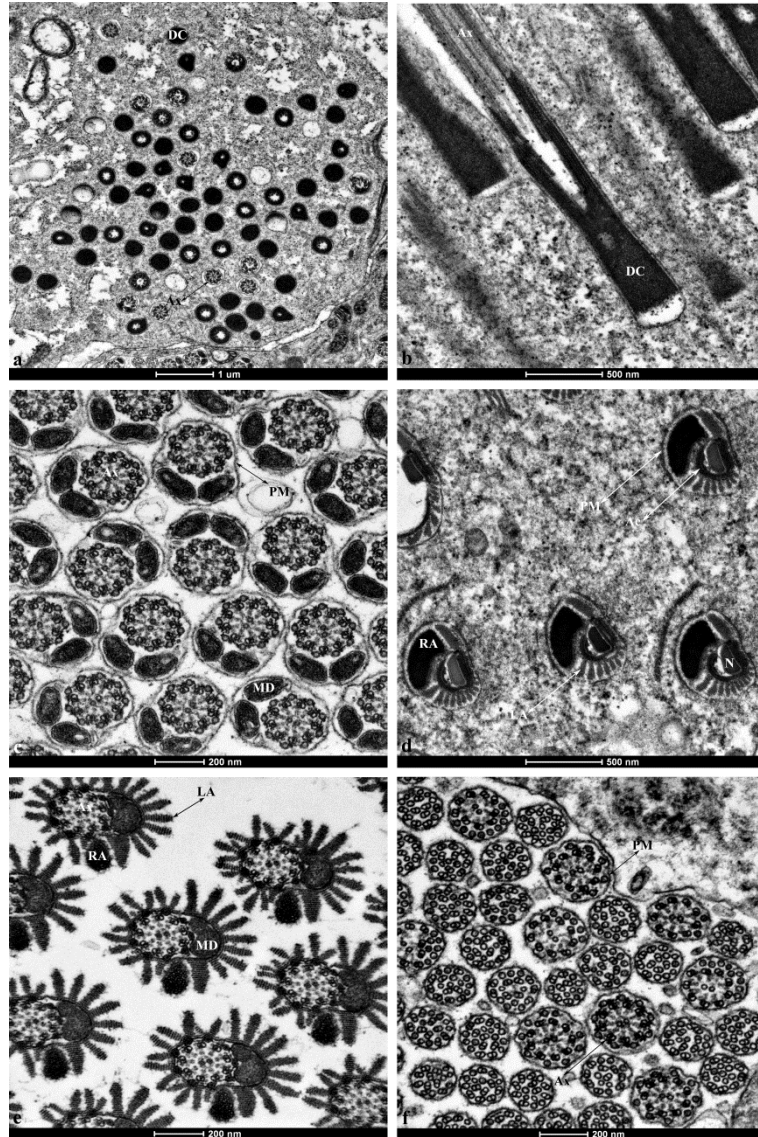


Figure 5. Transmission electron microscopy of *Telchin licus* testis. (a) Transversal section of apyrene sperm cyst showing the anterior region of sperm with dense cap (DC) and axoneme (Ax); scale bar 1 μ m. (b) Longitudinal section of apyrene sperm showing dense cap and axoneme; scale bar 500nm. (c) Transversal section of apyrene sperm tail with mitochondrial derivatives (MD), axoneme and plasma membrane (PM); scale bar 200nm. (d) Transversal section of anterior portion of eupyrene sperm with plasma membrane, acrosome (Ac), nuclei (N), reticular appendage (RA) and laciniate appendage (LA); scale bar 500nm. (e) Transversal section of eupyrene sperm tail with axoneme, mitochondrial derivatives, reticular appendage and laciniate appendage; scale bar 200nm. (f) Transversal section of axoneme showing since "9+9+2" microtubular pattern until the disorganized arrangement and plasma membrane; scale bar 200nm.

References

- Alves, L., 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Acta Zoologica**, v. 87, p. 131-139.
- Benedini, M.S., Conde, A.J., 2008. Broca gigante nova praga da cana-se açúcar na região centro-sul. *Revista Coplana*, Guariba 24, 24-25.
- Corsatto-Alvarenga, L. B. F.; Cestari, A. N.; Ribeiro, A. F., 1987. Apyrene and eupyrene spermatogenesis in *Methona themisto* (Lepidoptera: Ithomiinae). **Rev. Bras. Genet.**, v. 10, p. 655-672.
- Dallai, R., 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. **Arthropod Structure & Development** v.43, p. 257-29.
- França, R.G.R., Bão, S.N., 2000. Dimorphism in spermatozoa of *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1918 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 17,5-10.
- Friedlander, M., Seth, R.K., Reynolds, S.E., 2005. Eupyrene and Apyrene Sperm: Dichotomous Spermatogenesis in Lepidoptera. *Adv. Insect Physiol.* 32,206-308.
- Friedländer, M.; Miesel, S., 1977. Spermatid anucleation during the normal atypical spermatogenesis of the warehouse moth *Ephestia cautella*. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 9, p. 173-185.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia agrícola*. Fealq, Piracicaba, São Paulo.
- Garvey, L. K.; Gutierrez, G. M.; Krider, H. M., 2000. Ultrastructure and morphogenesis of the apyrene and eupyrene spermatozoa in the gypsy moth. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 93, p. 1147-1155.
- Gomes, A.D.; Badke, J.P.; Zama U.; Dolder, H.; Lino-Neto J., 2012. Morphology of the male reproductive system and spermatozoa in *Centris Fabricius*, 1804 (Hymenoptera: Apidae, Centridini). **Micron**, v. 43, p. 695–704.
- Hamon, C.; Chauvin, G., 1992. Ultrastructural analysis of spermatozoa of *Karscheltellus lupulinus* L. (Lepidoptera: Micropterigidae). **J. Insect Morphol. Embryol.**, v. 21, p. 149-160.
- Jamieson, B. G. M., 1987. **The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University. 320p.

- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. Insects: their spermatozoa and phylogeny. Scientific Publishers, Enfield, New Hampshire, USA.
- Kawamura, N.; Yamashiki, N.; Bando, H., 1998. Behavior of mitochondria during eupyrene and apyrene spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera), investigated by fluorescence in situ hybridization and electron microscopy. **Protoplasma**, v. 202, p. 223-231.
- Kubo-Irie, M., Irie, M., Nakazawa, T., Mohri, H., 1998. Morphological changes in eupyrene and apyrene spermatozoa in the reproductive tract of the male butterfly *Atrophaneura alcinous* Klug. *Invertebr. Reprod. Dev.* 34,259-268.
- Lachance, L.E., Olstad, G., 1988. Spermiogenesis of eupyrene sperm in prepupae, pupae, and adults of *H. eliothis virescens* (Lepidoptera: Nocyuidae): an ultrastructural study. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81,292-300.
- Lai-Fook, J., 1982. Structural comparison between eupyrene and apyrene spermiogenesis in *Calpodus ethlius* (Hesperiidae: Lepidoptera). *Can. J. Zool.* 60,1216-1230.
- Leviatan, R.; Friedländer R, M., 1979. The eupyrene-apyrene dichotomous spermatogenesis. I. The relationship with postembryonic development and the role of the decline in juvenile hormone titer toward pupation. **Dev. Biol.**, v. 68, p. 515-524.
- Lino-Neto, J.; Bão, S. N.; Dolder, H., 2000a. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. **Tissue & Cell**, v. 32, n. 4, p. 322-327.
- Lino-Neto, J.; Bão, S. N.; Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Zool. (Stockholm)**, v. 81, p. 205-211.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). **Tissue & Cell**, v. 34, n. 2, p. 124-128.
- Mancini, K., Bão, S.N., Fernandes, A.P., Dolder, H., 2005. Immunocytochemical localization of tubulins in spermatids and spermatozoa of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue & Cell* 37,81-89.

- Mancini, K., Dolder, H., 2001. Ultrastructure of apirene and eupirene spermatozoa from the seminal vesicle of *Eupitoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue & Cell* 33(3),301-308.
- Mancini, K., Dolder, H., 2003. Sperm morphology and arrangement along the male reproductive tract of the butterfly *Eupitoieta hegesia* (Insecta: Lepidoptera). *Invertebr. Reprod. Dev.* 44,107-117.
- Mancini, K., Dolder, H., 2004. Protein detection in spermatids and spermatozoa of the butterfly *Eupitoieta hegesia* (Lepidoptera). *Biocell* 28(3), 299-310.
- Mancini, K., Dolder, H., 2004a. Dichotomic Spermiogenesis in *Eupitoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(1),13-23.
- Mancini, K.; Lino-Neto, J.; Campos, L.A.O.; Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). **Insect. Soc.**, v. 53, p. 333-338.
- Medeiros, M., 1997. **Estudo ultra-estrutural da espermiogênese dicotômica de *Alabama argillacea* Hübner, 1818.** 1997. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.
- Medeiros, M.; Silveira, M., 1996. Ultrastructural study of apyrene spermatozoa of *Alabama argillacea* (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae) with tannic acid containing fixative. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 28, p. 133-140.
- Meves, F., 1903. Ueber oligopyrene und apirene Spermien und über ihre Entsehung, nach Beobachtungen an *Paludina* und *Pygaera*. **Arch. Mikrosk. Anat Entwicklungsmechanik**, v. 61, p. 1-82.
- Moreira, J.; Araújo, V.A.; Bão, S.N.; Lino-Neto, J., 2010. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Micron**, v. 41, p. 187–192.
- Paoli, F.; Dallai, R.; Cristofaro, M., Arnote, S.; Francardi, A.; Roversi, F., 2014a. Morphology of the male reproductive system, sperm ultrastructure and Y - irradiation of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*Oliv. (Coleoptera: Dryophthoridae). **Tissue and Cell** , v. 46, p. 274–285.
- Paoli, F.; Gottardo, M.; Dallai, R.; Roversi, P.F, 2013. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of the egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygasteridae). **Arthropod Structure & Development**, v. 42, p. 297-308.
- Paoli, F.; Roversi, P.F.; Benassai, D.; Squarcini, M.; Mercati, D.; Dallai, R., 2014. The sperm of *Matsucoccus feytaudi* (Insecta, Coccoidea): Can the microtubular bundle

- be considered as a true flagellum? **Arthropod Structure & Development**.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.asd.2014.11.005>
- Phillips, D. M., 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **J. Cell Biol.**, v. 44, p. 243-277.
- Phillips, D. M., 1971. Morphogenesis of the laciniate appendages of lepidopteran spermatozoa. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 34, p. 567-585.
- Riemann, J. G., 1970. Metamorphosis of sperm of the cabbage looper *Trichoplusia ni* during passage from the testes to the female spermatheca. In: BACCETTI, B. (Ed.). **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, p. 321-331.
- Riemann, J.G., 1970. Metamorphosis of sperm of the cabbage looper *Trichoplusia ni* during passage from the testes to the female spermatheca. In: BACCETTI, B. (Ed.). **Comparative spermatology**. Academic Press, New York, pp. 321-331.
- Silva Júnior, M.P., Nicola, M.V., Rossi, M.M., 2008. Broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) na região Centro-Sul: preocupação para os produtores. **Nucleus**, Edição especial, 49-54.
- Sonnenschein, M.; Hauser, C. L., 1990. Presence of only eupyrene spermatozoa in adult males of the genus *Micropteryx* Hubner and its phylogenetic significance. **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, v. 19, p. 269-276.
- Wolf, K. W.; Baumgart, K.; Traut, W., 1987. Cytology of Lepidoptera. II. Fine structure of eupyrene and apirene primary spermatocytes in *Orgyia thyellina*. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 44, p. 57-67.
- Zribi S.; Quilichinib Y.; Tekayaa S.; Marchand B., 2014. Fine structure of the spermatozoon of *Perinereis macropus* (Claparède, 1870) (polychaeta, Nereidae). **Micron**, v. 66, p. 80–86.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support by Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, S.P. and the Electron Microscopy Centre at Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, S.P. Brazil.

Anexo II

New finding: the head capsule salivary gland of black field cricket *Teleogryllus commodus* (Walker) and your possible function

MC PEREIRA^{a*}, PD COOPER.^b, DC SANTOS^a

^a Entomology Laboratory, Department of Morphology, Bioscience Institute, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

^b Evolution Ecology & Genetics Research School of Biology, Gould Wing, ANU - The Australian National University, Canberra, ACT, Australia

*Corresponding author at: Laboratório de Insetos, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu – SP, Brasil. CEP: 18618-970. Tel: + 55 14 38800492; fax: + 55 14 38153744.

E-mail adress: monique@ibb.unesp.br (MC PEREIRA); paul.cooper@anu.edu.au (PD COOPER)

Running title: Possible function of salivary gland in *Teleogryllus commodus*

Abstract

Insect hormones have traditionally been considered to be distributed throughout the body either as a result of haemolymph movement or as neurohormones through the various neurohaemal organs. Two of the major producers of hormones are the corpora cardiac and corpora allata in the head segment, near the oesophagus and below the brain. However, the time for hormones to move through an insect body by haemolymph movement may take as long as 2 hours in insects with a mass > 0.5 g. However energy supply for flight and singing that are typical of some of the larger insects occur on the order of 0.5 h. We describe the presence of a pair of lobes of the thoracic salivary glands in the head that are located surrounding the retrocerebral complex (corpora cardiaca, corpora allata, hypocerebral ganglia) in the cricket, *Teleogryllus commodus* Walker (Orthoptera: Gryllidae). These lobes are present in both genders and in instars with head capsule widths of 0.1 mm. Serotonergic nerves innervate the lobes, similar to thoracic lobes, indicating that secretion may be under nervous control. However, the presence of adipokinetic hormone is found only in the ducts of the glands of these lobes, suggesting that water-soluble hormones may be transported from the head directly to the thorax through the salivary gland duct system. We suggest that these lobes may constitute a new method for the movement of hormones from the head into the rest of the insect body.

Keywords: Adipokinetic hormone; Salivary gland; Serotonin; *Teleogryllus commodus*.

Introduction

The black field cricket *Teleogryllus commodus* Walker (Orthoptera:Gryllidae) is a commonly found cricket in Australia. This insect is considered as one of the major pests of pastures in Western Victoria and also can occasionally reaches plague proportions in pasturage (Browne 1968; Galloway 1976; Christeller *et al.*, 1990; Cooper and Vulcano 1997).

Generally, the salivary glands in insects are localized in the thorax and secrete saliva to start the solubilization of food particles and the insects in general present three different structures of salivary gland: the tubular glands, the alveolar (acinar) glands and the reservoir glands (Ribeiro, 1995). The tubular glands have the cells organized around a central duct which may be lined by cuticle. The most of proteinaceous secretion in this kind of gland is stored in apical vesicles within the cells (Diptera). The second type, known as alveolar glands, have cells organized like grapes around a branching duct structure (Grasshoppers and Ticks) and are composed mainly by three cell types: the zymogenic cells, parietal (peripheral) cells and the cells that line the ducts of the glands. And the third one, the reservoir glands, that have cells organized around a large bladder-like cavity that contains most of the secretory material (Heretoptera) (Beams and King, 1932; Kendall, 1969; Lauverjat, 1972; Ribeiro, 1995).

While studying the function of salivary glands in the black field cricket, it was noticed that one pair of these glands came off the main duct just behind the junction of the head and thorax, with the secondary duct curving back around and entering the head region. The glands connected to the secondary duct were organised on either side of the retrocerebral complex. As most of the glands are present in the thorax, a question arises regarding the need for this ancillary pair of glands within the head. No literature indicates that salivary glands are present in the head of others insects, so the reason for the glands in this species is unclear.

In the *T. commodus* head capsule, there are a pair of organs localized adjacent to the salivary glands, the corpora cardiaca. The corpora cardiaca store and release hormones from neurosecretory cells in the brain to which they are connected by one or two pairs of nerves. This structure serves as neurohemal organ for several different hormones. Moreover, the intrinsic cells can produce and secrete adipokinetic hormone and other peptides (Fabold *et al.*, 2010; Chapman, 2013). The AKH comprise 8-10 amino acids and is involved on stimulation of food digestion (Kodrik *et al.*, 2012; Vinokurov *et al.*,

2014). According to Vinokurov *et al.*, (2014) there are no data about the AKH involvement on SG regulation in insects.

The proposed research examined the ontogenetic pattern of the presence of these glands in cricket using *in situ* gross morphology and histology for understanding if these glands are present within young and sub-adults crickets just as they are present in the adult individuals, and also to describe the cellular features of the gland.

The immunohistochemistry was applied to verify the possible role of head salivary glands. It was used serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) antibody to check the possibility of head salivary glands play the same role as thoracic salivary glands, since serotonin is a neuromodulator involved in the control of salivary gland secretion (Trimmer, 1985; Novak *et al.*, 1995; Ali, 1997; Chapman, 2013).

The adipokinetic hormone antibody was applied to verify if the salivary gland of the head capsule presents AKH and the localization of this substance in the organ to verify if the salivary gland can act as an alternative pathway for delivery of hormones.

Material and Methods

The black field crickets *T. commodus* were bred in the laboratory under reversed light cycle (12 L: 12D) at 27°C.

Checking the presence of salivary gland in *T. commodus* head capsule and gross morphology

It was used forty crickets of different ages classified according with the head capsule measurement. The crickets were separated in four groups: first group from 0,05cm to 0,14cm head capsule; second group from 0,15cm to 0,24cm; third group from 0,25cm to 0,34cm and fourth group from 0,35 to 0,45cm. The cricket's head capsules were measured using Dial Caliper (Mitutoyo).

The glands are difficult to discriminate from surrounding tissue, so methylene blue staining was employed to help visualize the salivary glands. The methylene blue (0,5% in saline) was injected with a syringe into the crickets neck toward the head. Stain was injected until stain flowed back out of the injection site (Kirby *et al.* 1984). The crickets were left at room temperature for thirty minutes for the stain to be distributed within the tissues, then the insects were immobilized by chilling (4°C) for thirty minutes prior to

dissection. The head capsule was dissected and after filled with phosphate buffered saline pH 7.1. The microphotography of salivary glands was done *in situ* by Leica MZ8 with Nikon 4500 – Coolpix mounted on eyepiece with MM adaptor).

Light microscopy

Whole head of *T. commodus* were fixed in Bouin's fixative overnight (<12 hours). Then, the tissues were washed with 70% ethanol to remove the excess of fixative. This process was continued until the yellow colour of the picric acid has disappeared. Next, the tissues were put through a series of ethanol solutions to dehydrate them. After the dehydration process, tissues were embedded in wax. The blocks of waxed tissues were then sectioned using microtome about 7µm thick. The sections were placed on a slide and dried overnight. Sectioned tissues were then stained with H.E. (Hematoxylin Eosin). Tissues were mounted using Depex[®], covered with cover slip and allowed to set overnight. Microphotography was taken using a Leica DM5500B fluorescent microscope.

Measuring lipid and protein in insect haemolymph

For this experiment it was used male and female adults of black field crickets. The insects were immobilized by chilling (4°C) for thirty minutes prior to collection. It was done a hole on insect body to take 5µl of haemolymph and then, the haemolymph was mixed with 50µl PBS inside an Eppendorf. So the mixture was put on Vortex per 3 minutes and then it was took 2µl of each sample to do measuring through spectrometer (Direct Detect Spectrometer - Merck Millipore). This procedure was used to check in which moment after feeding there are more possibility in label AKH (Adipokinetic hormone) in *T. commodus*. The measurements were done after one, two and three hours after feeding.

Immunohistochemistry whole mounts

In this processing, only adult males were used. The head capsules of crickets were dissected, the salivary gland and corpora cardiaca were removed from head capsule and fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for thirty minutes. So, it was washed out paraformaldehyde with PBS two times of five minutes each. Then the tissue was made permeable by incubating in methanol (five minutes in 70% MeOH in PBS, sixty minutes 100% MeOH, five minutes in 70% MeOH in PBS and two washes

of five minutes in PBS to rinse out MeOH. The samples were washed two times of five minutes in PBT (phosphate buffered saline with 0.2% BSA and 0.1% Triton X-100). Incubated to thirty minutes in 100 µL PBT+N (normal goat serum) and then incubated with first antibody (rabbit anti-serotonin (Incstar/Abcam) diluted in PBT+N (1:1000); rabbit anti-(Tyr¹)-Adipokinetic Hormone (Locusta migratoria)) diluted in PBT+N (1:1000) at least overnight at 4°C. Washed three times of five minutes in PBT and then washed two times of forty-five minutes in PBT. Incubated thirty minutes in 100µl of PBT+N. So incubated overnight 100 µl of second antibody (Dylight™ 549 – conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) dilution 1:300 in PBT + N. Then washed three times of five minutes in PBT, washed four times of thirty minutes in PBT and washed three times of five minutes in PBS. Mounted tissue on slide in 70% Glycerol in PBS. Microphotography was taken using a Leica DM5500B fluorescent microscope. To the corpora cardiaca was done a control sample that went through all the processing steps least by incubation with first antibody.

Demonstration of head capsule salivary gland circulation

To test the hypothesis that head capsule salivary gland of *T. commodus* may be involved on hormone delivery it was done *in situ* demonstration with black field cricket. The head, thorax and abdomen of adult cricket was dissected and immobilized by pins to be able to be observed. The SG of head capsule was surrounded using white petroleum jelly (Vaseline) and the cricket's heart was damaged to not interfere on the haemolymph circulation. Using a syringe with a tiny needle, some small drops of methylene blue staining (0,5% in saline) were set on SG surrounded and then, observed by Leica MZ8. The microphotography was done by Nikon Shuttlex P-400Rv Digital Microscope (PMX-HEAD).

Results

The presence of a pair of salivary glands lobes (SG) in the head capsule of *T. Commodus*, located surrounding the retrocerebral complex (corpora cardiaca, corpora allata and hypocerebral ganglia), was confirmed in all crickets of both genders and in instars with head capsule widths of 0.1 mm used in this research (**Figure 1**).

The SG in black field cricket is composed by a pair of alveolar lobes organized as grapes around a duct. Each lobe of SG is composed by zymogenic cell, parietal cell, and

excretory duct. Adjacent to the SG is situated the corpora cardiaca that contain intrinsic secretory cells (Chapman, 2013). The cell and tissue feature of CC is similar to the SG (**Figure 2A, 2B, 3A, 3B, 3C**).

How was showed above, there is a pair of salivary gland in *T. commodus* head, so a question arose regarding the role of this structure in the head, once the black field cricket has salivary gland in the thoracic region. The serotonin is important neuromodulator acting in the salivary gland control and in a previous research was confirmed its presence in thoracic salivary gland. So the hypothesis was if the head salivary gland also has serotonin as thoracic glands and the answer was positive. The head salivary gland has serotonin randomly spread in the cytoplasm of cells that composes the SG and also this neuromodulator are present in the gland nerves (**Figure 4A, 4B, 4C, 5A**).

The antibody to adipokinetic hormone is apparent present in the corpora cardiaca. The CC control sample didn't present labelling to AKH when analysed in the same light intensity of CC sample labelled to AKH, so it make sure that the results obtained didn't have nonspecific labelling in the others samples. The AKH was labelled on external surface of the ducts in SG. How the AKH was labelled just on duct surface, this data show that maybe there are an specific membrane receptor linked to AKH that carry this substance to the inner duct region, then this fact allows us to think of the hypothesis that SG can act as alternative pathway to the hormone delivery (**Figure 5B, 5C, 6A, 6B, 6C**).

The measurement of lipid in haemolymph of black field cricket showed that there is not a proper time to do the labelled of AKH. The rate of lipid had different behaviour in each individual after feeding. But the comparison between lipid and protein in the same individuals and time after feeding, showed that both of them rate present similar compartment (**Figure 8A, 8B, 9A, 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A, 12C, 13A, 13B**).

The methylene blue staining was dropped into the Vaseline surrounded in the salivary gland of head capsule. After a short time, the staining was absorbed by the SG and this structure became gradually lightly blue. The gradually lightly blue colour means that the blue staining was going from the SG to the main duct of SG that after approximately thirty minutes became dark blue. The main duct of head capsule SG is connected to the thoracic salivary gland, so consequently, this organ also became blue (**Figure 9A, 9B, 9C**).

Figures

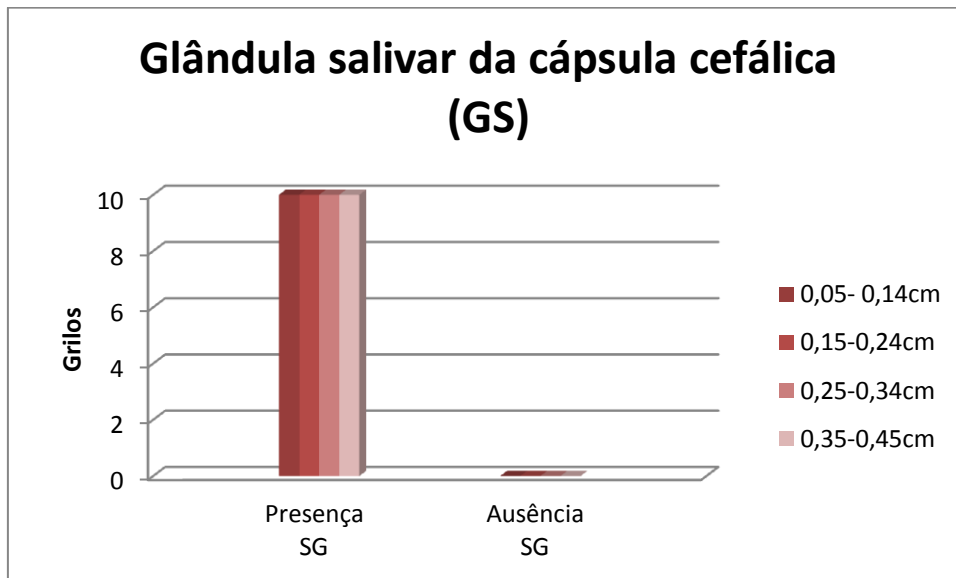


Figure 1. The presence of salivary glands (SG) in the head of *T. commodus*.

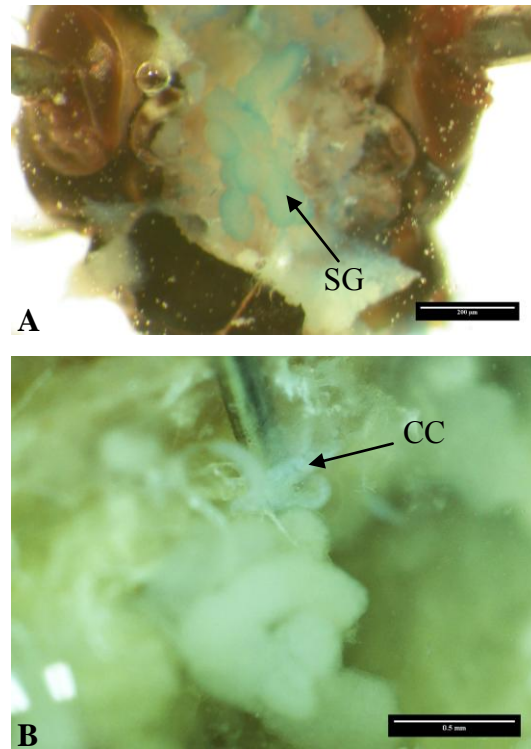


Figure 2. Head capsule gross morphology of black field cricket *T. commodus* with methylene blue staining. (A) *In situ* salivary gland (SG); scale bar 200µm. (B) *In situ* corpora cardiaca (CC); scale bar 0.5mm.

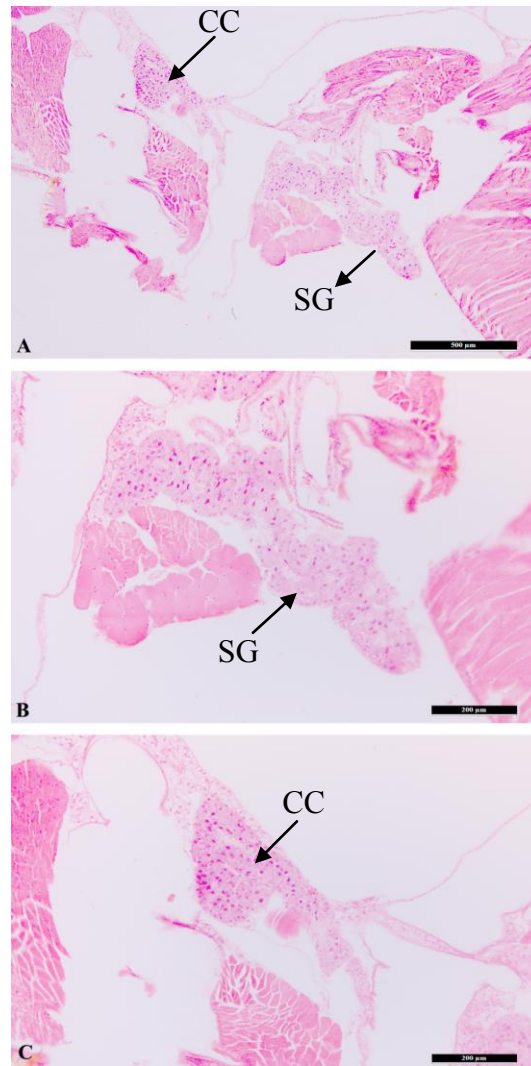


Figure 3. Transverse section of *T. commodus* head capsule with H.E. staining. (A) Salivary gland (SG) and corpora cardiaca (CC); scale bar 500µm. (B) Salivary gland; scale bar 200µm. (C) Corpora cardiaca; scale bar 200µm.

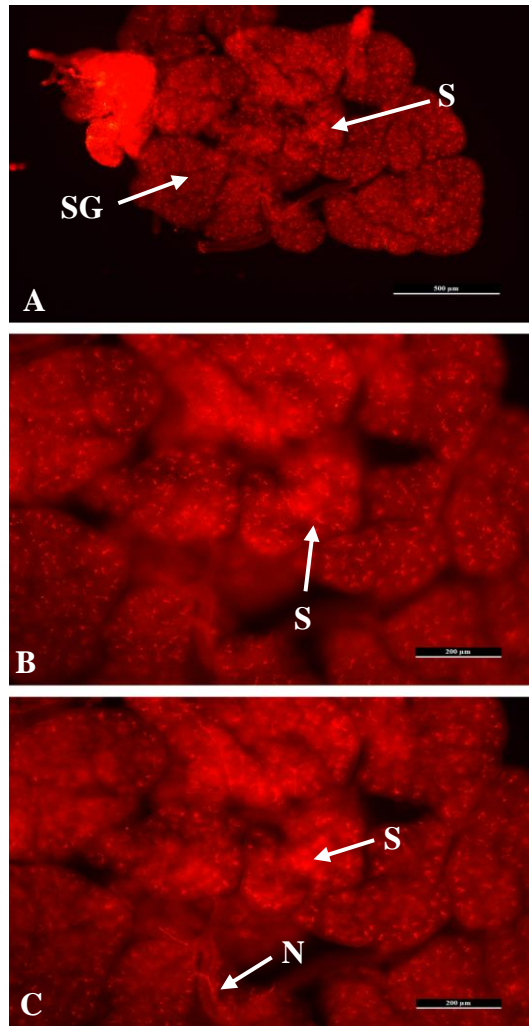


Figure 4. Serotonin immunofluorescence on the whole mounts salivary glands of *T. commodus*. **(A)** Salivary gland (SG) and serotonin (S); scale bar 500µm. **(B)** Serotonin in salivary gland; scale bar 200µm. **(C)** Serotonin and nerve (N); scale bar 200µm.

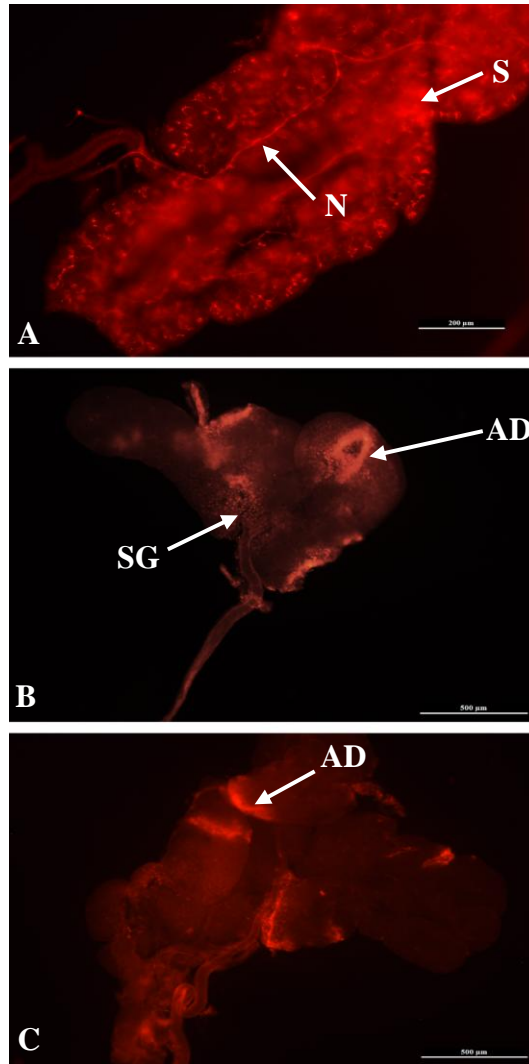


Figure 5. Serotonin and Adipokinetic hormone immunofluorescence on the whole mounts salivary glands of *T. commodus*. (A) Serotonin (S) and nerve (N); scale bar 200µm. (B) Salivary gland (SG) and adipokinetic hormone in the duct (AD); scale bar 500µm. (C) Adipokinetic hormone in the duct; scale bar 500µm.

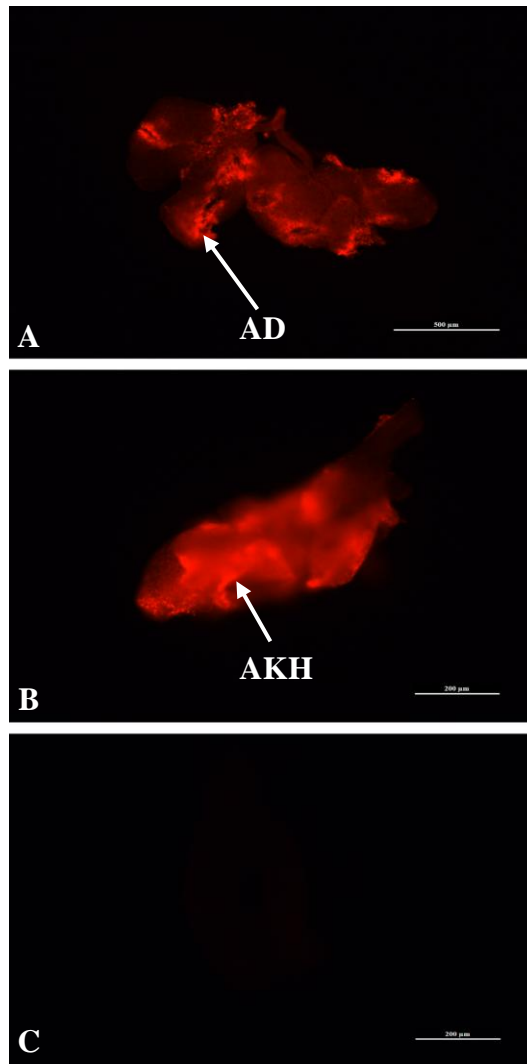


Figure 6. (A) Adipokinetic hormone immunofluorescence on the whole mounts salivary glands of *T. commodus*. Adipokinetic hormone in the duct (AD); scale bar 500µm. (B) Adipokinetic hormone (AKH) immunofluorescence on the whole mounts corpora cardiaca of *T. commodus*; scale bar 200µm. (C) Control sample of adipokinetic hormone immunofluorescence on the whole mounts corpora cardiaca of *T. commodus*; scale bar 200µm.

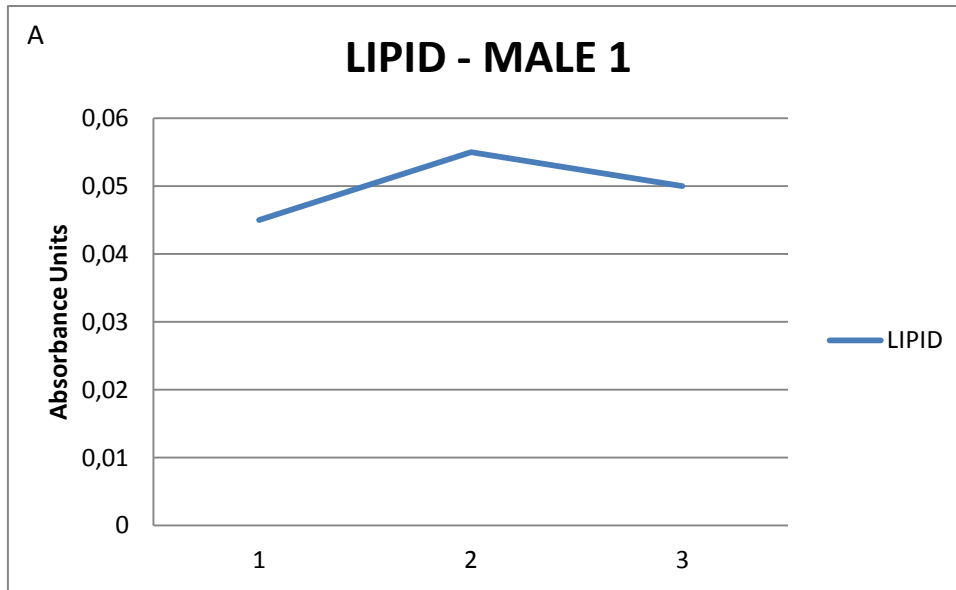


Figure 7. (A) Lipid rate in the haemolymph of *T. commodus* male after one, two and three hours of feeding. (B) Protein rate in the haemolymph of *T. commodus* male after one, two and three hours of feeding.

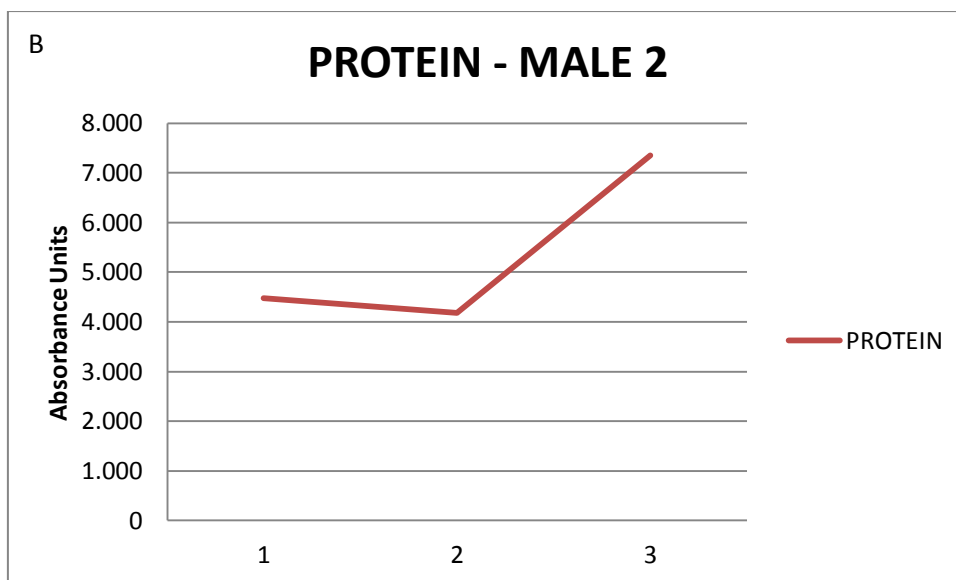
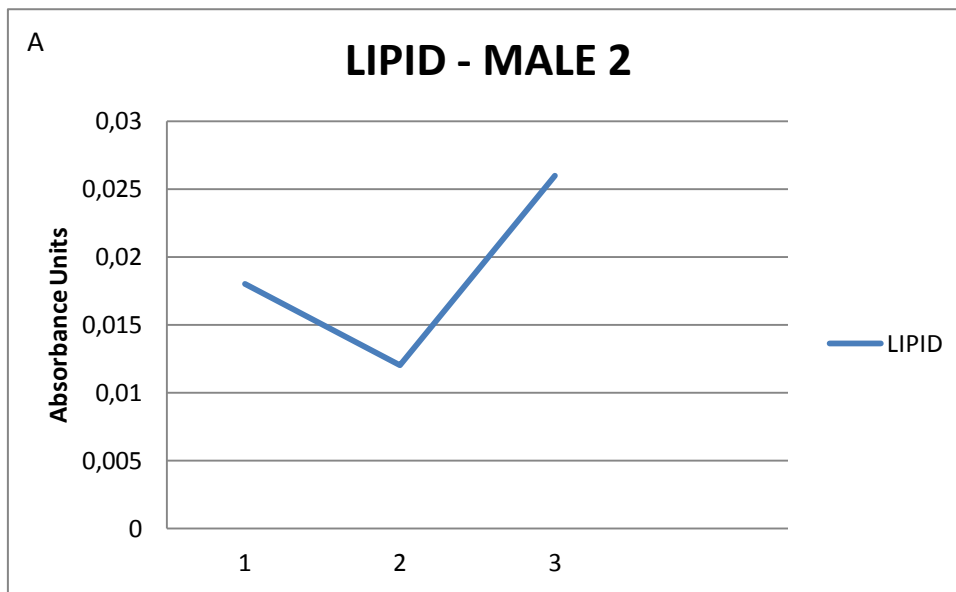


Figure 8. (A) Lipid rate in the haemolymph of *T. commodus* male after one, two and three hours of feeding. (B) Protein rate in the haemolymph of *T. commodus* male after one, two and three hours of feeding.

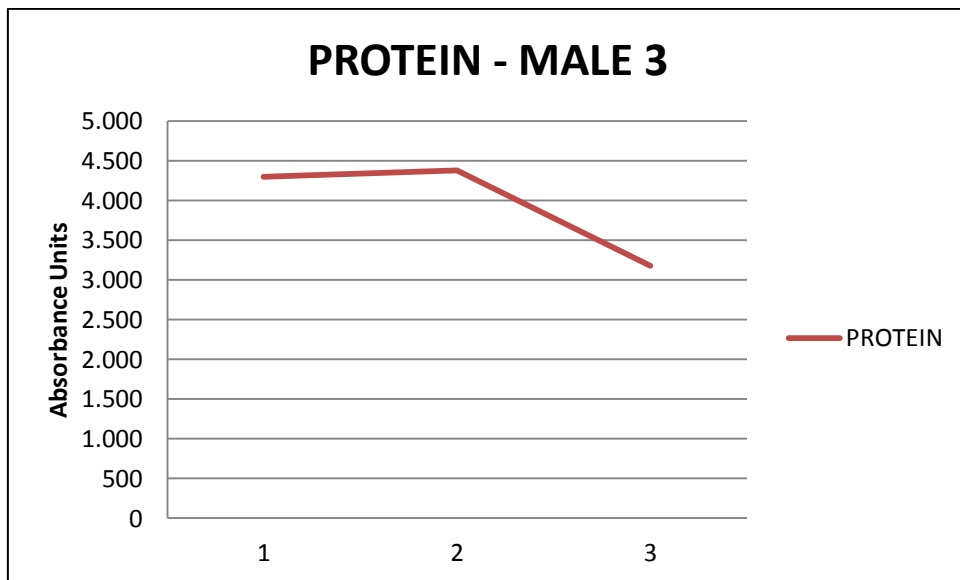
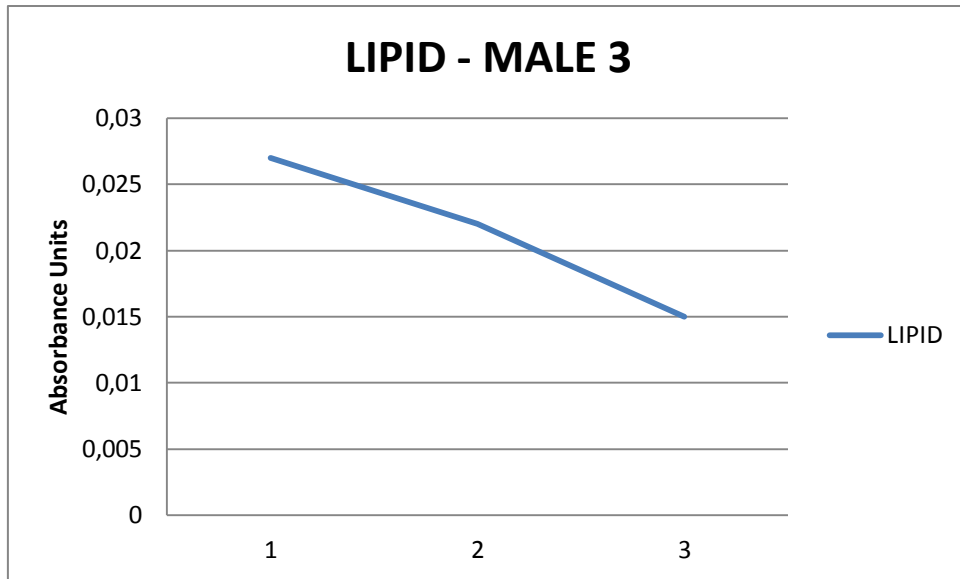


Figure 9. (A) Lipid rate in the haemolymph of *T. commodus* male after one, two and three hours of feeding. (B) Protein rate in the haemolymph of *T. commodus* male after one, two and three hours of feeding.

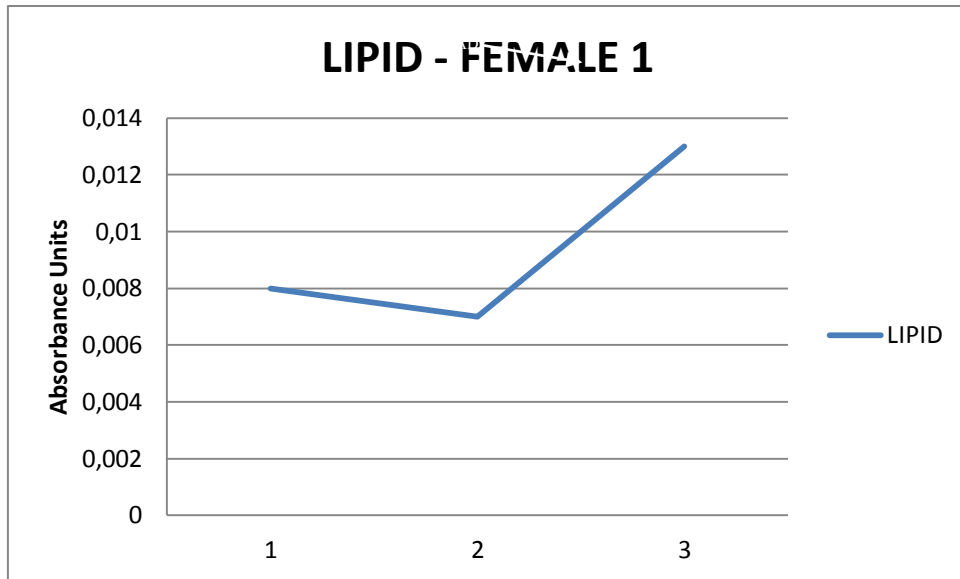


Figure 10. (A) Lipid rate in the haemolymph of *T. commodus* female after one, two and three hours of feeding. (B) Protein rate in the haemolymph of *T. commodus* female after one, two and three hours of feeding.

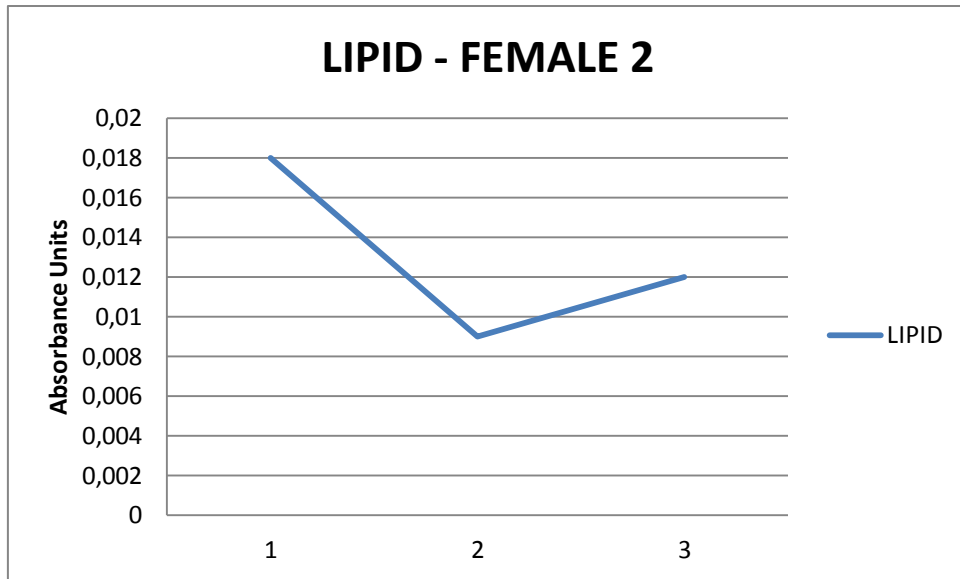


Figure 11. (A) Lipid rate in the haemolymph of *T. commodus* female after one, two and three hours of feeding. (B) Protein rate in the haemolymph of *T. commodus* female after one, two and three hours of feeding.

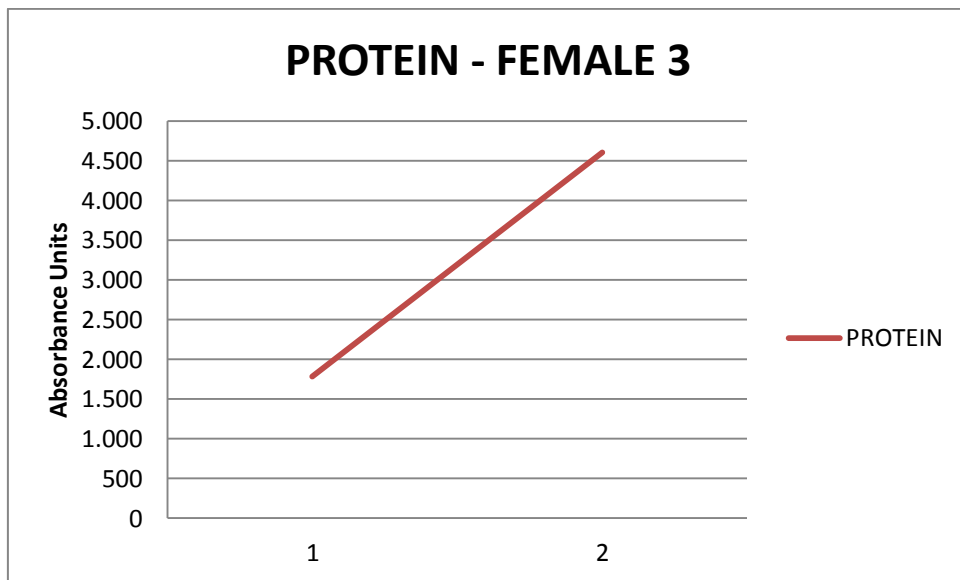
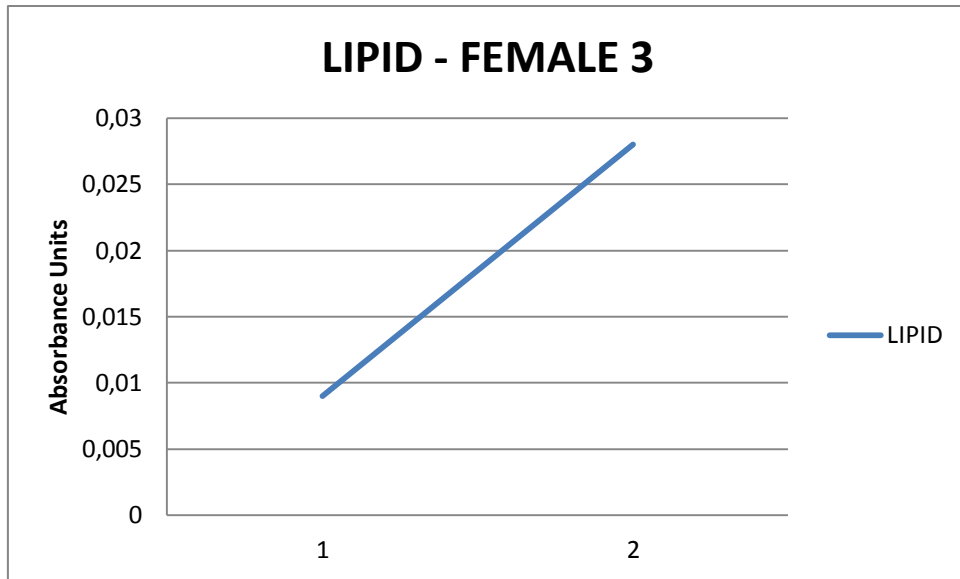


Figure 12. (A) Lipid rate in the haemolymph of *T. commodus* female after one and two hours of feeding. (B) Protein rate in the haemolymph of *T. commodus* female after one, two and three hours of feeding.

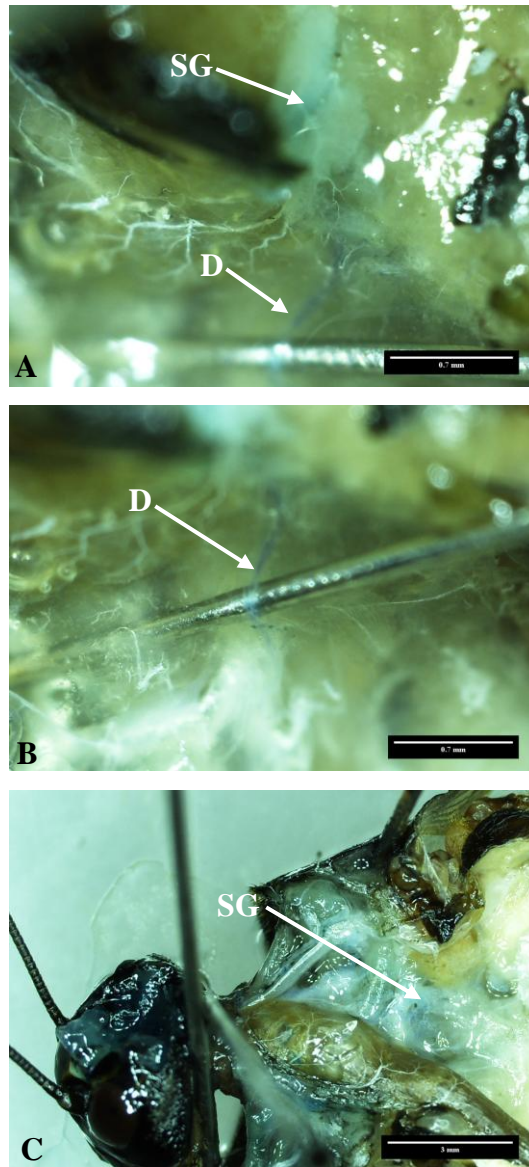


Figure 13. (A) Gross morphology of head capsule salivary gland (SG) and duct (D) of the black field cricket *T. commodus in situ* with methylene blue staining; scale bar 0.7mm. (B) Gross morphology of salivary gland of the black field cricket *T. commodus in situ* with methylene blue staining showing the duct; scale bar 0.7mm. (C) Gross morphology of thoracic salivary gland of the black field cricket *T. commodus in situ* with methylene blue staining; scale bar 3mm.

Discussion and Conclusion

The data found allows to conclude that the presence of SG in head capsule of *T. commodus* have no relationship with the crickets gender, size or instar. There are no reports about the presence of salivary gland in insects head or even in cricket head capsule, so these data bring a new finding about crickets and consequently a new object of study. The acinar salivary glands grape-like structure are present in the thorax of cockroaches and locusts (Ali, 1997; Baumann et al., 2002; Walz *et al.*, 2006) as are present in *T. commodus* head capsule.

Serotonin is a neuromodulator that act in the regulation of a diversity of animal behaviors (Okusawa et al., 2014). According to French *et al.* (2014), in insects, the serotonin plays the role of neurotransmitter and systemic hormone, and also, the act in the control of salivary gland secretion (Trimmer, 1985; Novak et al., 1995; Ali, 1997; Chapman, 2013).

Ali (1997) reported that dopamine and serotonin seem to be the most amines that stand out associated with insect salivary glands in locust and cricket among other insects. The amines function appears to be involved on control of salivary gland secretion that is related with food lubrication and digestion (Ali, 1997).

According to Miggiani *et al.* (1999) the serotonin was labeled by immunohistochemistry in some tissues including salivary glands like happened in *T. commodus* head capsule salivary gland. This fact is an indicator that head salivary gland can maybe play the same role like thoracic salivary gland, once, as mentioned above, the serotonin act on control of salivary gland secretion (Chapmann, 2013).

Serotonergic nerves innervate the salivary glands lobes similar to thoracic lobes, indicating that secretion may be under nervous control. Helle *et al.* (1995) affirm that serotonergic neurohaemal system is associated with the salivary glands of the cricket and Ali (1997) reported that several studies with insects showed salivary glands innervating by serotonergic efferent neurones, like in *Locusta Migratoria*. Baumann *et al.* (2002) mentioned that serotonergic and dopaminergic innervation from the subesophageal ganglion and the stomatogastric nervous system are the mains responsible to the salivation control. However, it is necessary more studies to affirm the function of serotonin in *T. commodus* head capsule salivary glands.

The presence of AKH in *T. Commodus* corpora cardiaca allowed confirming the report of Chapman (2013), that corpora cardiaca is involved on AKH secretion.

However, the AKH presence only in the ducts of salivary glands may suggest that water-soluble hormones may be transported from the head directly to the thorax through the salivary gland duct system. The data found suggest that the head capsule salivary gland may a new method for delivery of hormones from the head into the rest of the insect body, and the experiment done with methylene blue staining in *T. Commodus* showed that this new method for delivery of hormones may be correct.

References

- Ali, D.W., 1997. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *Journal of Experimental Biology* 200, 1941-1949.
- Baumann, O., Dames, P., Kühnel, D., Walz, B. (2002). Distribution of serotonergic and dopaminergic nerve fibers in the salivary gland complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *BMC Physiology* 2:9 doi:10.1186/1472-6793-2-9.
- Beams, H. W. and R. I. King (1932). "The architecture of parietal cells of the salivary glands of the grasshopper, with special reference to the intracellular canaliculi, golgi bodies and mitochondria." *Journal of Morphology* 53,223-239.
- Browne, F.G. (1968). *Pests and diseases of forest plantation trees*. Oxford, Clarendon Press.
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: structure and function*. United Kingdom, Cambridge University Press, 132-145.
- Christeller, J. T., Laing, W. A., Shaw, B. D., Burgess, E. P. J. (1990). Characterization and partial purification of the digestive proteases of the black field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker): elastase is a major component. *Insect Biochem.* Vol. 20, No. 2, pp. 157-164.
- Cooper, P. D. and Vulcano, R. (1997). Regulation of pH in the digestive system of the cricket, *Teleogryllus commodus* Walker. *Journal of Insect Physiology* 43(5), 495-499.
- Fabold, K.; El-Damanhoury, H. I. H.; Lorenz, M. W. (2010). Age-dependent cyclic locomotor activity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, and the effect of adipokinetic hormone on locomotion and excitability. *J Comp Physiol A* 196,271–283.
- French, A. S., Simcock, K. L., Rolke, D., Gartside, S. E., Blenau, W., Wright, G. A. (2014). The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. *Journal of Insect Physiology* 61, 8–15.

- Galloway, I. D. (1976). Identifying insects: grasshoppers, locusts and crickets (order Orthoptera). Advisory Leaflet No. 1354, Queensland Dept. of Primary Industries.
- Kendall, M. D. (1969). "Fine structure of salivary gland of desert locust *Schistocerca gregaria* Forskal." *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 98(3),399-&.
- Kodrik, D., Vinokurov, K., Tomcala, A., Socha, R. (2012). The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology* 58,194-204.
- Lauverjat, S. (1972). "Rule des cellules zymogenes dans les secretions salivaires de *Locusta migratoria* (Orthoptere, acridoidea)." *Tissue and Cell* 4(2), 301-309.
- Miggiani, L., Orchard, I. (1999). The distribution and function of serotonin in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* A comparative study with the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 45,1029-1036.
- Novak, M.G., Ribeiro, J.M., Hildebrand, J.G., 1995. 5-Hydroxytryptamine in the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* and its role in regulation of salivation. *Journal of Experimental Biology* 198,167-174.
- Ribeiro, J M. C. (1995). Insect saliva: Function, biochemistry and physiology. Regulatory mechanisms in insect feeding. R. F. Chapman and G. d. Boer. U.S.A, Chapman & Hall.
- Trimmer, B.A., 1985. Serotonin and the control of salivation in the blowfly *Calliphora*. *Journal of Experimental Biology* 114, 307-328.
- Vinokurov, K., Bednarova, A., Tomcala, A., Staskova, T., Krishnan, N., Kodrik, D. (2014). Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: The fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. *Journal of Insect Physiology* 60,58-67.
- Walz, B., Baumann, O., Krach, C., Baumann, A., Blenau, W. (2006). The aminergic control of cockroach salivary glands. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 62,141-152.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Australian National

University, Canberra, Australia and the Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, S.P., Brazil.