

MONIQUE CAMPOS PEREIRA

**Morfologia do testículo e espermatogênese em
Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae):
estudo citoquímico e ultraestrutural.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Zoologia.

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

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Pereira, Monique Campos.

Morfologia do testículo e espermatogênese em *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera: Crambidae): estudo citoquímico e ultraestrutural / Monique
Campos Pereira. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Daniela Carvalho dos Santos

Capes: 20600003

1. Broca-da-cana-de-açúcar. 2. Espermatogênese. 3. Testículos.

Palavras-chave: Apirene; *Diatraea saccharalis*; Espermatogênese; Eupirene;
Inseto; Lepidoptera; Testículo.

Dedico este trabalho principalmente aos grandes amores da minha vida: meus pais, Sebastião e Maura, e meus irmãos, Rafael e Evelyn. Estes são os principais responsáveis pela realização deste sonho. Obrigada pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado me apoiando. Vocês são tudo para mim.

Dedico este trabalho a minha grande amiga e orientadora Daniela por me acolher e me ensinar com tanto amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

- *Primeiramente a Deus, porque foi ele quem me guiou até aqui.*
- *A minha orientadora Daniela Carvalho dos Santos pela realização deste projeto e por acreditar em mim.*
- *A minha professora e amiga de graduação Eliani Rodrigues pela força e confiança.*
- *A UNESP pela oportunidade.*
- *Aos amigos do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, Claudete, Lígia, Maria Helena e Thiago pelo processamento do material e por me ajudarem sempre.*
- *Aos amigos Ana Silvia, Elton, Mariana, Rinaldo e Vivian pelo apoio.*
- *A usina de Barra Grande, Lençóis Paulista, SP, pelo fornecimento do material utilizado neste trabalho.*
- *Ao CNPQ, pelo financiamento deste projeto de pesquisa, Proc. 136153/2009-7.*
- *Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu.*
- *Ao funcionário Vicente e ao amigo Rinaldo pela ajuda no processamento do material para a microscopia de luz.*
- *Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e ao programa de Pós-Graduação em Zoologia.*
- *A minha família querida, por me incentivar sempre para que eu possa alcançar meus objetivos.*

***Obrigada a todos vocês que de alguma forma contribuíram
para a realização deste trabalho.***

Senhor,

Tu és o bom Pastor.

Eu sou a Tua ovelha.

Em alguns dias estou sujo;

Em outros, estou doente.

Em alguns dias, me escondo;

Em outros, me revelo.

Sou uma ovelha ora mansa, ora agitada.

Sou uma ovelha ora perdida, ora reconhecida.

Eu sou Tua ovelha, Senhor.

Eu conheço a tua voz. É que às vezes a surdez toma conta de mim.

Eu sou Tua ovelha, Senhor.

Não permitas que eu me perca, que eu me desvie do Teu rebanho.

Mas se eu me perder, eu Te peço, Senhor,

Vem me encontrar.

Amém.

Ágape. Padre Marcelo Rossi.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	06
	ABSTRACT.....	08
1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	<i>Diatraea saccharalis</i>	11
1.2	Espermatogênese em insetos.....	13
1.3	Espermatogênese dicotômica em Lepidoptera.....	14
1.4	Revisão de Literatura.....	16
2.	OBJETIVOS.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Obtenção dos Insetos.....	24
3.2	Coleta dos testículos.....	24
3.3	Preparação dos testículos para a análise histológica em cortes convencionais.....	24
3.4	Análise morfológica dos testículos em microscopia eletrônica de transmissão.....	26
4.	RESULTADOS.....	27
4.1	Histologia do testículo de larva de <i>Diatraea saccharalis</i>	28
4.2	Histologia do testículo de adulto de <i>Diatraea saccharalis</i>	29
4.3	Ultraestrutura do testículo e espermatogênese em <i>Diatraea saccharalis</i> ..	29
4.3.1	Espermatogônia.....	30
4.3.2	Espermatócito.....	30
4.3.3	Espermátide apirene.....	31
4.3.4	Espermatozóide apirene.....	33
4.3.5	Espermátide eupirene.....	34
4.3.6	Espermatozóide eupirene.....	35
4.3.7	Derivados mitocondriais.....	36
5.	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	38
6.	DISCUSSÃO.....	66
7.	CONCLUSÃO.....	73
8.	REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

PEREIRA, M. C. Morfologia do testículo e espermatogênese em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): estudo citoquímico e ultraestrutural. Botucatu, 2011. 82 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Diatraea saccharalis possui uma grande importância econômica e é considerada uma das pragas que mais afeta da cultura canavieira. Em Lepidoptera, o polimorfismo espermático está presente e envolve a produção de espermatozoides apirenes (anucleados) e eupirenes (nucleados), os quais são morfologicamente e funcionalmente diferentes. Este estudo teve como objetivo descrever o processo da espermatogênese envolvido no polimorfismo espermático. Testículos de larvas de último instar e de adultos de *D. saccharalis* foram processados convencionalmente para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. As análises permitiram a identificação de um par de testículos com formato riniforme, limitado externamente por uma túnica celular, em larvas. Cada testículo possui quatro folículos que estão divididos através de septos de túnica interna. Em adultos há somente um único testículo, fundido e esférico dividido em oito folículos e constituído principalmente por feixes de espermatozoides. Os cistos de espermatogônias e espermatócitos estão localizados na região apical do folículo, e os cistos de espermatídes e espermatozoides estão localizados na região basal do folículo. Dentro dos cistos, as células da linhagem germinativa se desenvolvem sincronicamente e contém somente espermatozoides apirenes ou eupirenes, nunca contém ambos. A extremidade anterior do espermatozoide apirene consiste em um capuz denso ao invés de núcleo. O espermatozoide eupirene possui um núcleo e acrossoma. Ambos os tipos de espermatozoides apresentam um axonema com padrão microtubular do tipo “9+9+2” e dois derivados mitocondriais na região do flagelo. Somente células eupirenes apresentaram apêndices laciniados e reticulares prorrogados a partir da membrana plasmática. O processo da espermatogênese é similar ao encontrado em outros insetos da ordem Lepidoptera.

Palavras-chave: Apirene; *Diatraea saccharalis*; Espermatogênese; Eupirene; Inseto; Lepidoptera; Testículo.

ABSTRACT

PEREIRA, M. C. Morfologia do testículo e espermatogênese em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): estudo citoquímico e ultraestrutural. Botucatu, 2011. 82 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Diatraea saccharalis has a great economic importance and is considered the most destructive pest attacking sugarcane culture. In Lepidoptera, the sperm polymorphism is present and involves the production of apyrene (enucleate) and eupyrene (nucleate) spermatozoa, which are morphologically and functionally different. This investigation aimed to describe the spermatogenesis process involved in this sperm polymorphism. The testis from last larval instar and from adults of *D. saccharalis* was processed conventionally for light and transmission electron microscopy. The analysis allowed the identification of paired testis, with kidney-shaped, limited externally by tunica cells, in larvae. Each testis contains four follicles that are divided by internal tunica septa. In adult there is only a single, fused and spherical testis that is divided into eight follicles mainly constituted by spermatozoa bundles. The spermatogonia and spermatocyte cysts are located at the apical region and the spermatids and spermatozoa cysts are located at the basal region of the follicle. Within the cysts, sperm cells developed synchronously and contained either apyrene or eupyrene spermatozoa, never both. The anterior end of apyrene consisted of an electron dense cap instead of the nucleus. The eupyrene contained a nucleus and acrosome. Both sperm types present a 9+9+2 axoneme and two mitochondrial derivatives in the tail region. Only eupyrene cells showed laciniate and reticular appendages extended from the plasma membrane. The process of spermatogenesis is similar to that found in other insects of the order Lepidoptera.

Keywords: Apyrene; *Diatraea saccharalis*; Spermatogenesis; Eupyrene; Insect; Lepidoptera; Testis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Diatraea saccharalis*

A ordem Lepidoptera é um dos grupos mais estudados da Classe insecta. Apresenta mais de 200.000 espécies, sendo considerada a terceira maior ordem de insetos, incluindo dois grupos distintos: as mariposas e as borboletas. As mariposas possuem hábito noturno e vários de seus representantes são considerados pragas na agricultura (Brown & Freitas, 1999).

Diatraea saccharalis Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae) é um dos insetos que mais afeta a produtividade agrícola e industrial da cana-de-açúcar; suas larvas são conhecidas popularmente como broca da cana-de-açúcar, ou simplesmente como broca da cana, por causa dos orifícios que perfuram no vegetal, onde se alojam até o início da fase adulta. A broca da cana ocorre em todo o hemisfério oeste, onde a cana-de-açúcar é cultivada, além de atacar também outras gramíneas, como o milho, o sorgo, o arroz e algumas espécies de capim (Parra, *et al.*, 2002; Pinto 2006).

Em seu desenvolvimento, holometabólico, a *D. saccharalis* passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Parra *et al.*, 2002). A fêmea atrai o macho para a cópula pela liberação de feromônio e, após o acasalamento, deposita massas de ovos, na face dorsal das folhas da cana, que se assemelham a escamas de peixe. O número de ovos varia de cinco a cinquenta por postura e no início do desenvolvimento, possuem coloração amarelo-pálida passando a rósea até chegar a uma coloração marrom-escuro, quando as cápsulas cefálicas dos embriões tornam-se visíveis no interior dos ovos. O período de incubação varia de quatro a nove dias, dependendo das condições climáticas, especialmente da temperatura (Parra *et al.*, 2002; Pinto, 2006; Pinto *et al.*, 2006 a, b; Volpe, 2009).

As larvas passam por cinco instares: no primeiro instar, alimentam-se inicialmente do parênquima das folhas e/ou bainha do vegetal. No segundo e terceiro instar, penetram pela parte mole do colmo, alimentando-se dos tecidos da cana e abrindo extensas galerias até a fase de pupa. O último instar pode ser muito demorado no inverno, uma vez que as condições climáticas se tornam desfavoráveis e a diapausa (número de horas de luz) diminui. As larvas permanecem no interior da cana até atingirem seu completo desenvolvimento. Nesta fase, as lagartas medem cerca de 22 a 25 mm de comprimento, possuem coloração amarelo-pálida e cabeça marrom. Ao final do desenvolvimento larval, estas fecham os orifícios externos com fios de seda e restos de alimentação, ficando no interior das galerias até se transformarem em

pupas, as quais são caracterizadas por coloração castanha. A fase pupal, dura de seis a quatorze dias e após a emergência, os adultos saem do interior das galerias, sobrevoando as plantações e reproduzindo-se. O adulto é uma mariposa de coloração amarelo-palha com desenhos pardecintos, asas posteriores esbranquiçadas com 25 mm de envergadura. A fêmea possui tamanho maior do que o macho e é caracterizada por abdome mais volumoso e asas menos pigmentadas. A duração do ciclo biológico de *D. saccharalis* no campo varia de quarenta e cinco a sessenta dias devido às influências climáticas e fonte de alimento. A longevidade dos adultos é de dois a nove dias (Parra *et al.*, 2002; Pinto, 2006; Pinto *et al.*, 2006 a, b; Volpe, 2009).

Quando a infestação ocorre na cana-de-açúcar nova, as larvas causam a morte da gema apical e a consequente secagem dos ponteiros, sintoma conhecido como “coração morto”. Ao atacarem as canas adultas, além de provocarem o dano citado, dão origem à chamada “podridão vermelha” ou “complexo broca-podridão”, resultante da penetração de fungos que proliferam nas galerias abertas nos colmos. Outros estragos decorrentes do desenvolvimento da broca da cana são: brotamento lateral, perda de peso da cana, enfraquecimento dos colmos com consequente aumento do número de canas quebradas, enraizamento aéreo e entrenós atrofiados (Parra *et al.*, 2002; Pinto, 2006; Pinto *et al.*, 2006 a, b).

Os prejuízos para a agricultura incluem a diminuição do rendimento da produção agrícola propriamente dita, e o aproveitamento industrial do vegetal. Tais prejuízos são divididos em diretos e indiretos. Os diretos são causados pela alimentação da larva e os indiretos são causados por microorganismos que se aproveitam das galerias abertas pelas larvas para invadirem o entrenó. Dentre os principais prejuízos industriais podemos destacar a diminuição da pureza do caldo e os problemas de contaminação no processo de fermentação alcoólica nas indústrias de açúcar e álcool (Parra *et al.*, 2002; Pinto, 2006; Pinto *et al.*, 2006 a, b).

Embora existam grandes laboratórios direcionados à criação de *D. saccharalis*, poucos estudos visam o conhecimento detalhado da morfologia interna deste inseto, nas diferentes fases de desenvolvimento (Moraes, 1983; Conte, 1985, 1994; Bombonato, 1994; Falleiros, 1995; Bombonato & Gregório, 1995; Falleiros & Gregório, 1995; Bombonato & Gregório, 1996; Santos, 1997).

A magnitude dos prejuízos ocasionados pela *D. saccharalis* à cultura canavieira tem impulsionado o desenvolvimento de diferentes abordagens para o controle desta praga. Neste sentido, o conhecimento da morfologia interna do aparelho reprodutor masculino da

broca da cana é de extrema importância para fundamentar as pesquisas científicas básicas relacionadas à reprodução nos insetos e também as pesquisas aplicadas, que visam o aperfeiçoamento de mecanismos de controle biológico desta ameaça para a cultura da cana-de-açúcar.

1.2 Espermatogênese em insetos

A espermatogênese compreende todo o processo de multiplicação, desenvolvimento e maturação das células espermatogênicas, até a formação dos espermatozóides ou gametas masculinos haplóides (Medeiros, 1997).

Os espermatozóides são células altamente especializadas que passaram por uma evolução morfológica, sendo 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).

Nos insetos, o aparelho reprodutor masculino é formado por um par de testículos, um par de ductos espermáticos (laterais) e um ducto ejaculatório que se comunica com um pênis ventral associado ao oitavo segmento abdominal. Também possui um par de glândulas acessórias e um par de vesículas seminais. Cada testículo é formado por folículos que variam em organização e número dependendo da espécie. Dentro de cada folículo as células germinativas estão organizadas em cistos, onde ocorre a espermatogênese (Phillips, 1970; Wigglesworth, 1984; Gullan, 2007; Ruppert, *et al.*, 2005).

A maturação dos cistos ocorre no sentido apical-basal (Szöllösi, 1982). No interior dos cistos, as células espermáticas se desenvolvem geralmente de modo sincrônico (Phillips, 1970; Baccetti, 1972). Na maioria dos insetos da ordem Lepidoptera, as células germinativas passam por 6 mitoses sucessivas, produzindo 64 espermatócitos primários, os quais entram em meiose, dando origem a 256 espermátides, que é um número 2^n , sendo “n” igual ao número de divisões celulares (Phillips, 1970; Lai-Fook, 1982; Garvey *et al.*, 2000).

As espermátides se desenvolverão em 256 espermatozóides após passarem pelo período de maturação pós-meiótica, conhecido genericamente como espermiogênese, o qual corresponde ao período da espermatogênese em que ocorrem profundas alterações morfo-

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).

1.3 Espermatogênese dicotômica em Lepidoptera

A produção polimórfica de espermatozóides pode ser observada em vários grupos de invertebrados (Jamieson, 1987; Friedländer, 1997; França; Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004). O primeiro sistema de classificação de espermatozóides em invertebrados utilizou cromossomos para a diferenciação dos tipos existentes. Nesse sistema, eram denominados eupirenes os espermatozóides com cromossomos haplóides e apirenes os espermatozóides sem cromatina, portanto sem núcleo (Swallow; Wilkinson, 2002). Insetos machos de muitas espécies apresentam um heteromorfismo de espermatozóides no qual são produzidos mais de um tipo de gameta (França; Bão, 2000).

Os insetos que têm recebido especial atenção quanto ao polimorfismo de seus gametas masculinos são os insetos da ordem Lepidoptera, nos quais são produzidos dois tipos de espermatozóides. O espermatozóide eupirene, que é considerado típico por conter quantidade normal de cromatina, sendo, portanto responsável pela fertilização do óvulo, caracteriza-se por conter núcleo e acrossoma que formam uma cabeça alongada, uma longa cauda e apêndices extracelulares; enquanto que o apirene, espermatozóide considerado atípico por ser anucleado, e conseqüentemente infértil, caracteriza-se por ter uma extremidade anterior ou “cabeça” recoberta por um capuz denso e uma longa cauda. Os dois tipos de espermatozóides são considerados morfológica e funcionalmente diferentes. Nos folículos testiculares da maioria dos Lepidopteros, formam-se a partir de cistos diferentes e em tempos diferentes os dois tipos de espermatozóides (Jamieson, 1987; Mancini & Dolder, 2004). Apesar do fato de apirenes serem inférteis, 50-90% dos espermatozóides que são transferidos para o trato feminino, são os considerados atípicos, de acordo com a espécie (Jamieson, 1987; Friedländer, 1997; França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004).

Existe certa controvérsia quanto ao período do ciclo vital dos Lepidoptera, no qual já se podem distinguir as células espermáticas eupirenes das apirenes. Mas em termos gerais,

admite-se que a espermatogênese eupirene precede a apirene e inicia-se durante o estágio larval finalizando na pupação, podendo estender-se ao período adulto. A fase apirene começa um pouco antes ou no início do estágio de pupa e finaliza mais tardiamente, no adulto (Leviatan & Friedländer, 1979).

Quanto ao papel fisiológico desempenhado pelos espermatozóides apirenes, alguns estudos sugerem que estes espermatozóides anucleados atuam na separação dos longos feixes eupirenes, responsáveis pela fertilização do óvulo (Katsuno, 1977; Osanai *et al.*, 1987). Outros estudos sugerem que células apirenes desempenham função no transporte das células eupirenes até o trato feminino. No entanto, estudos mais recentes indicam que as células apirenes estão envolvidas na competição espermática (Mancini & Dolder, 2004).

Embora o espermatozóide apirene não esteja envolvido diretamente com o processo de fertilização, sua produção acontece em grande quantidade, podendo atingir mais de 90% do total dos dois tipos de espermatozóides em algumas espécies (Swallow; Wilkinson, 2002). De acordo com Swallow; Wilkinson (2002) a evolução de espermatozóides heteromórficos, apesar das dificuldades de se explicar sua significância, é um estudo de grande interesse. Existem dados não conclusivos para muitas hipóteses atuais sobre esse assunto, porém não há razões para crer que o esperma heteromórfico desempenha a mesma função em diferentes grupos de insetos, uma vez que o polimorfismo tem surgido independentemente em diversos grupos.

Apesar da espermatogênese dicotômica de Lepidoptera estar sendo investigada desde o início deste século, poucos são os estudos ultraestruturais (Lai-Fook, 1982 a, b; La Chance & Olstad, 1988 a, b) que contêm, em termos gerais, descrições seqüenciais dos estágios da espermatogênese e dos eventos característicos da maturação pós-meiótica das espermátides, tal como fizeram Quagio-Grassiotto (1993) e Lino Neto (1993) para outras ordens de insetos. A espermatogênese e em especial o conhecimento da ultraestrutura dos espermatozóides em insetos tem contribuído com estudos de filogenia e taxonomia, como uma ferramenta confiável na identificação de ordens, famílias e espécies.

1.4 Revisão de Literatura

Larvas de *Calpodus ethilius* (Lepidoptera: Hesperidae) apresentam testículos com formato de feijão, revestidos por uma multicamada celular e uma camada de células foliculares que dividem o testículo em quatro folículos, onde os cistos de células da linhagem germinativa se desenvolvem de maneira centrípeta (Lai-Fook, 1982). Segundo Almeida & Cruz-Landin (2000), *Palembus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) apresenta um par de testículos formados por seis folículos circulares. Em insetos da ordem Diptera, cada testículo consiste somente em um folículo (Phillips, 1970).

Em *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) o aparelho reprodutor masculino de larvas é composto por um par de testículos divididos em quatro folículos. Estes testículos, durante os estágios de pré-pupa migram dorsalmente e se fundem, originando um órgão esférico (Garvey *et al.*, 2000). De acordo com Lai-Fook (1982) a fusão dos testículos ocorre 12 horas antes da pupação, originando um órgão de formato esférico e dividido em oito folículos.

Em um estudo com adultos de *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) o trato reprodutor masculino foi descrito como um único testículo, fundido e esférico contendo células em diferentes estágios de desenvolvimento (Mancini; Dolder, 2004), assim como em adultos de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), descrito por Alves *et al.* (2006). O segundo autor nos revela mais características sobre o aparelho reprodutor masculino, assim como Garvey *et al.* (2000) em *L. dispar*. As características que foram descritas por eles estão de acordo com as características padrão para os insetos (Gullan, 2007). Os espermatozoides maduros, desenvolvidos no testículo, são armazenados nas vesículas seminais até que a cópula ocorra (Alves *et al.*, 2006).

Larvas de Lepidoptera apresentam um par de testículos que na fase adulta podem permanecer separados ou se fundirem em uma única estrutura. Cada testículo possui formato de rim ou feijão, são revestidos externamente por uma camada de células (túnica externa) e justaposta a ela, se encontra a túnica interna que divide o órgão em quatro lóbulos ou folículos que englobam vários cistos nos quais as espermatogênese apirene e eupirene ocorrem. Cada folículo possui uma extremidade distal maior, situada no lado convexo do testículo e uma extremidade proximal menor, situada no lado côncavo do testículo. A extremidade proximal de cada folículo é prolongada em vasos eferentes separados e estes quatro vasos eferentes se

fundem para formar um vaso deferente. Os dois tipos de espermatozoides nunca são produzidos no mesmo cisto, que é formado por células císticas ou somáticas; as células contidas nos cistos possuem divisão sincrônica, e dessa forma, todas elas se encontram no mesmo estágio de diferenciação. A espermatogênese possui um avanço centrípeto em adultos, sendo que as espermatogônias e espermátocitos encontram-se na periferia do testículo, enquanto que os cistos mais maduros (espermátides e espermatozoides) se encontram na região central do testículo (França; Bão, 2000; Mancini; Dolder, 2004; Friedländer *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006).

O desenvolvimento dos espermatozoides pode ser dividido em diferentes estágios: (1) Espermatogônias pré-definitivas ou primárias, (2) espermatogônias definitivas ou secundárias, (3) espermátocitos primários, (4) espermátocitos secundários, (5) espermátides, (6) espermátides em alongamento e (7) espermatozoides. As espermatogônias pré-definitivas se desenvolvem ao redor de uma célula apical localizada no germário existente na porção distal de cada folículo testicular. Quando uma espermatogônia pré-definitiva (não encistada) deixa o germário e se associa a células somáticas, forma-se então um espermatozoides e a espermatogônia agora encistada, denomina-se definitiva. Iniciam-se, a seguir, divisões mitóticas sincrônicas das quais resultarão os espermátocitos primários que passarão por duas divisões meióticas sucessivas (divisões de maturação), originando um espermatozoides com um feixe de espermátides. As espermátides passarão pelo processo de espermiogênese no qual ocorrem modificações morfológicas e funcionais. Este processo irá originar um cisto com espermatozoides orientados paralelamente, cabeça com cabeça, cauda com cauda (Sado, 1963; Hannah-Alava, 1965; Holt & North, 1970; Phillips, 1970 a, b, 1971; Baccetti, 1972; Garbini & Imberski, 1977; Dumser, 1980).

Dentre os insetos, podemos citar alguns que já foram estudados e apresentam a produção de espermatozoides eupirenes e apirenes: *Calpodes ethilius* (Lepidoptera: Hesperiiidae), *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae), *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) respectivamente, (Lai-Fook, 1982; Garvey *et al.*, 2000; França; Bão, 2000; Mancini; Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006).

As espermatogônias formam cistos densos e homogêneos que se caracterizam por células com citoplasma denso e abundante e um núcleo esférico. Os espermátocitos se caracterizam por grande quantidade de citoplasma, núcleo esférico com agregados densos de cromatina dispersos e nucléolo evidente (Mancini; Dolder, 2004).

Segundo Lai-Fook (1982) em espermatócitos secundários, nos quais se iniciam a formação do flagelo e a aglomeração das mitocôndrias para a formação do “nebenkern”, já se podem diferenciar os dois tipos celulares: apirene e eupirene. Porém, Mancini; Dolder (2004) afirmam que espermátide inicial é o primeiro estágio em que se pode distinguir apirene de eupirene através da presença de núcleos atípicos nas células apirenes, os quais aparecem como grandes estruturas densas, amorfas e esféricas.

Espermátides iniciais apirenes são caracterizadas por forma esférica, grande volume citoplasmático e principalmente pela presença de diversos micronúcleos. Em espermátides alongadas, os micronúcleos são eliminados em vesículas pela extremidade posterior da cauda juntamente com o excesso de citoplasma (Mancini; Dolder, 2004; Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini *et al.*, 2005). O flagelo das espermátides apirenes possui um axonema e dois derivados mitocondriais. O axonema consiste inicialmente em uma organização microtubular de “9+2”, sendo 9 pares periféricos e dois microtúbulos centrais, mas eventualmente se desenvolvem 9 microtúbulos acessórios, formando um arranjo definitivo de “9+9+2” (Mancini; Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005), o que está de acordo com Garvey *et al.* (2000) que relata que é na fase de espermátide que as células apirenes irão adquirir os 9 microtúbulos periféricos

Nas mariposas *L. díspar*, as espermátides eupirenes são caracterizadas por conter núcleo com cromatina condensada e concentrada na periferia (Garvey *et al.*, 2000). Mancini; Dolder (2004) caracterizam espermátides eupirenes iniciais com citoplasma abundante, complexo mitocondrial próximo ao núcleo esférico, axonema atado ao núcleo e vesícula acrossomal que se desenvolve a partir do complexo de Golgi. Posteriormente, o núcleo se torna alongado e a vesícula acrossomal se desenvolve em um acrossoma tubular (Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004).

Tanto em espermátides eupirenes, quanto em espermátides apirenes, há a formação do “nebenkern” (Garvey *et al.*, 2000). Durante o processo de alongamento, o “nebenkern” se desenvolve em dois derivados mitocondriais (Mancini; Dolder, 2004). Os derivados mitocondriais apirenes são equivalentes em tamanho e possuem regiões elétrondensas, já os derivados mitocondriais eupirenes não são semelhantes: há um derivado mitocondrial maior e mais elétrondenso e um menor e menos elétrondenso (Garvey *et al.*, 2000).

Phillips (1970) afirma que as porções anteriores da cabeça de espermátides tardias tornam-se embebidas na parede das células císticas. França; Báó (2000) também relatam que

durante os estágios finais da espermiogênese apirene a extremidade anterior das espermátides alongadas tornam-se gradualmente embebidas no citoplasma das células císticas.

No final da espermiogênese, os espermatozóides apirenes estão desprovidos de núcleo, possui extremidade anterior formada por um capuz denso que antecede o início do axonema (Riemann, 1970; Phillips, 1971; Friedländer & Gitay, 1972; Friedländer & Miesel, 1977; Lai-Fook, 1982; Medeiros, 1997; Medeiros & Silveira, 1996; França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005). O flagelo possui um axonema com arranjo “9+9+2” e dois derivados mitocondriais com disposição em “V” se estendendo paralelamente ao axonema, de forma e tamanho similares com região paracristalina (Phillips, 1970; Lai-Fook, 1982; Medeiros & Silveira, 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005). O axonema se origina da extremidade proximal do corpúsculo basal, começando com os microtúbulos acessórios, seguidos pelos pares periféricos e pelos microtúbulos centrais. O microtúbulo acessório e um dos microtúbulos do par central são elétron-densos (Mancini & Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005). Na extremidade posterior do espermatozóide apirene, os derivados mitocondriais terminam em diferentes níveis ao longo do axonema. Deste ponto em diante o axonema se torna desorganizado, primeiro com a perda dos microtúbulos acessórios, seguido pelo par central e finalmente pelas duplas periféricas. (Phillips, 1971; Lai-Fook, 1982; Medeiros, 1986, 1997; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004).

No final da espermiogênese, o espermatozóide eupirene contém núcleo alongado com cromatina compacta e homogênea, e se estende até o início do flagelo. Na base da cabeça do espermatozóide há presença de um acrossomo tubular que se estende paralelo ao núcleo. O flagelo consiste em um axonema com arranjo “9+9+2” que parte do corpúsculo basal e dois derivados mitocondriais que se estendem paralelamente ao axonema. Os derivados mitocondriais não possuem região paracristalina. O espermatozóide também possui apêndices reticular e laciniados, exclusivos da ordem Lepidoptera, que se estendem por todo o comprimento externo dos espermatozóides, sendo mais desenvolvidos na região anterior do que na posterior. O apêndice reticular é uma estrutura única em forma de bastão denso, formado nas espermátides iniciais, que se mantém durante o trato masculino e pode ser utilizado para diferenciar as caudas das espermátides iniciais apirenes de eupirenes. Os apêndices laciniados são estriados, compostos por bandas elétron-densas intercaladas a bandas elétron-lúcidas e formados em espermátides tardias, após a formação do apêndice reticular. Os apêndices laciniados estão presentes somente em espermatozóides eupirenes intratesticulares (Riemann, 1970; Phillips, 1971; Lai-Fook, 1982; Medeiros, 1986; Medeiros,

1997; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Bão, 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006).

Em *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) o espermatozóide eupirene possui um acrossomo tubular em sua região anterior (Mancini & Dolder, 2004; Mancini & Dolder, 2004a). Porém, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) apresenta um acrossomo que se estende bilateralmente ao núcleo e contém duas grandes porções ao redor deste, e além dessa estrutura, a região anterior do espermatozóide é composta por um arco de oito microtúbulos acessórios conectados individualmente a membrana plasmática por densas pontes (Alves *et al.*, 2006).

No espermatozóide de *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) a região anterior é composta por núcleo e um acrossomo alongado. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) que também apresenta a produção de apenas um espermatozóide no qual o flagelo é composto por dois derivados mitocondriais, um axonema com arranjo de “9+9+2” microtúbulos e dois corpos acessórios com formato triangular assim como em *A. vicina*. Enquanto que em outros insetos da ordem Hymenoptera o flagelo é constituído de axonema, adjunto centriolar, um par de derivados mitocondriais e um par de corpos acessórios. Os derivados mitocondriais em *A. mellifera* se diferenciam por um ser maior, com forma ovalada e composto por quatro regiões distintas e outro por ser menor, com formato arredondado e composto por três regiões distintas. Em *Agelaia vicina* os derivados mitocondriais começam em alturas diferentes. O maior se dispõe ao lado da região nuclear posterior e o menor se dispõe em uma altura abaixo da região posterior do adjunto centriolar. Apenas o derivado mitocondrial maior apresenta região paracristalina, situada distalmente em relação ao axonema (Lino-Neto *et al.*, 2000; Zama *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Considerando:

1- A importância econômica de *Diatraea saccharalis* na agricultura, face aos prejuízos causados por esta praga da cana-de-açúcar;

2- A necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito de aspectos biológicos da reprodução de *Diatraea saccharalis*, visando colaborar com estudos científicos básicos relacionados à biologia deste importante inseto praga, bem como com estudos aplicados direcionados ao desenvolvimento de novos métodos de controle biológico;

3- A importância filogenética e taxonômica atribuída aos estudos sobre a ultra-estrutura de espermatozoides e dos seus processos de formação;

4- O pequeno número de trabalhos realizados sobre aspectos ultraestruturais da espermatogênese dicotômica de Lepidoptera;

5- A existência de poucos estudos morfológicos sobre a espermatogênese e a organização celular do testículo da broca da cana-de-açúcar;

Este trabalho tem como objetivo:

Descrever, caracterizando morfológicamente em nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, os estágios da espermatogênese, a morfologia dos dois tipos de espermatozoides e a organização das diferentes células do testículo de *Diatraea saccharalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos insetos

As larvas e adultos de *Diatraea saccharalis* foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Entomológico da Usina de Barra Grande, Lençóis Paulista, S. P.

No laboratório da Usina as larvas são mantidas em tubos de vidro esterilizados contendo dieta artificial (HENSLEY & HAMMOND, 1968), em câmara climatizada. Larvas com 30 dias de desenvolvimento são transferidas para placas de Petri contendo cubos de dieta artificial sólida onde permanecem até a pupação. As pupas são agrupadas em grandes frascos plásticos, mantidos à temperatura de 24-25°C e parcialmente imersos em recipiente com água, da qual são separados por tela, até a emergência dos adultos, que também são mantidos nesses grandes frascos plásticos.

3.2 Coleta dos testículos

Foram utilizadas larvas de último instar e adultos recém-emergidos para o estudo dos testículos e do processo de espermatogênese.

Os insetos foram dissecados sob lupa pela região ventral. Após a identificação dos testículos, estes foram imediatamente pré-fixados, no local, pelo gotejamento da solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Após a retirada dos testículos, estes foram embebidos na mesma solução fixadora citada acima por 24 horas.

3.3 Preparação dos testículos para a análise histológica em cortes convencionais

Após a fixação inicial, o material foi submetido à técnica de inclusão em metacrilato-glicol (historresina JB4 da Polysciences), seguindo o seguinte protocolo:

- Desidratação em álcool 70% (5-15 min) e álcool 95% (2h)
- Infiltração em mistura 1:1 de resina sem catalisador e álcool 95% (5h)
- Infiltração em resina com catalisador em temperatura ambiente (24h)
- Inclusão em resina com catalisador
- Polimerização em estufa a 37°C (24h).

Os cortes de 3µm foram submetidos à coloração em Hematoxilina – Eosina e Feulgen. As lâminas foram analisadas e fotografadas em foto microscópio Olympus.

A) Análise convencional – Coloração pela Hematoxilina – Eosina (Pearse, 1972).

Os cortes histológicos foram hidratados com água destilada. Logo após foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina. Resumidamente, os cortes foram tratados com Hematoxilina, por 15 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos e tratados com Eosina, por 15 minutos. Após retirar o excesso de corante com água destilada, os cortes foram submetidos à desidratação em álcool 90% e três lavagens em álcool absoluto; então os cortes foram diafanizados em álcool mais xilol e após foram feitas três trocas em xilol antes de serem montadas em lâminas permanentes.

B) Reação de Feulgen (Pearse, 1972).

Para determinação do nível de compactação da cromatina, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos à hidrólise controlada com ácido clorídrico 1N por 15 minutos à 60° C. Para deter a hidrólise os cortes foram colocados em água destilada gelada, lavados em água corrente por 10 minutos e incubados com Reativo de Schiff por 45 minutos. Após lavagem em água corrente por 10 minutos, os cortes foram contra-corados com verde luz 1% por 10 minutos, lavados em água corrente rapidamente para retirada do excesso de corante, desidratados e montados em lâminas permanentes.

3.4 Análise morfológica dos testículos em microscopia eletrônica de transmissão

As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão C.M.100 (Philips) e documentadas com filme 35mm Eastman-5302 (Kodak).

A) Preparação convencional

Após fixação inicial os testículos foram submetidos ao protocolo:

- Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão (2h)
- Lavagem em água destilada (2x de 5 min)
- Incubação em acetato de uranila 0,5 em solução aquosa (2h)
- Desidratação em sequência crescente de soluções de acetona
- Inclusão em resina (Araldite)

Os cortes de 0,5 μ m foram corados em mistura de azul de metileno 1% e azul II 1% em solução de bórax 1%. Dos blocos selecionados foram obtidos corte ultrafinos, que foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e citrato de chumbo.

4. RESULTADOS

4.1 Histologia do testículo de larva de *Diatraea saccharalis*

Os resultados histológicos mostram que em *D. saccharalis* larvas possuem um par de testículos de cor transparente aderidos à face dorsal do corpo do inseto, exibindo anatomicamente um formato riniforme (Fig. 1A). Cada testículo é revestido externamente por uma túnica celular (túnica externa) e justaposta a ela, há uma túnica celular interna que emite septos dividindo o testículo em quatro lóbulos ou folículos (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1C, Fig. 1D, Fig. 2A, Fig. 2B). Cada folículo possui uma extremidade distal situada no lado convexo do folículo e uma extremidade proximal situada no lado côncavo do folículo (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1C, Fig. 1D, Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2C). Na extremidade distal localiza-se o epitélio germinativo ou germário, que é responsável pela produção das células iniciais da linhagem germinativa, as espermatogônias (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1D, Fig. 2A, Fig. 2C).

Considerando a forma anatômica de cada folículo testicular em *D. saccharalis*, o processo da espermatogênese acontece da região apical para a região basal. As células da linhagem espermatogênica se organizam em grupos de células interconectadas, formando os cistos. Os cistos de espermatogônias e os cistos de espermatócitos se localizam na região apical do folículo, enquanto que os cistos de espermatídes e os feixes de espermatozóides se encontram na região basal do folículo (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1C, Fig. 1D, Fig. 2A, Fig. 2B, 2C).

As espermatogônias apresentam formato arredondado com núcleo e citoplasma basófilo, e núcleo com forma regular e nucléolo evidente (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1D, Fig. 2A, Fig. 2C). Os espermatócitos exibem um volume celular e nuclear bem maior que as espermatogônias, sendo menos basófilos do que estas, com núcleo arredondado e nucléolo evidente. As espermatídes são células em processo de alongamento, com núcleo pequeno e basófilo, evidenciando intensa condensação nuclear e citoplasma reduzido e acidófilo (Fig. 1C, Fig. 2A). Na porção basal do folículo encontram-se muitos feixes de espermatozóides formados por células filiformes. Em alguns feixes é possível a visualização de núcleos alongados e basófilos (Fig. 1A, Fig. 1C, Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2D).

Dentro de cada cisto testicular da broca da cana, independente da etapa da espermatogênese, as células germinativas possuem desenvolvimento sincrônico e, portanto, estão sempre no mesmo estágio de desenvolvimento.

4.2 Histologia do testículo de adulto de *Diatraea saccharalis*

Os resultados histológicos mostram que adultos recém emergidos de *D. saccharalis* possuem um único testículo (Fig.3A, Fig. 3B), de coloração esbranquiçada, que provavelmente deve ser resultado da fusão do par de testículos encontrado em larvas. O testículo se conecta a dois vasos deferentes, caracteriza-se por formato circular (Fig.3A, Fig. 3B), é revestido externamente por uma túnica celular externa e dividido em oito folículos através de septos delgados de uma túnica interna que se encontra justaposta à túnica externa (Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D, Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 4D). A espermatogênese ocorre de maneira centrípeta, sendo que os cistos de células em estágios iniciais de desenvolvimento (espermatogônias e espermatócitos) estão dispostos próximos à periferia do órgão e os cistos de espermatídes e feixes de espermatozóides encontram-se próximos ao centro do folículo (Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D). Internamente, o folículo é composto quase que em sua totalidade por células da linhagem germinativa em estágios finais de desenvolvimento (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D, Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 4D), portanto apresenta grande quantidade de feixes de espermatozóides. Os feixes de espermatozóides se apresentam como longas células filiformes, e em alguns feixes é possível detectar a presença de núcleo o qual exhibe forma alongada, acompanhando o formato da célula e apresentando coloração basófila (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D, Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 4D).

4.3 Ultraestrutura do testículo e espermatogênese em *Diatraea saccharalis*

Os resultados ultraestruturais dos testículos de larvas e adultos de *Diatraea saccharalis* permitiram a caracterização dos diferentes tipos celulares envolvidos no processo da espermatogênese neste inseto.

4.3.1 Espermatogônia

As espermatogônias encontram-se envoltas por um cisto de células somáticas denominadas células císticas, as quais individualizam o cisto (Fig. 5A, Fig. 5B, Fig. 6A, Fig. 6B). As células císticas são delgadas, com pequeno volume citoplasmático; observa-se mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma, que geralmente possuem formato alongado. O núcleo se apresenta de forma alongada e irregular (Fig. 5A, Fig. 5B, Fig. 6A, Fig. 6B). Os cistos de espermatogônias se encontram na periferia do folículo testicular (Fig. 5A). Espermatogônias caracterizam-se por formato arredondado, com membrana plasmática regular; citoplasma volumoso e mais elétron-denso que o núcleo. O citoplasma apresenta grande quantidade de mitocôndrias bastante elétron-densas; observa-se também retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Fig. 7B). O núcleo é arredondado com envoltório nuclear regular, composto principalmente por eucromatina e contendo alguns aglomerados de heterocromatina espalhados uniformemente, com nucléolo evidente (Fig. 5A, Fig. 5B, Fig. 6A, Fig. 6B). As espermatogônias que compõem um cisto mantêm-se interligadas umas as outras por meio de pontes citoplasmáticas (Fig. 6A, Fig. 7A), uma vez que a citocinese das divisões mitóticas sofridas por elas é incompleta (Fig. 6A). As pontes citoplasmáticas também são observadas entre espermatócitos e espermátides. O desenvolvimento das células componentes de um cisto ocorre de maneira sincrônica, de forma que todas as células germinativas do cisto estão sempre no mesmo estágio de diferenciação e desenvolvimento.

4.3.2 Espermatócito

Assim como as espermatogônias, os espermatócitos apresentam-se envoltos por células císticas, as quais exibem citoplasma com mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Fig. 8A). Os espermatócitos formam cistos homogêneos, com células de formato irregular interligadas por meio de pontes citoplasmáticas, citoplasma volumoso e núcleo grande e arredondado (Fig. 8A, Fig. 8B). O citoplasma apresenta mitocôndrias bastante elétron-densas de formato alongado; distribuídas preferencialmente em um dos pólos da

célula. No citoplasma nota-se também, a presença de retículo endoplasmático rugoso. Em alguns cistos, o núcleo aparece com envoltório irregular; o núcleo também apresenta eucromatina com pequenos aglomerados de heterocromatina e nucléolo evidente (Fig. 8A, Fig. 8B).

4.3.3 Espermátide Apirene

As espermátides, também encontram-se envoltas por células císticas, que apresentam pequeno volume citoplasmático com grande quantidade de mitocôndrias alongadas, núcleo volumoso e irregular, com nucléolo bastante evidente (Fig. 9A). É no estágio de espermátide que as células da linhagem germinativa passam pelo processo de espermiogênese. Durante esse processo ocorrem modificações morfológicas celulares que originarão espermatozóides maduros. As modificações sofridas pelas células serão descritas a seguir divididas em algumas etapas, porém é importante destacar que todo o processo, tanto de espermatogênese, quanto de espermiogênese, são processos celulares contínuos e, portanto, não possuem divisões.

Primeira etapa. As espermátides iniciais possuem formato irregular com grande volume citoplasmático rico em ribossomas livres, e apresentam micronúcleos de diversos tamanhos (Fig. 9A, Fig. 9B). Os micronúcleos apresentam freqüentemente formato circular constituídos por eucromatina preferencialmente e com grumos de heterocromatina localizados na periferia do mesmo (Fig. 9A, Fig. 9B, Fig. 10A, Fig. 10B).

Segunda etapa. O processo de alongamento se inicia em espermátides jovens, e neste estágio já se pode observar a presença de corpúsculo basal no citoplasma celular (Fig. 9B); e é partir da extremidade distal do corpúsculo basal que se desenvolve o axonema, estrutura responsável pela movimentação flagelar. O desenvolvimento do axonema se inicia e já se observam flagelos curtos partindo das espermátides (Fig. 9B). O axonema consiste inicialmente em um arranjo microtubular do tipo “9+2”, sendo constituído por nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais (Fig. 11C). No citoplasma de espermátides jovens também se observam complexos mitocondriais ou “nebenkern” em formação (Fig. 9A, Fig. 9B), e estes estão localizados próximos aos micronúcleos.

Terceira etapa. As espermatídes estão em processo de alongamento e nota-se ao longo do comprimento celular que os micronúcleos estão se deslocando em direção a extremidade final da célula (Fig. 10A, Fig. 10B). Alguns micronúcleos já são vistos no interior de vacúolos citoplasmáticos (Fig. 10A). Nos flagelos em processo de alongamento, também se observam os derivados mitocondriais, que são desenvolvidos a partir do “nebenkern” ou complexo mitocondrial, finalizando o processo de divisão (Fig. 10A, Fig. 10B).

Quarta etapa. Neste estágio os derivados mitocondriais finalizam o processo de divisão. O flagelo é constituído por dois derivados mitocondriais arredondados de elétrondensidade bastante similar ao do citoplasma flagelar, possuem tamanhos e formas semelhantes e estão situados próximos ao axonema com disposição paralela (Fig. 11A). Neste estágio o axonema ainda apresenta um padrão microtubular de “9+2” com todos os microtúbulos do arranjo tendo lúmen elétron-transparente. Os flagelos mantêm-se interligados por meio de pontes citoplasmáticas circundadas por meio de anéis densos (Fig. 11A).

Quinta etapa. Nesta fase, nove microtúbulos acessórios estão incorporados ao arranjo microtubular do axonema. Portanto, o padrão microtubular passa a ser “9+9+2”, formado por nove microtúbulos acessórios elétron-densos, nove pares de microtúbulos periféricos, sendo que um dos microtúbulos do par possui lúmen elétron-denso, e dois microtúbulos centrais (Fig. 12A). Os derivados mitocondriais passaram do formato arredondado para o formato de “solas de sapato” e estão dispostos paralelamente um ao outro (Fig. 12A). Os derivados apresentam fileiras simples de microtúbulos, em número variado, ladeando-os e dispostos entre eles. A fileira de microtúbulos disposta entre os derivados foi encontrada em número de três, quatro e cinco microtúbulos; e a fileira posicionada lateralmente foi encontrada em número de um, dois e três (Fig. 12A). Os derivados também apresentam internamente uma região elétron-densa. Nesta fase também é possível se visualizar cisterna alongada única localizada entre os derivados mitocondriais e o axonema (Fig. 12A).

Sexta etapa. Ao longo do processo de espermiogênese, a porção anterior das espermatídes em alongamento vai sendo ocupada pelo corpúsculo basal, a partir do qual se estende o axonema (Fig. 11B). E até ao término da espermiogênese, se desenvolve um capuz denso (Fig. 13A, Fig. 13B, Fig. 13C) que recobre o corpúsculo basal por inteiro e ocupa a região anterior do espermatozóide apirene. Outro processo que também ocorre durante todo o processo de espermiogênese é que a região anterior das espermatídes alongadas vão mergulhando gradualmente na célula cística apical, e quando o processo de espermiogênese

está finalizado, é possível observar os espermatozóides apirenes com suas extremidades iniciais adentradas a invaginações das células císticas apicais (Fig. 13A, Fig. 13B, Fig. 13C).

4.3.4 Espermatozóide Apirene

Depois de passado todo o processo de espermiogênese, as espermatídes apirenes se transformam em espermatozóides apirenes maduros (Fig. 12B, Fig. 12C). Os espermatozóides apirenes podem ser divididos em duas partes distintas: a porção anterior, que corresponde à cabeça e a porção posterior, que corresponde ao flagelo. A porção anterior do espermatozóide anucleado é composta apenas por um capuz elétron-denso (Fig. 13A, Fig. 13B, Fig. 13C). O flagelo, que constitui a maior parte do espermatozóide, pode ser dividido em duas regiões distintas: a região principal e a região terminal. A região principal é constituída por um axonema e por dois derivados mitocondriais estendidos paralelamente ao filamento axial (Fig. 12B, Fig. 12C, Fig. 14A, Fig. 14B). O axonema possui um arranjo do tipo “9+9+2”, no qual se compõe por nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e por dois microtúbulos centrais. Os microtúbulos acessórios e um do par central são elétron-densos. Os dois derivados mitocondriais são estruturas muito elétron-densas com regiões internas paracrystalinas; apresentam uma disposição em “V” e possuem tamanhos e formatos bastante similares. A porção terminal do flagelo é composta apenas pelo axonema, e este vai perdendo sua configuração microtubular de “9+9+2” microtúbulos conforme se aproxima da extremidade final do flagelo, tornando-se desorganizado. Primeiramente, os pares periféricos desaparecem seguidos pelo desaparecimento dos túbulos centrais e por último, pela perda da configuração primária dos pares periféricos (Fig. 14A, Fig. 14B).

4.3.5 Espermátide Eupirene

Assim como as espermátides apirenes, as espermátides eupirenes passam pelo processo denominado espermiogênese onde ocorrem transformações morfológicas, transformando essas células em espermatozóides eupirenes maduros, prontos para fertilização. As transformações ocorridas nesta célula da linhagem germinativa serão descritas a seguir separadas em estágios.

Primeira etapa. Espermátide inicial. Logo no início da espermiogênese as espermátides passam pelo processo de alongamento celular. Nesta fase, as células nucleadas apresentam em seu citoplasma um corpúsculo basal, do qual se desenvolve posteriormente, a partir de sua extremidade distal, um axonema. Durante o processo de alongamento também são formados os derivados mitocondriais a partir do complexo mitocondrial ou “nebenkern”.

As espermátides neste estágio de desenvolvimento apresentam núcleo volumoso e arredondado, sendo preenchido principalmente por heterocromatina (Fig. 20B). O flagelo é composto por dois derivados mitocondriais de diferentes formatos e tamanhos, porém com elétrons-densidade bastante similar (Fig. 23B) e por um axonema, justaposto ao núcleo (Fig. 19A, Fig. 20B), com padrão microtubular do tipo “9+2”, sendo nove pares de microtúbulos periféricos elétrons-transparente e dois microtúbulos centrais também com lúmen elétrons-transparente (Fig. 23B). O axonema se posiciona paralelamente e entre os dois derivados mitocondriais e ao redor dessas três estruturas observam-se cisternas alongadas (Fig. 23B). Durante o alongamento flagelar observa-se que vesículas citoplasmáticas são formadas para que ocorra a eliminação do excesso de citoplasma (Fig. 20A).

Neste estágio se inicia a formação de um pro-acrossoma pelo complexo de Golgi, que dá origem ao acrossomo, o qual se aproxima do envelope do núcleo e se aloja em uma depressão localizada opostamente ao axonema (Fig. 26A). Inicialmente o acrossomo apresenta a região em seu contorno muito elétrons-densa e internamente possui duas regiões, uma maior e outra menor, sendo mais elétrons-densa a região maior. Posteriormente, a depressão em que o acrossomo se encontra, vai se desfazendo, e este ainda com formato circular, vai se posicionando superficialmente ao envelope nuclear. A região do acrossomo que está em contato com o envelope nuclear se mostra achatada e elétrons-densa (Fig. 26B, Fig. 26C).

Segunda etapa. Espermátide alongada. Nesta fase o acrossomo achatado e denso se associa com a membrana plasmática próximo ao pequeno apêndice reticular em início de formação (Fig. 21A, Fig. 21B, Fig. 21C). Nota-se que o corpúsculo basal seguido pelo axonema se aloja em uma depressão encontrada no núcleo (Fig. 19A, Fig. 19B, Fig. 21A, Fig. 21B). O axonema adquire nove microtúbulos periféricos, passando a ter um padrão microtubular do tipo “9+9+2” com o lúmen de todos os microtúbulos componente sendo ainda elétron-transparentes; o axonema está ladeado por dois derivados mitocondriais, que adquiriram um formato circular de tamanhos diferentes e com conteúdo de elétron-densidade igual ao do citoplasma circundante (Fig. 19B).

Posteriormente o acrossomo muito elétron-denso começa a se alongar e migra para uma posição frontal ao axonema (Fig. 22A, Fig. 22B, Fig. 22C). A partir desse estágio, tal estrutura vai sofrendo mudanças até chegar a um formato tubular, que se estende por todo o comprimento nuclear (Fig. 24A, Fig. 24B).

O axonema com arranjo do tipo “9+9+2” passa a ter os microtúbulos acessórios e os dois microtúbulos centrais com lúmen elétron-denso. O derivado mitocondrial maior passa a ser mais elétron-denso do que o outro; cisternas alongadas se dispõem por todo o citoplasma celular ao redor e entre os derivados mitocondriais e o axonema. Fileiras simples de microtúbulos estão espalhadas pelo citoplasma e o apêndice reticular mais desenvolvido se liga a membrana plasmática por meio de septos. Por entre as espermátides se localiza o citoplasma da célula cística (Fig. 23A, Fig. 27C).

Terceira etapa. Espermátide em maturação. Neste estágio o núcleo apresenta um alto nível de compactação, com muitos microtúbulos ao redor do envelope nuclear. O apêndice reticular está mais desenvolvido e os apêndices laciniados começam a se diferenciar. O axonema está completo e os derivados mitocondriais de tamanhos e elétron-densidades diferentes; e os microtúbulos citoplasmáticos desaparecem.

4.3.6 Espermatozóide Eupirene

Assim como as espermátides apirenes, após sofrerem o processo de espermiogênese, as espermátides eupirenes originam espermatozóides eupirenes maduros. Os espermatozóides eupirenes são compostos por duas regiões: “cabeça” e flagelo, sem que haja

uma porção intermediária entre essas duas partes. A cabeça dos espermatozóides eupirenes é composta por um núcleo fino e alongado, próximo do qual se encontra um acrossoma. A cabeça é rodeada parcial ou completamente por uma coroa de cerca de dezoito apêndices laciniados que se dispõem em forma de pétalas com estrias elétron-densas transversais, separadas regularmente uma das outras por material elétron-transparente (Fig. 23C). Os apêndices laciniados encontram-se acolados à membrana plasmática que se justapõe ao envoltório nuclear (Fig. 25A, Fig. 25B). O apêndice reticular, único, que se estende da região da cabeça à região do flagelo, não é observado em justaposição ao envoltório nuclear (Fig. 25A, Fig. 25B). O flagelo é composto por duas regiões diferentes: a região principal e a região terminal. A região principal é composta pelo axonema ou filamento axial, por dois derivados mitocondriais e pelos apêndices laciniados e reticular; e a região terminal é composta apenas pelo axonema e pelos apêndices extracelulares muito reduzidos. O axonema possui disposição de microtúbulos do tipo “9+9+2” sendo nove microtúbulos acessórios elétron-densos, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais elétron-densos (Fig. 23C, Fig. 27A, Fig. 27B). Paralelamente ao axonema, estão dispostos os dois derivados mitocondriais que apresentam dimensões e comprimentos diferentes (Fig. 27A, Fig. 27B). Os feixes de espermatozóides são envolvidos por células císticas.

4.3.7 Derivados mitocondriais

No estágio de espermatócito, é possível observar as mitocôndrias distribuídas preferencialmente em um dos pólos da célula (Fig. 8A, Fig. 8B). Posteriormente, no estágio de espermátide, essas mitocôndrias se fundem formando uma estrutura arredondada e muito elétron-densa com cisternas elétron-transparentes internamente. Essa estrutura denomina-se “nebenkern” ou complexo mitocondrial (Fig. 15A, Fig. 15B). Após esse estágio, o formato arredondado mantém-se e se percebe que o complexo mitocondrial vai sofrendo modificações, tornando-se uma estrutura bem menos elétron-densa (Fig. 16A, Fig. 16B). O complexo mitocondrial adquire um formato circular e bem menos elétron-denso que anteriormente; esse estágio é conhecido como estágio da “bolota de barbante”, por se assemelhar a ela (Fig. 17A, Fig. 17B). Durante o alongamento das espermátides, essa estrutura começa a se alongar juntamente com a célula. O “nebenkern” adquire um formato

irregular elétron-denso e com grandes espaços internos elétron-lúcidos (Fig. 18A). Posteriormente o complexo mitocondrial inicia o processo de divisão (Fig. 18B) que originará dois derivados mitocondriais.

5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

FIGURA 1

Fotomicrografias do testículo de larva de *Diatraea saccharalis* (Coloração Hematoxilina-Eosina)

A) Aspecto geral de um testículo de formato riniforme, evidenciando a túnica celular externa (TE) e os septos da túnica celular interna (TI) que dividem o testículo em quatro folículos (Fo1, Fo2, Fo3, Fo4); cada folículo com sua extremidade distal (ED) e extremidade proximal (EP); epitélio germinativo (Eg) composto por células iniciais da linhagem espermatogênica - os cistos de espermatogônias (Go). Espermátócitos (Ci) e feixes de espermatozóides (Sp).

B) Detalhe de parte de um folículo testicular, evidenciando a extremidade distal (ED) deste, o qual é revestido por uma túnica externa (TE) e margeado por septos da túnica interna (TI), mostrando células da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de desenvolvimento: cistos de espermatogônias (Go), cistos de espermátócitos (Ci). Alguns cistos de espermátócitos são vistos em divisão mitótica (*). Feixes de espermatozóides (Sp).

C) Região basal de um testículo evidenciando as extremidades proximais (EP) dos quatro folículos com grande quantidade de feixes de espermatozóides (Sp) e raros cistos com espermátides (Ti). Túnica externa (TE) do testículo e septos de túnica interna (TI) que dividem os quatro folículos.

D) Detalhe da extremidade distal (ED) de um folículo testicular mostrando o epitélio germinativo (Eg) com cistos de espermatogônias (Go) na periferia do órgão e cisto de espermátócitos (Ci), feixes de espermatozóides (Sp) localizados mais internamente. Túnica externa (TE) e túnica interna (TI).

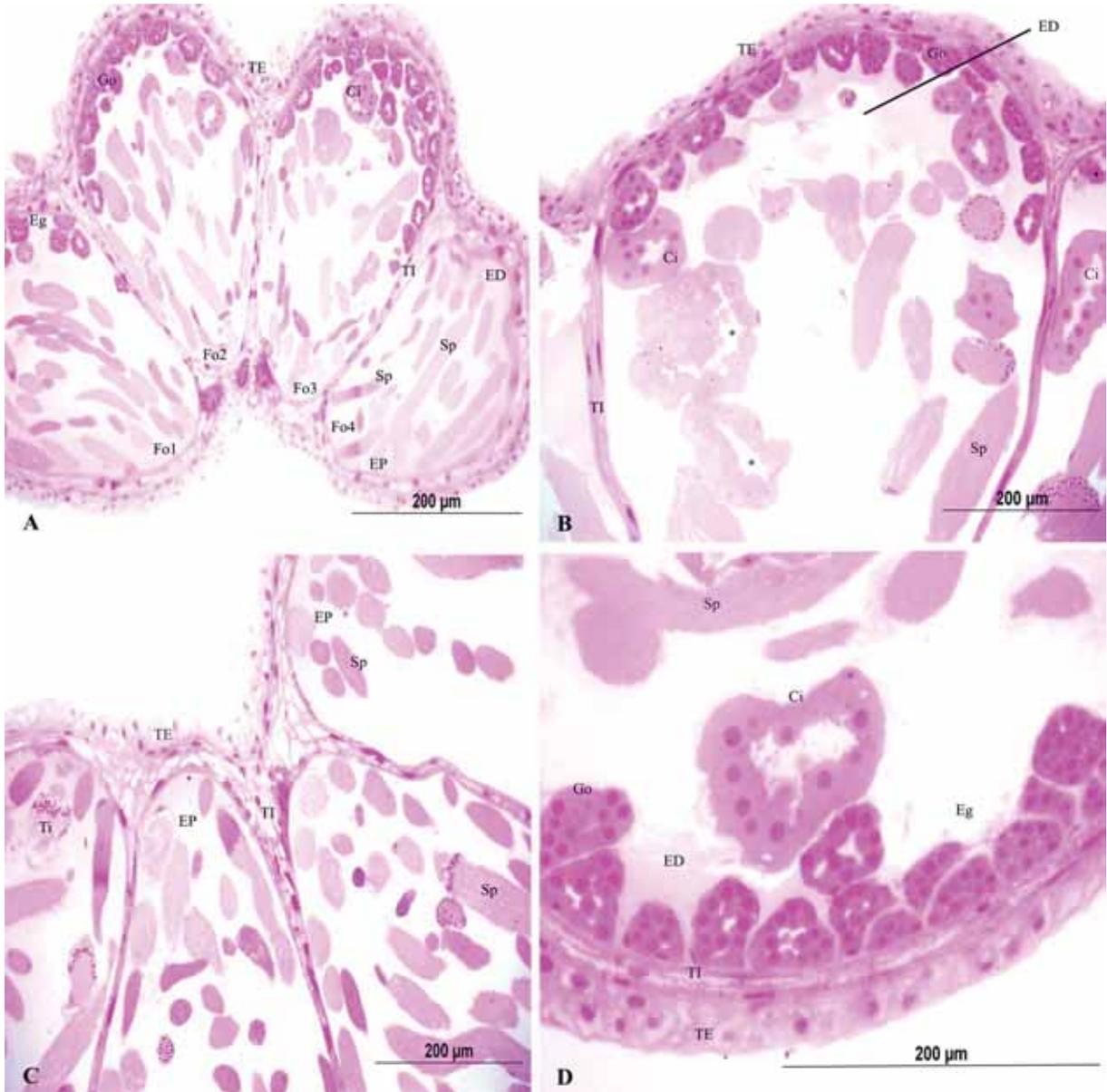


FIGURA 2

Fotomicrografias do testículo de larva de *Diatraea saccharalis* (Coloração de Feulgen)

A) Parte de um folículo testicular exibindo cistos compostos por células da linhagem espermatogênica em diferentes graus de desenvolvimento: cistos de espermatogônias (Go), cistos de espermatócitos (Ci), cistos de espermatídes (Ti) e feixes de espermatozóides (Sp). Túnica externa (TE) e septo de túnica interna (TI).

B) Detalhe de parte de um septo de túnica interna (TI) que separa os dois folículos e túnica externa (TE). Notar feixes de espermatozóides (Sp) em vários planos de corte.

C) Detalhe de parte de um folículo contendo cistos de espermatogônias (Go) localizados adjacentes a túnica interna (TI) e cistos de espermatócitos (Ci), inclusive em divisão mitótica (*).

D) Detalhe de feixes de espermatozóides (Sp) em diferentes planos de corte. Núcleo (n).

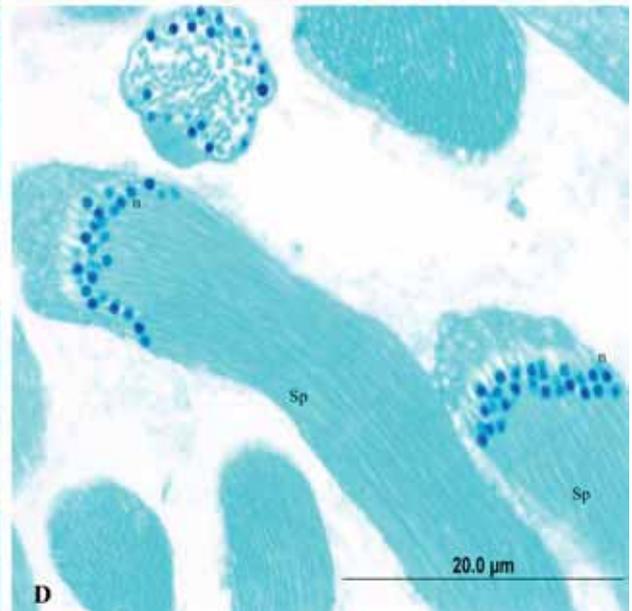
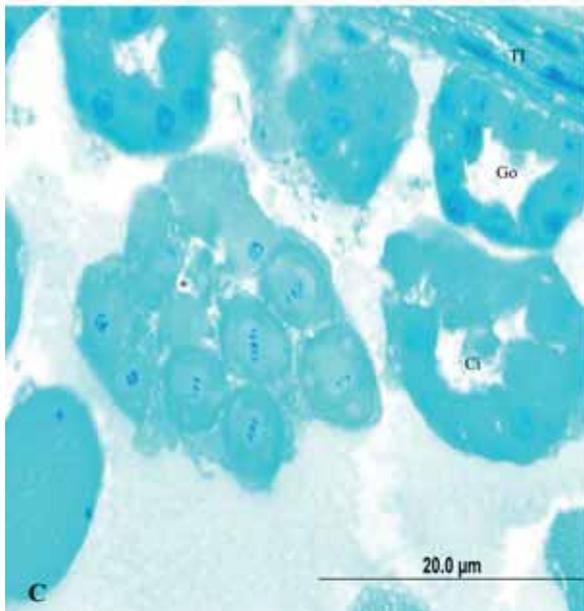
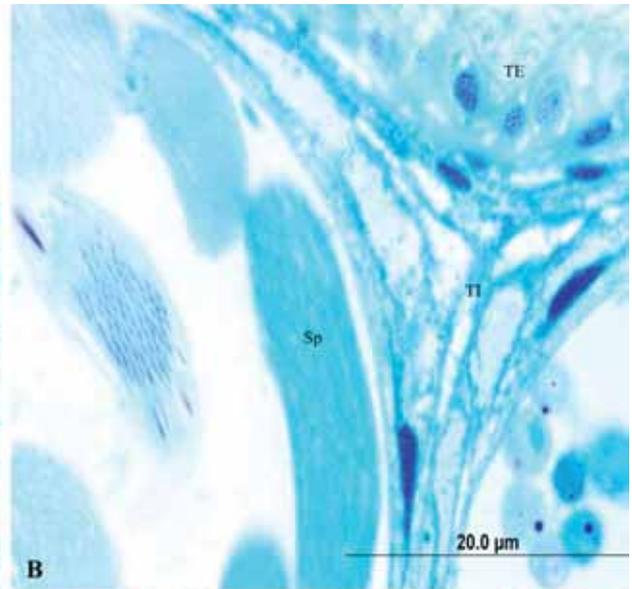
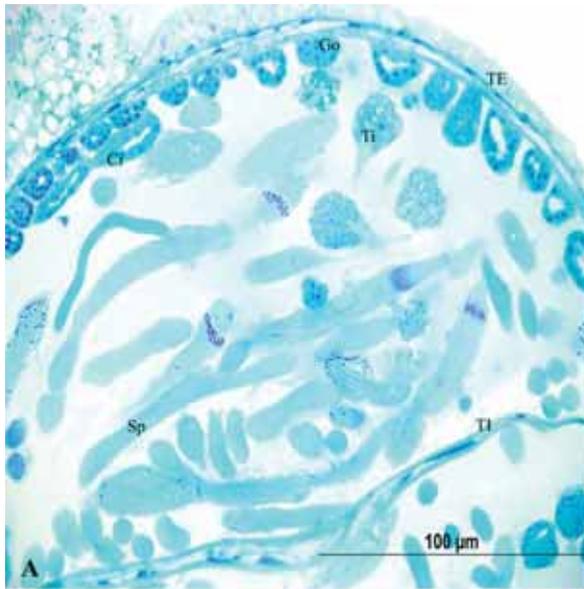


FIGURA 3

Fotomicrografias do testículo de adulto de *Diatraea saccharalis* (Coloração de Hematoxilina-Eosina)

A) Aspecto geral do testículo fundido (Te) do adulto com formato circular conectado a um vaso deferente (Vd). Notar grande quantidade de feixes de espermatozóides (Sp) no interior do testículo. No vaso deferente observa-se epitélio composto por células cilíndricas altas (Ev), com citoplasma bastante acidófilo e no interior do vaso nota-se a presença de alguns feixes de espermatozóides (Sp).

B) Testículo circular único do adulto revestido por túnica externa (TE), dividido em folículos por septos de túnica interna (TI) e composto por grande quantidade de feixes de espermatozóides (Sp).

C) Detalhe da região central de um testículo fundido de adulto exibindo a parte basal dos oito folículos testiculares (Fo1, Fo2, Fo3, Fo4, Fo5, Fo6, Fo7, Fo8). Notar a presença dos septos de túnica interna (TI) delimitando folículos, os quais possuem feixes de espermatozóides (Sp) em diferentes planos de corte.

D) Detalhe de parte de um folículo com imagens de cistos de espermatócitos (Ci), espermátides (Ti) e grande quantidade de feixes de espermatozóides (Sp), com destaque para um feixe nucleado (N). Túnica externa (TE) e túnica interna (TI).

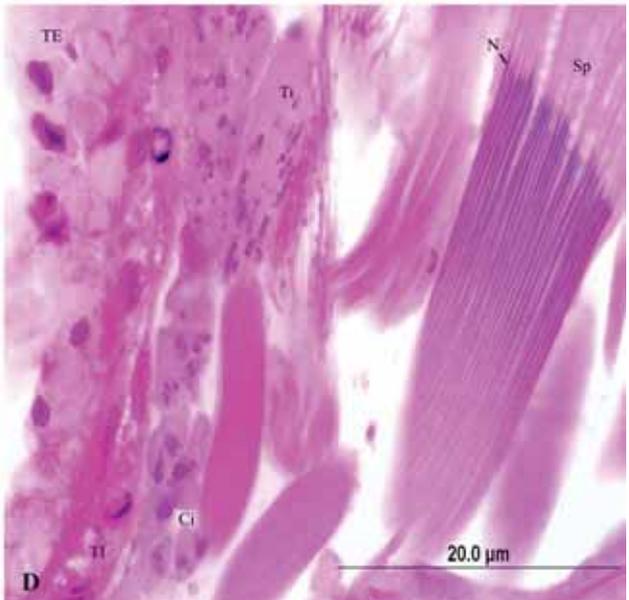
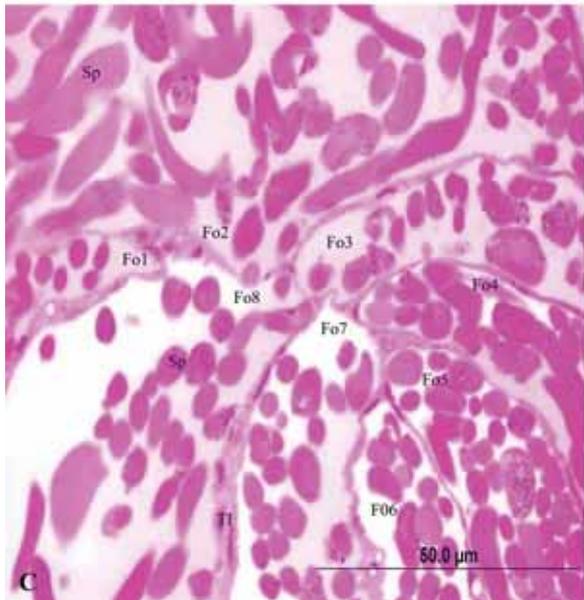
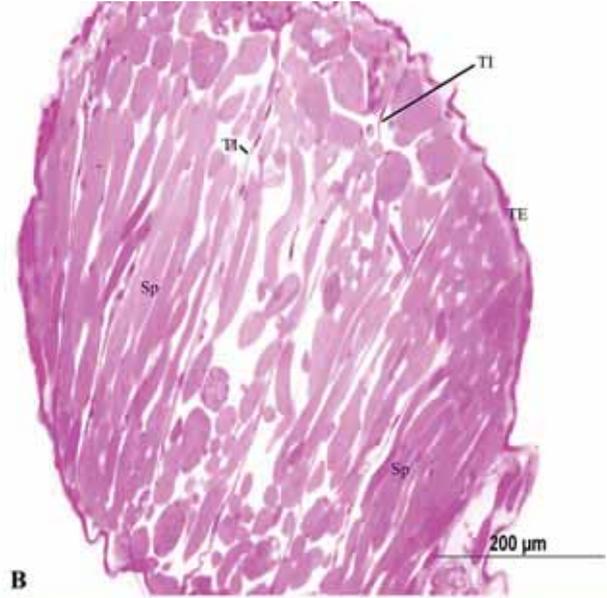
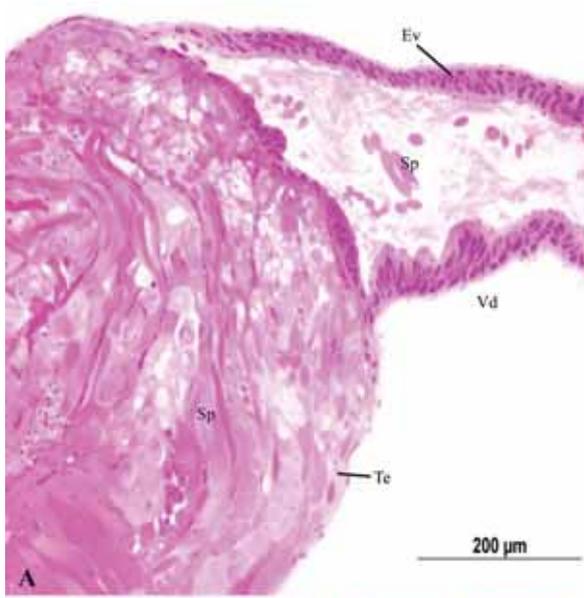


FIGURA 4

Fotomicrografias do testículo de adulto de *Diatraea saccharalis* (Coloração de Feulgen)

A) Detalhe da região periférica do testículo único do adulto mostrando três folículos (Fo1, Fo2, Fo3) com grande quantidade de feixes de espermatozóides (Sp) mesmo na periferia do órgão, em diferentes planos de corte. Túnica externa (TE) revestindo o testículo e septos de túnica interna (TI) individualizando os folículos.

B) Detalhe da região central do testículo único evidenciando a porção basal de seis folículos (Fo1, Fo2, Fo3, Fo4, Fo5, Fo6) exibindo muitos feixes de espermatozóides (Sp) em diferentes planos de corte e septos de túnica interna (TI) dividindo os folículos.

C) Porção periférica do testículo, mostrando a túnica externa (TE) com a túnica interna (TI) adjacente e feixes de espermatozóides (Sp) em diversos planos de corte.

D) Detalhe da porção periférica do órgão, mostrando a túnica externa (TE), túnica interna (TI) adjacente a túnica externa e feixes de espermatozóides (Sp), com alguns apresentando núcleo (N).

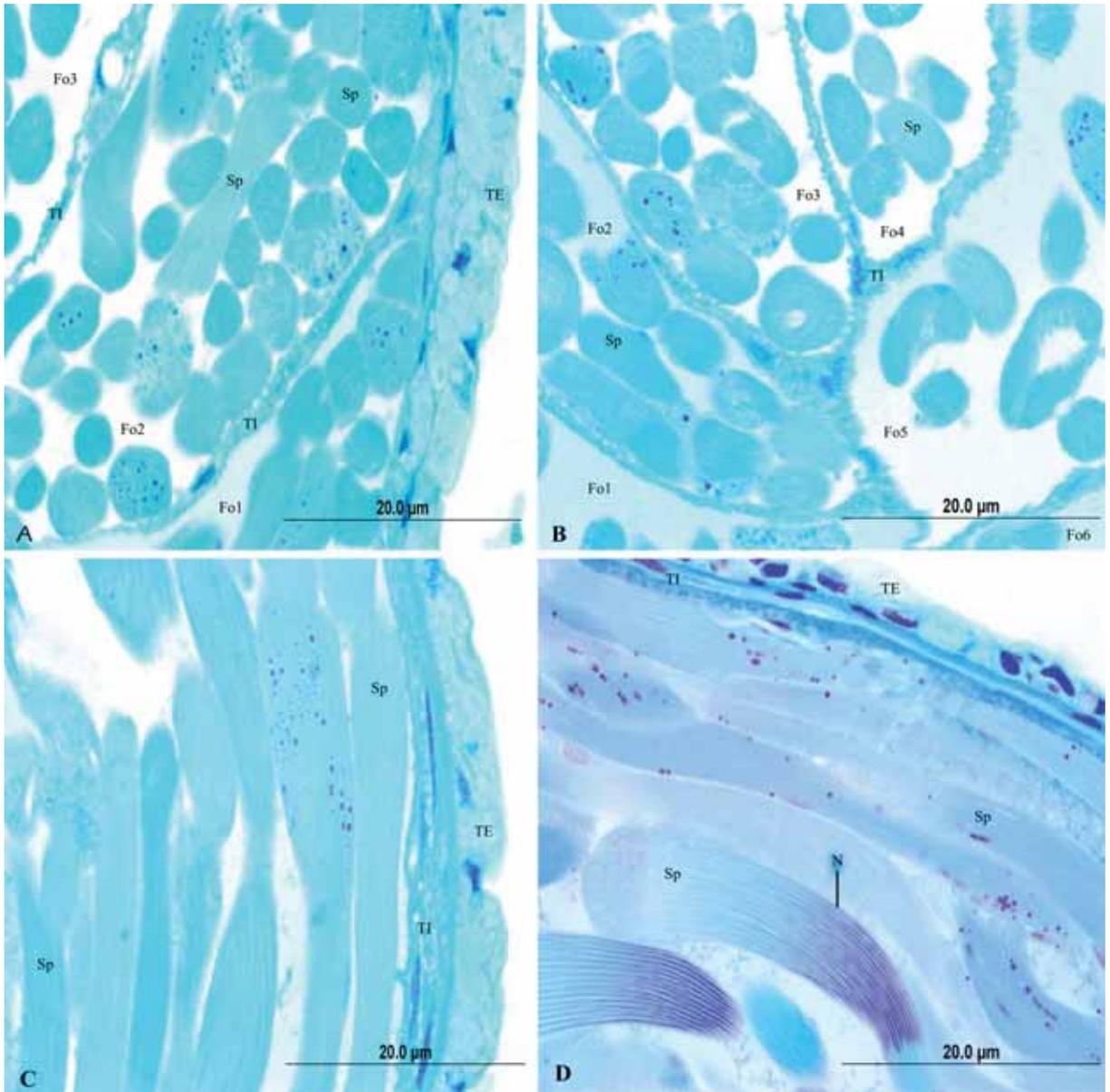


FIGURA 5

Eletromicrografias de espermatogônias em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermatogônias (Go) localizado na periferia do folículo testicular evidenciando a túnica celular externa (TE) e adjacente a ela, a túnica celular interna (TI). O cisto de espermatogônias está envolvido por células císticas nas quais é possível observar o núcleo (NC). As espermatogônias possuem citoplasma reduzido; núcleo arredondado (N) com nucléolo evidente.
- B)** Cistos de espermatogônias individualizados por células císticas (CC) com núcleo (NC) evidente. Espermatogônias com citoplasma reduzido e núcleo arredondado (N) com nucléolo evidente.

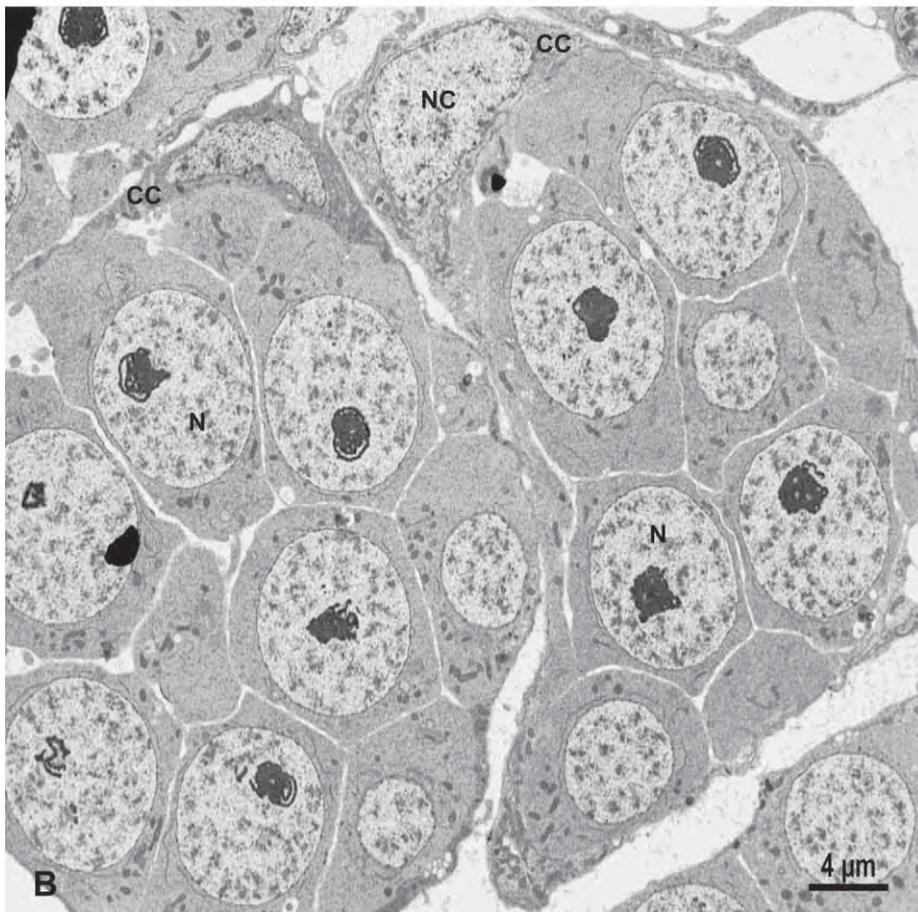
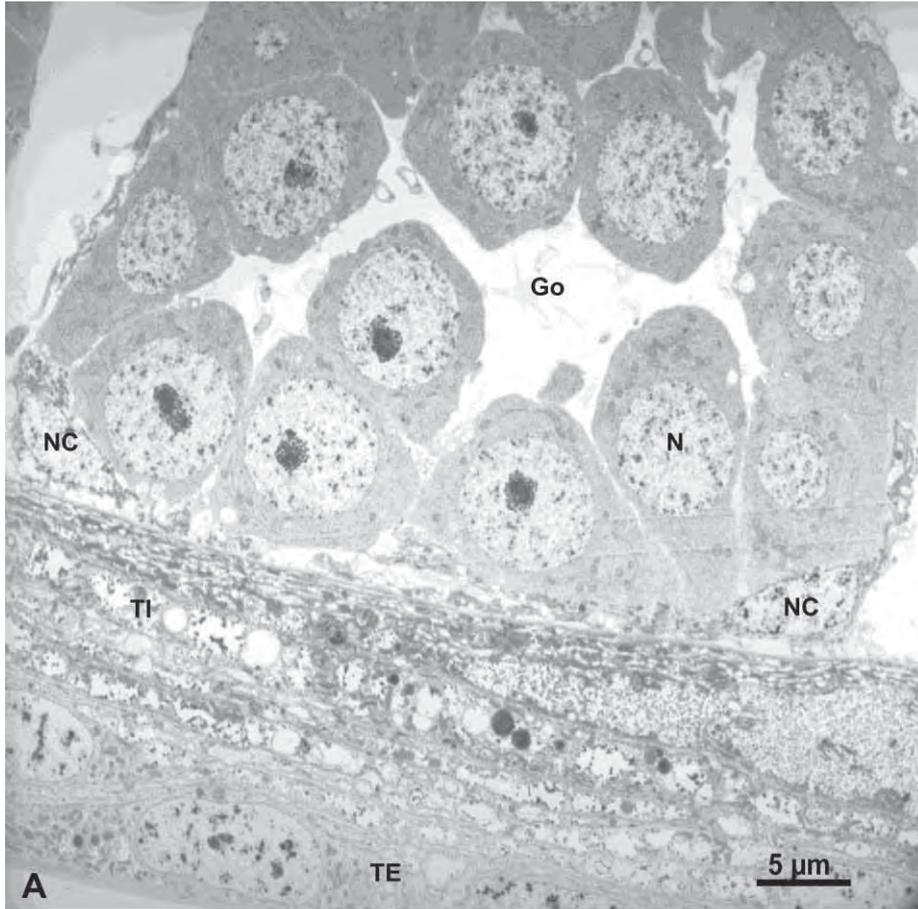


FIGURA 6

Eletromicrografias de espermatogônias em *Diatraea saccharalis*

- A)** Espermatogônias envoltas por célula cística evidenciando citoplasma com grande quantidade de mitocôndrias alongadas (Mi) e núcleo (NC). As espermatogônias aparecem interligadas por meio de pontes citoplasmáticas (PC); citoplasma com mitocôndrias alongadas (Mi) e núcleo (N).
- B)** Cisto de espermatogônia envolto por célula cística (CC). Espermatogônias com citoplasma elétron-denso apresentando ponte citoplasmática (PC), mitocôndrias (Mi), retículo endoplasmático rugoso (RER), núcleo arredondado (N) com nucléolo evidente (Nu).

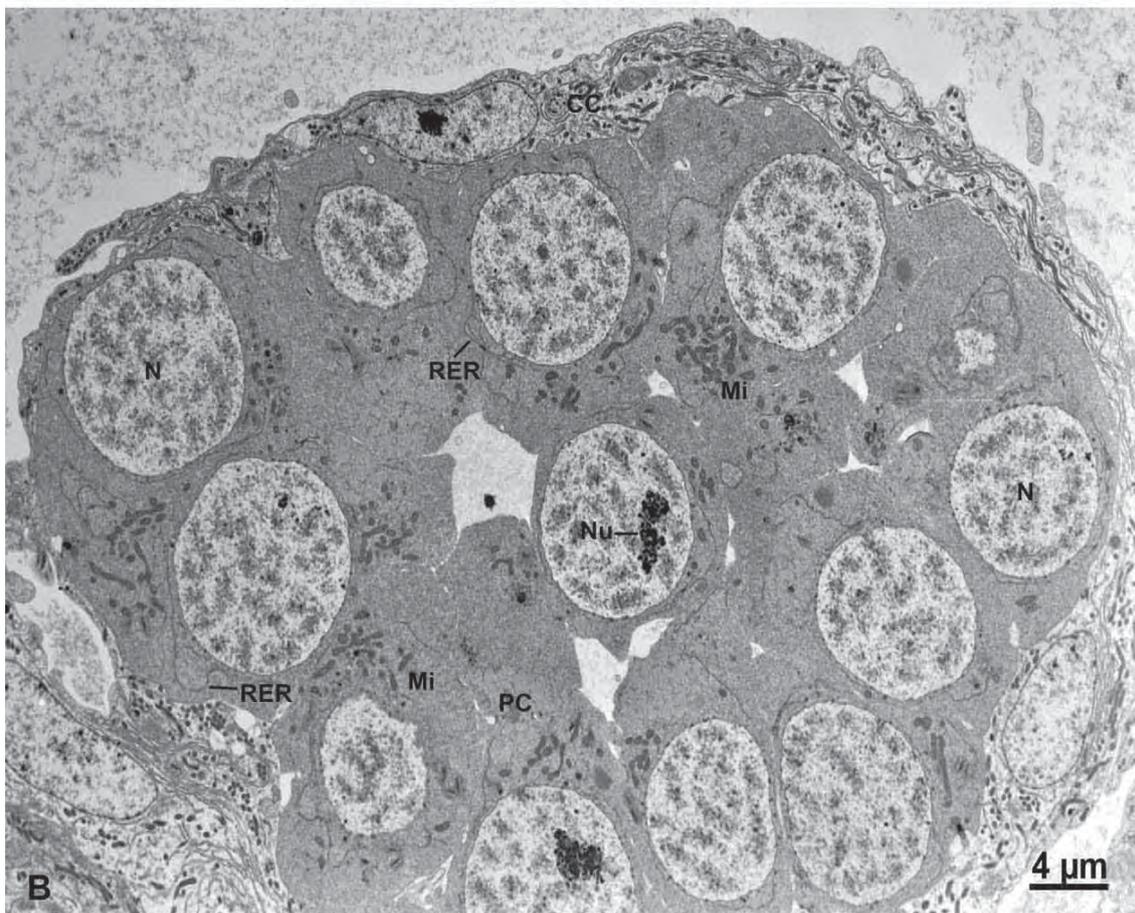
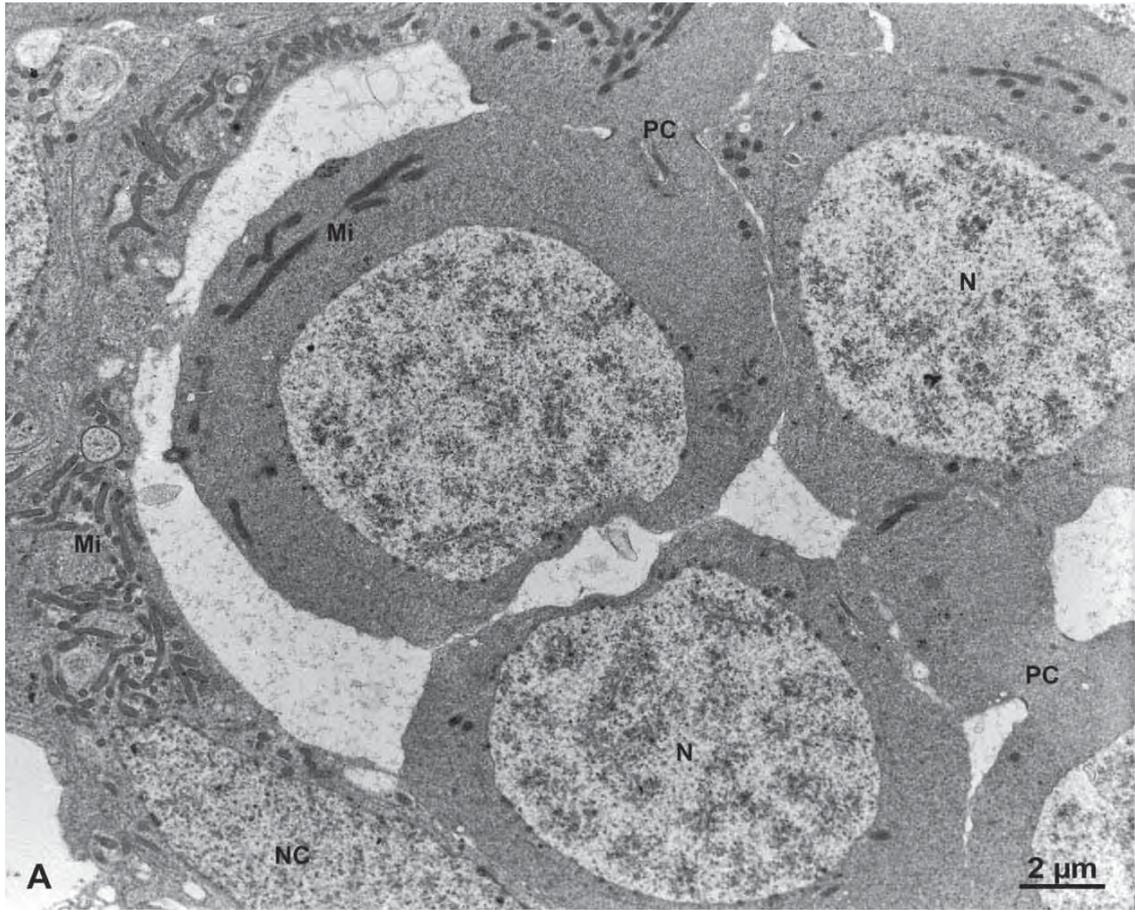


FIGURA 7

Eletromicrografias de espermatogônias em *Diatraea saccharalis*

A) Espermatogônias interligadas por meio de pontes citoplasmáticas (PC); citoplasma com mitocôndrias (Mi), retículo endoplasmático rugoso (RER) e núcleo arredondado (N) com nucléolo evidente (Nu).

B) Detalhe de parte de uma espermatogônia com núcleo arredondado (N), citoplasma contendo mitocôndrias (Mi), retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexos de Golgi (G).

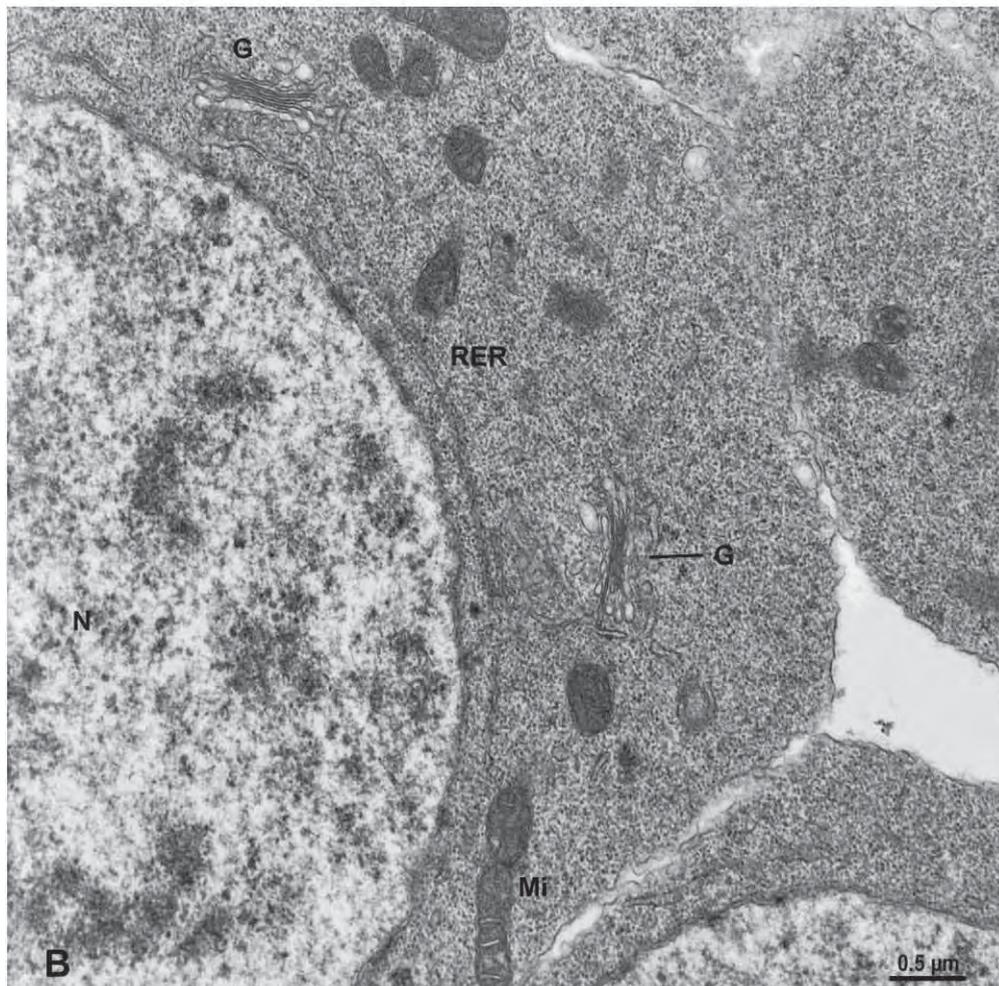
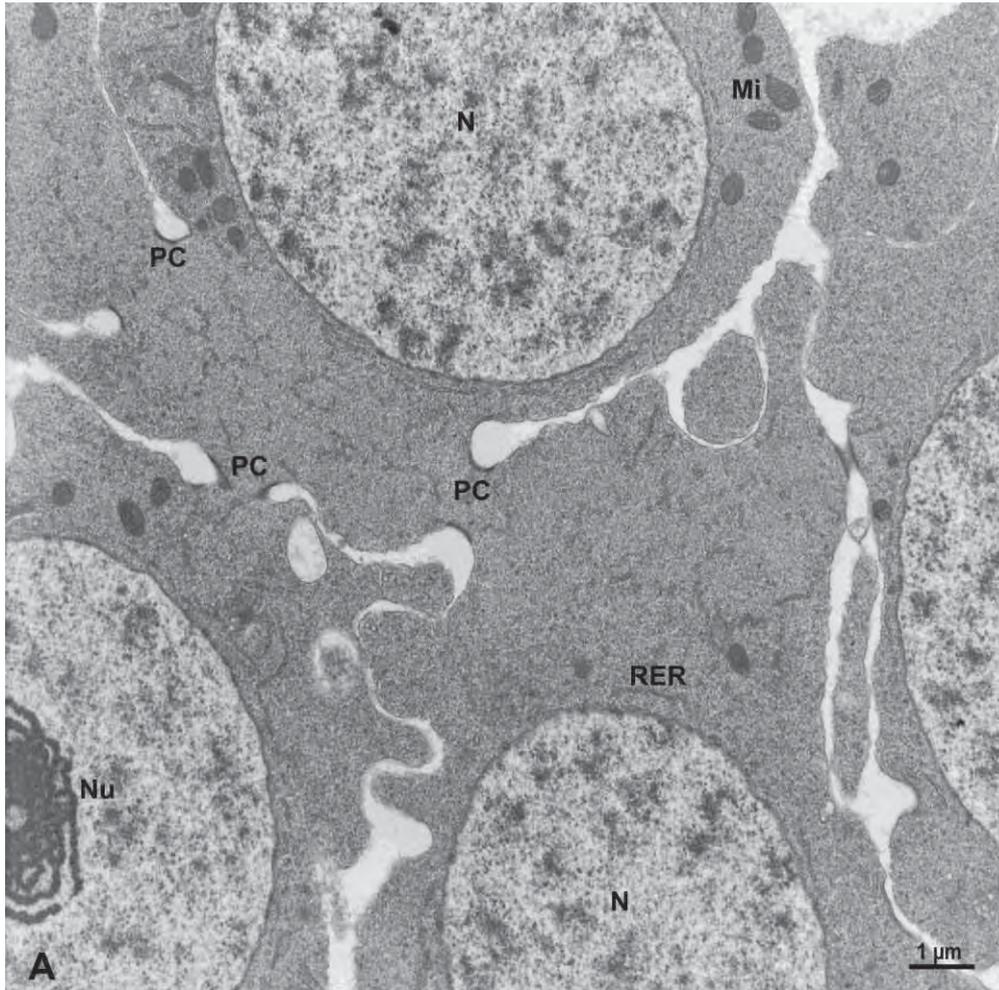


FIGURA 8

Electromicrografias de espermátocitos em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermátocito envolto por célula cística (CC). Espermátocitos com mitocôndrias (Mi) aglomeradas em um dos pólos das células, retículo endoplasmático rugoso (RER) e pontes citoplasmáticas (PC). Núcleo volumoso (N) com nucléolo evidente (Nu).
- B)** Cisto de espermátocito com mitocôndrias (Mi) aglomeradas em um dos pólos das células, ponte citoplasmática (PC) e núcleo volumoso (N) com nucléolo evidente (Nu).

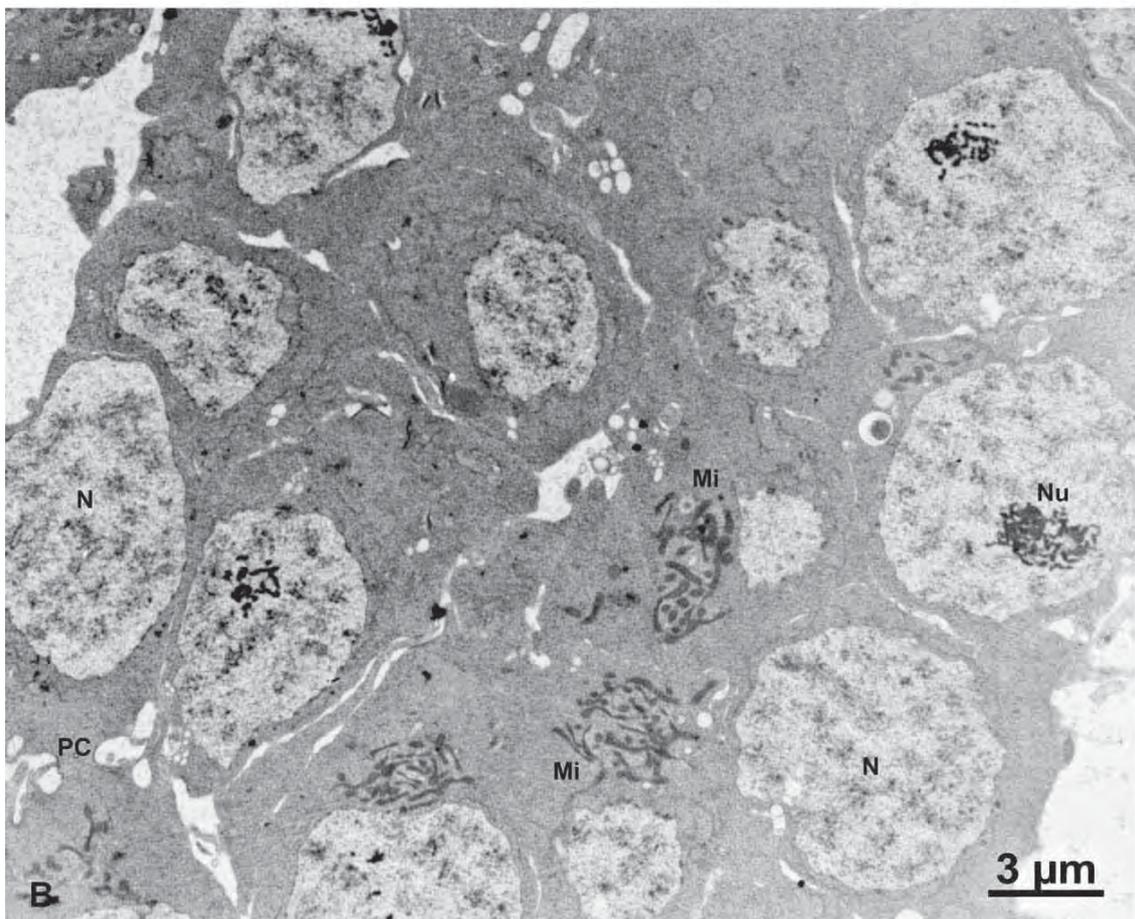
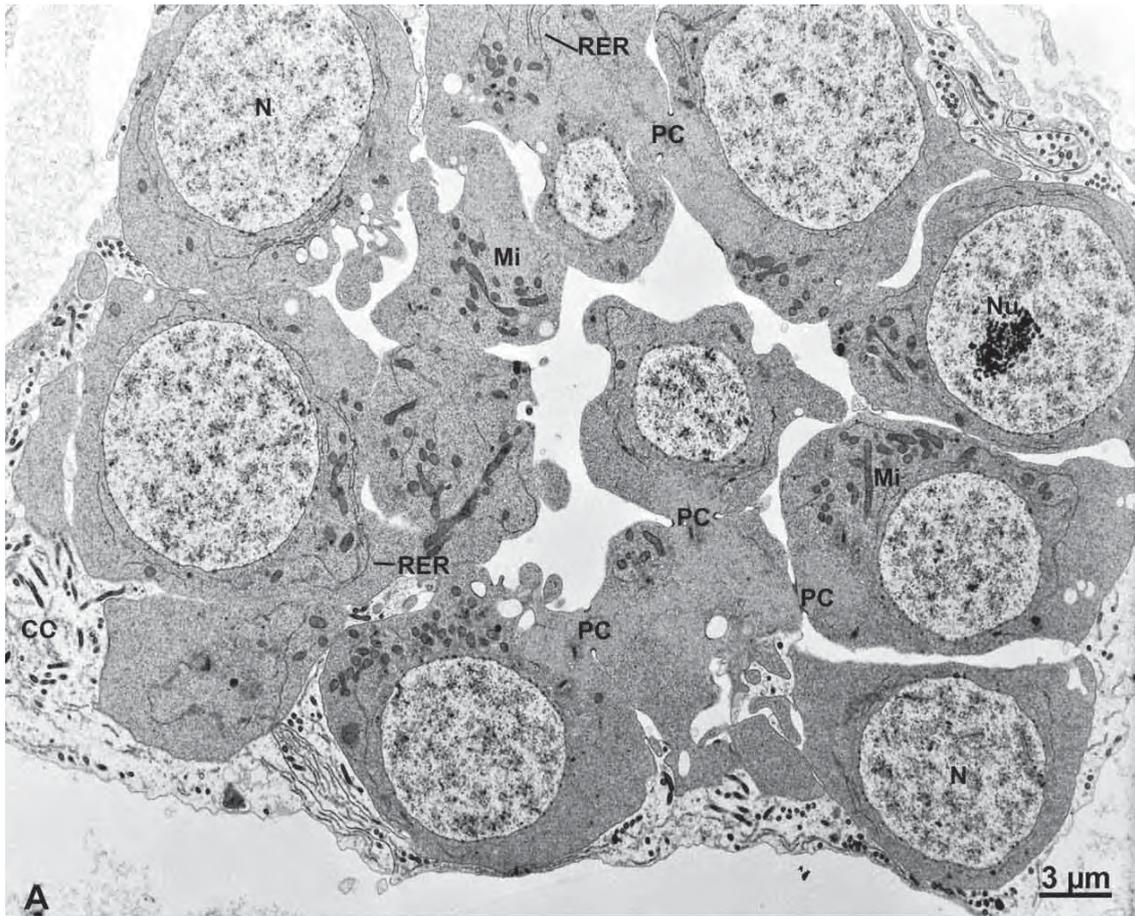


FIGURA 9

Eletromicrografias de espermátides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermátide envolto por célula cística (CC) com citoplasma exibindo mitocôndrias alongadas; núcleo irregular com nucléolo. Espermátide com complexo mitocondrial ou “nebenkern” (Nk) em formação e presença de micronúcleo (Mn).
- B)** Cisto de espermátides ainda com grande volume citoplasmático no qual se nota a presença de micronúcleos (Mn), corpúsculo basal (CB) e “nebenkern” (Nk) em formação. Observa-se axonemas (Ax) voltados para o centro do cisto em cortes transversais.

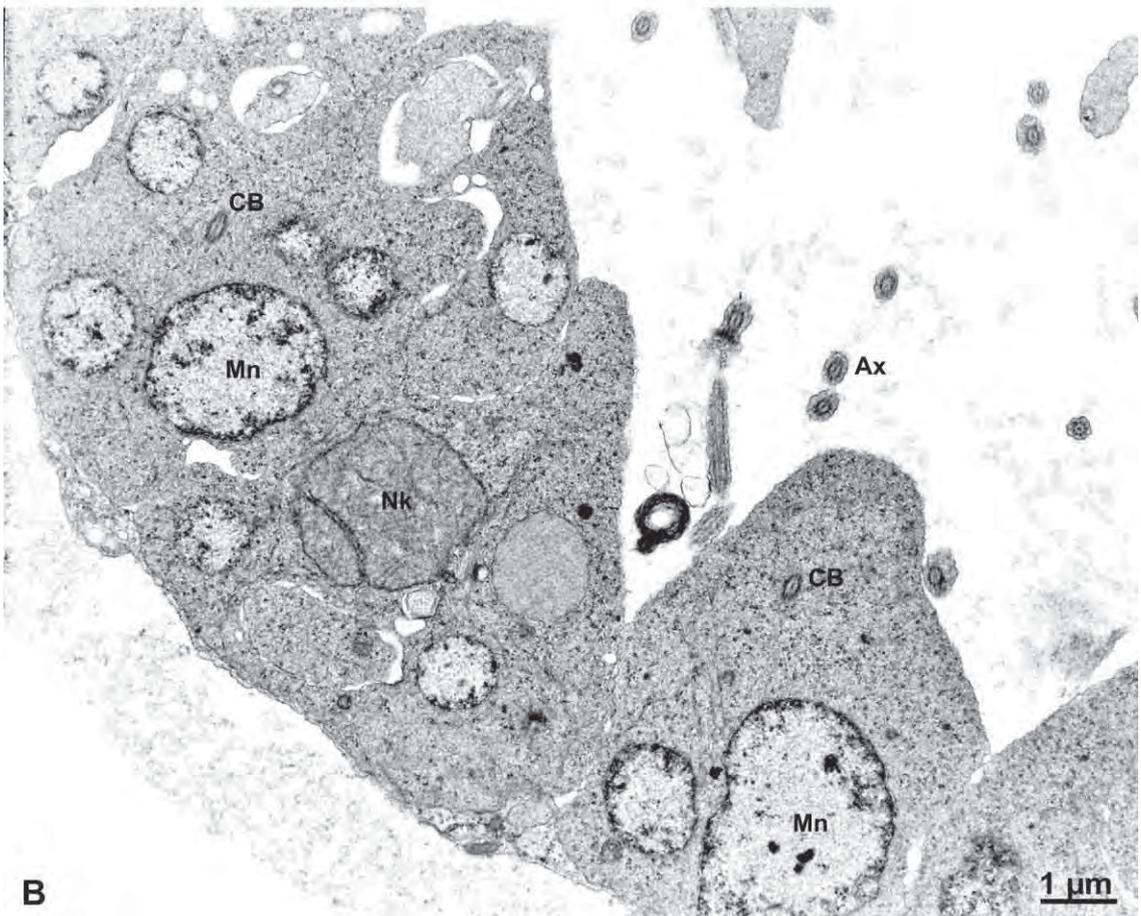
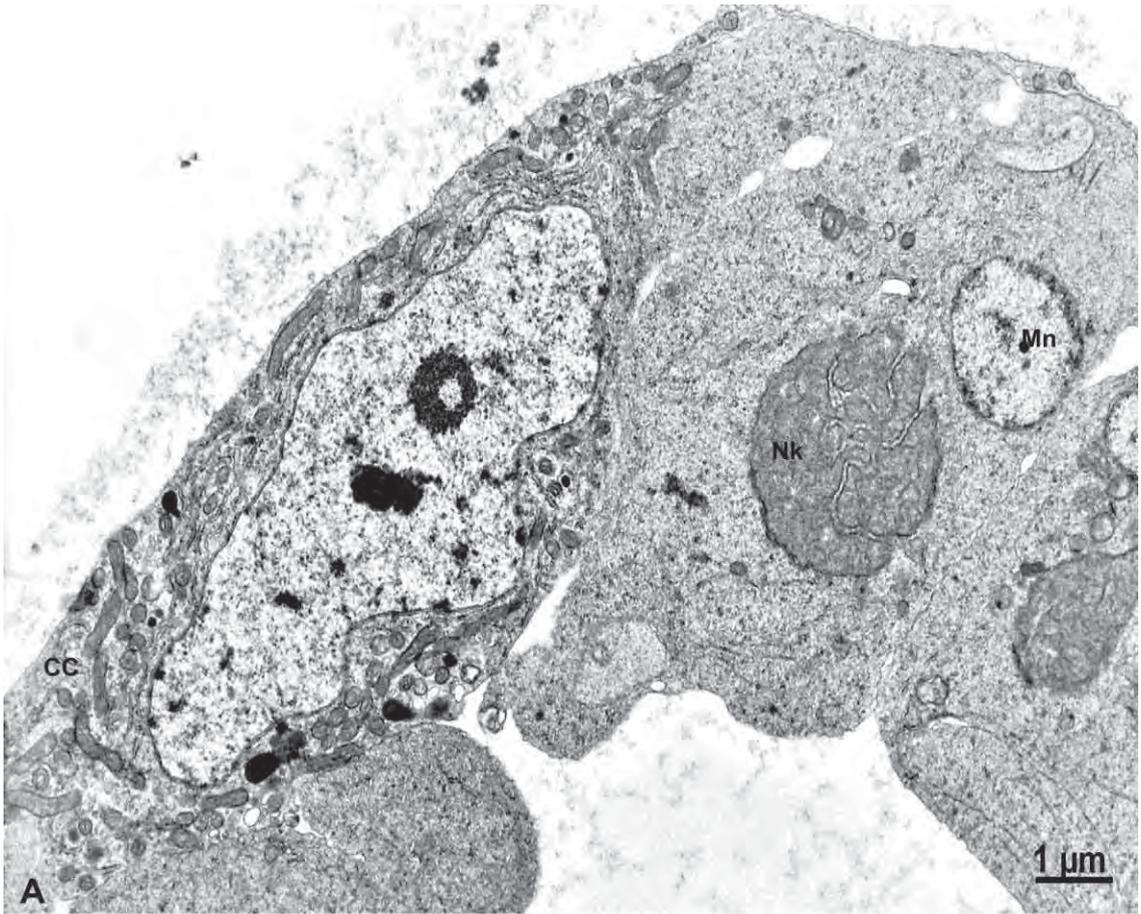


FIGURA 10

Eletromicrografias de espermátides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Espermátide em alongamento com presença de micronúcleos (Mn). Micronúcleo isolado no interior de um vacúolo (V) citoplasmático. Nebenkern (Nk) em processo de divisão. Retículo endoplasmático rugoso (RER).
- B)** Cisto de espermátides em alongamento com micronúcleos (Mn) ao longo das células. Observa-se a presença de “nebenkern” (Nk) em divisão com axonema (Ax) posicionado entre as duas estruturas.

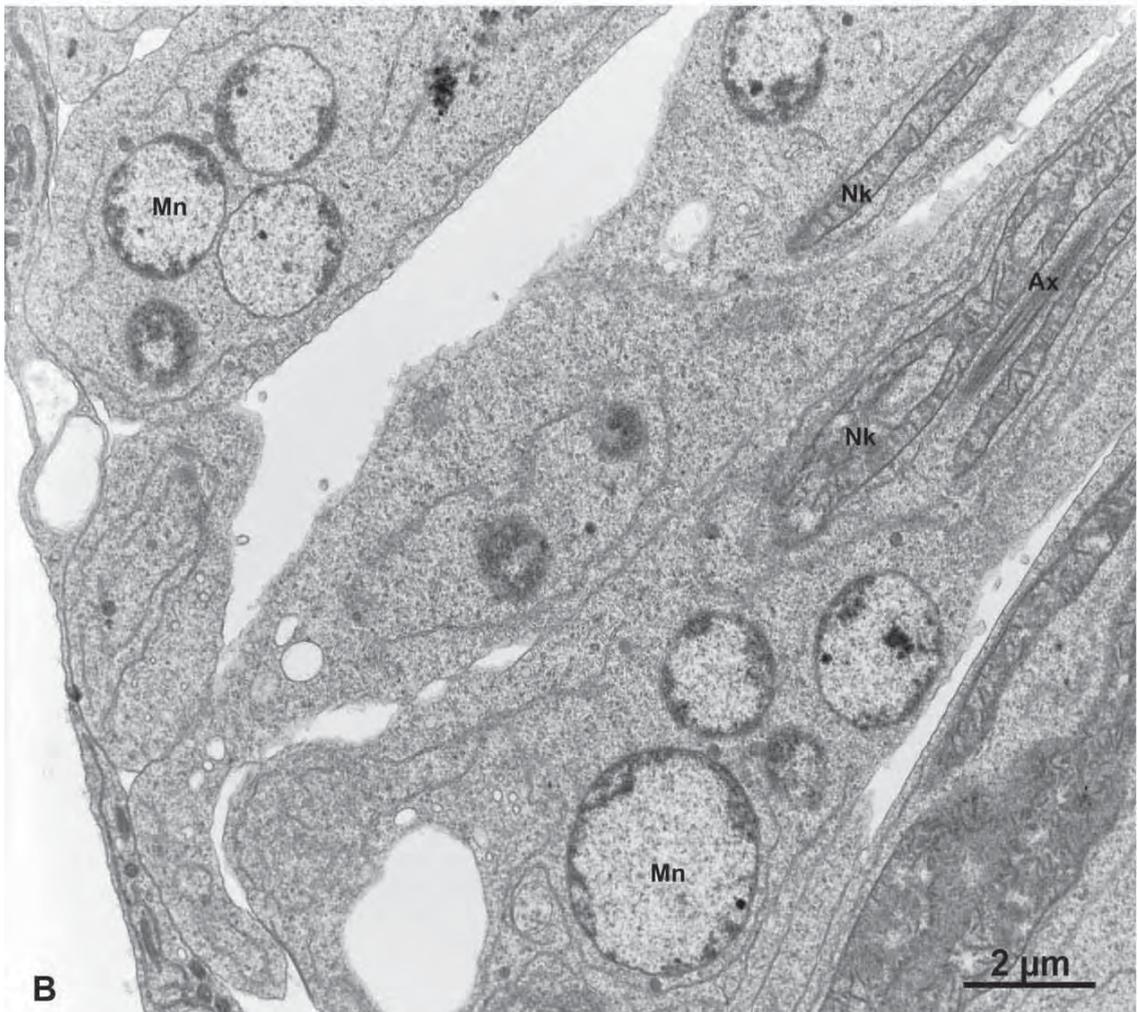
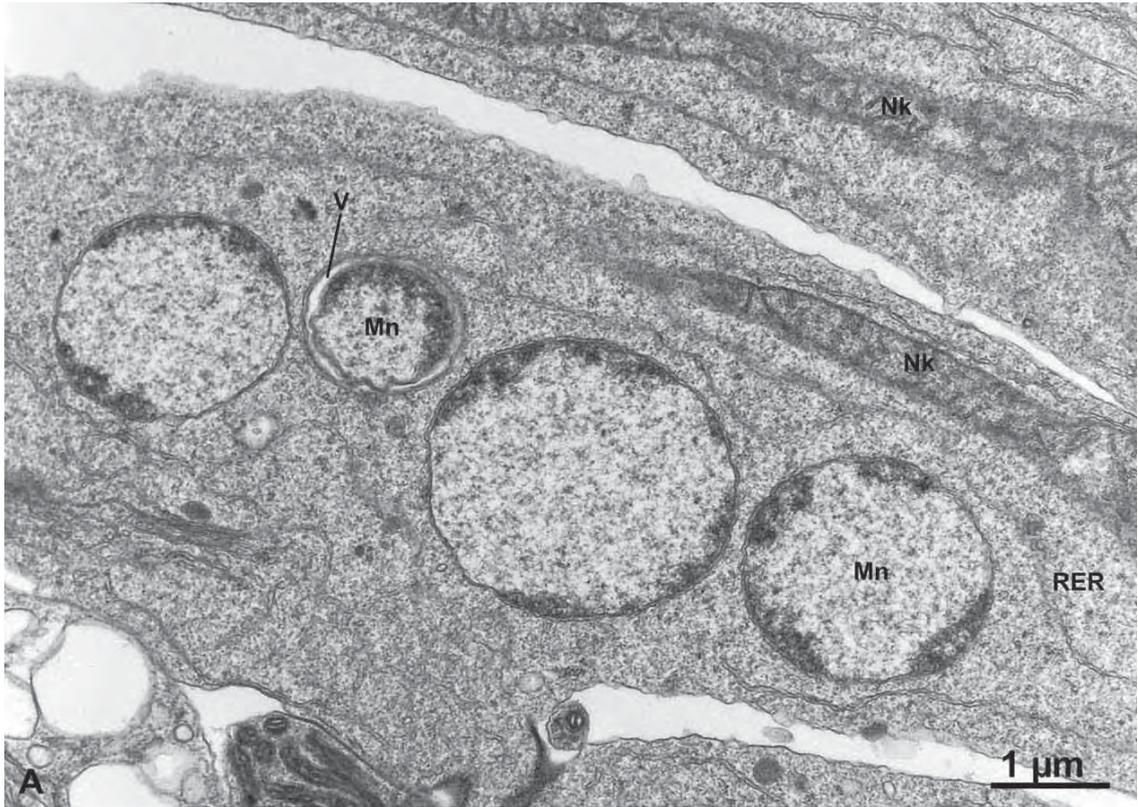


FIGURA 11

Eletromicrografias de espermátides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Corte transversal de flagelos interligados por meio de pontes citoplasmáticas (PC) circundadas por anéis densos. Axonema (Ax) com arranjo do tipo “9+2”, ladeados por dois derivados mitocondriais (DM).

- B)** Corte longitudinal do corpúsculo basal (CB) da espermátide de onde parte um axonema (Ax) com arranjo do tipo “9+2” microtúbulos.

- C)** Detalhe de axonema (Ax) com arranjo microtubular do tipo “9+2”.

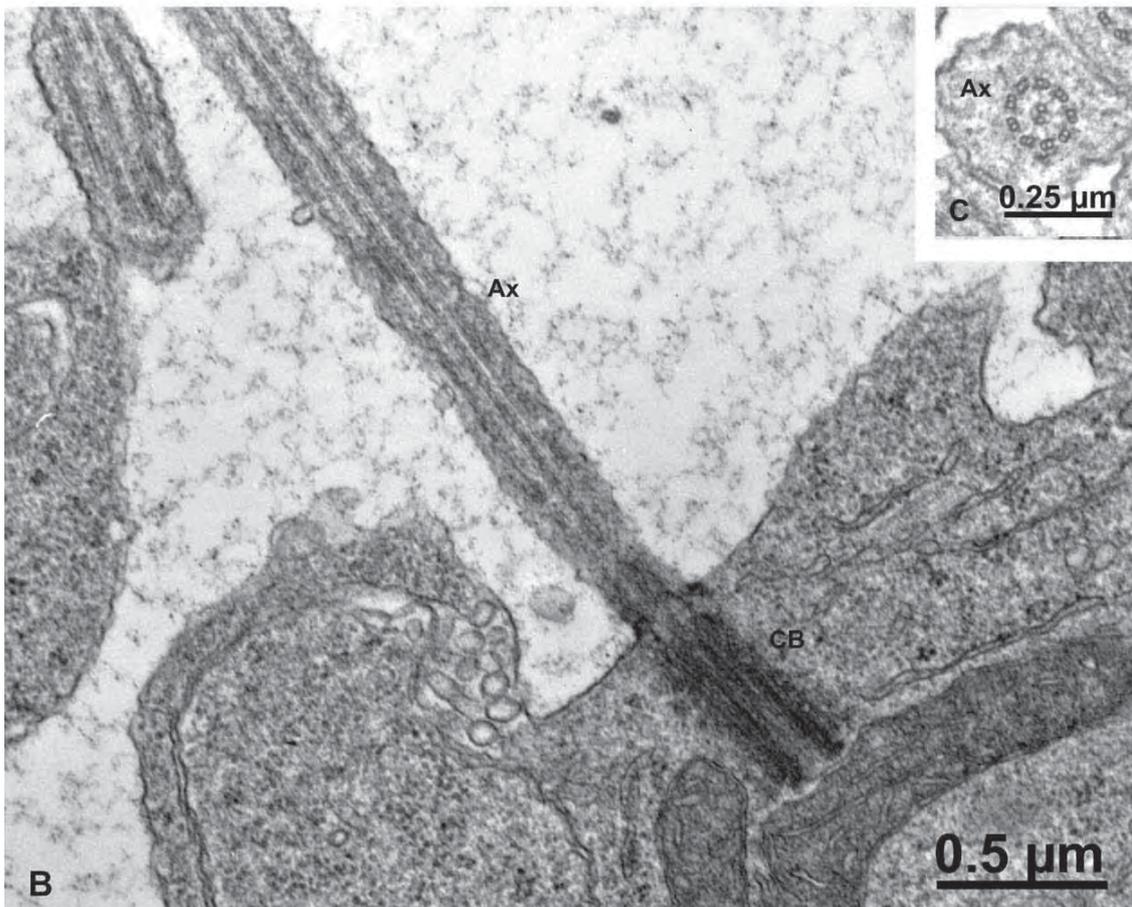
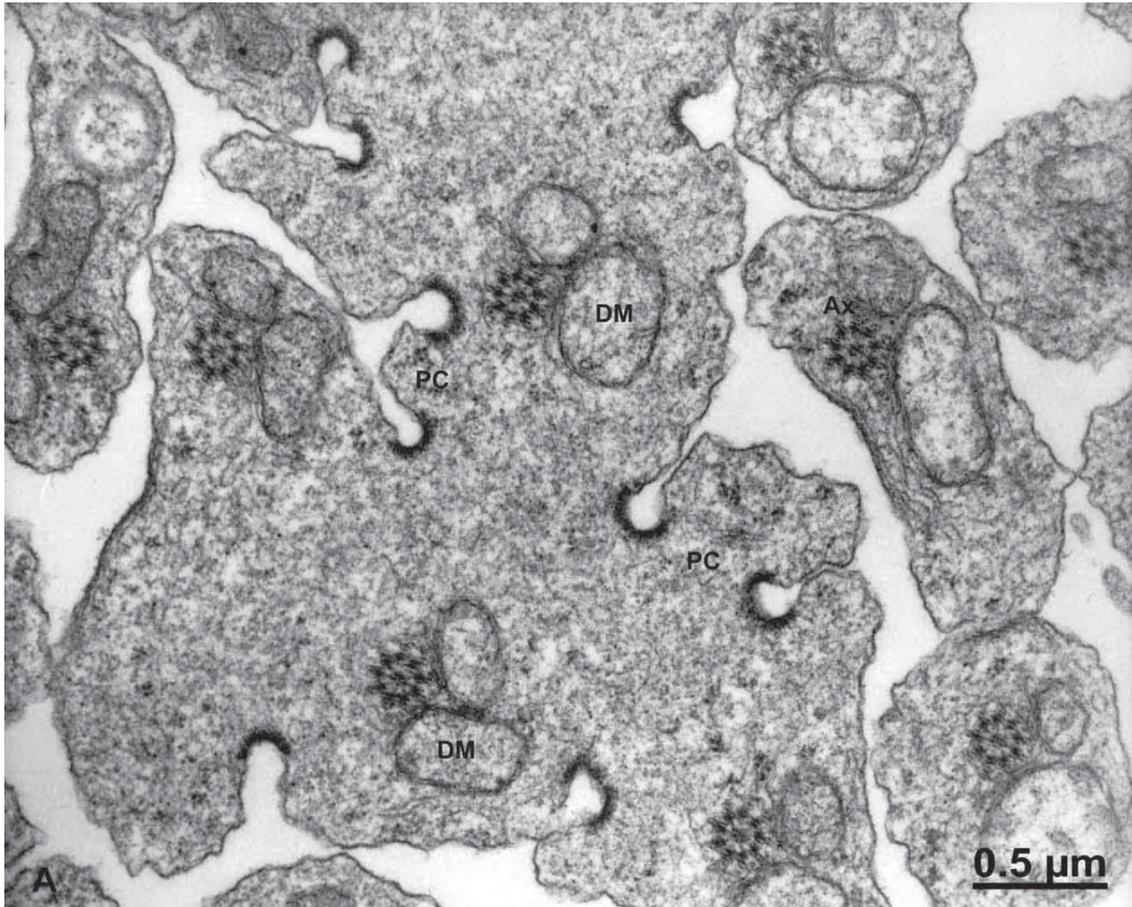


FIGURA 12

Eletromicrografias de espermátides e espermatozóides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Corte transversal de cisto de espermátide apirene exibindo a região flagelar com axonema (Ax) com arranjo de “9+9+2” microtúbulos, sendo 9 microtúbulos acessórios densos, 9 pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. Dois derivados mitocondriais (DM) com formato de “sola de sapato” apresentando internamente região elétron-densa. Microtúbulos (Mc) posicionados entre e lateralmente aos derivados mitocondriais.

- B)** Corte transversal de um cisto de espermatozóides apirenes envolvidos por célula cística (CC) exibindo a região flagelar.

- C)** Corte transversal de cisto de espermatozóides apirenes evidenciando a região do flagelo. Cisto individualizado por célula cística (CC).

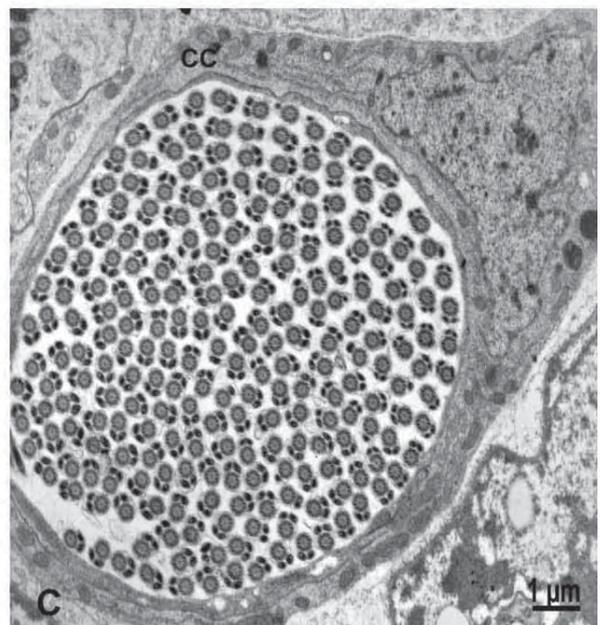
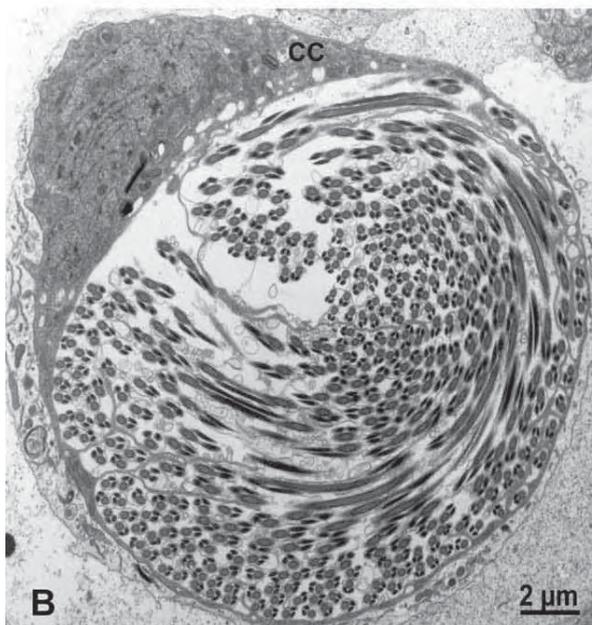
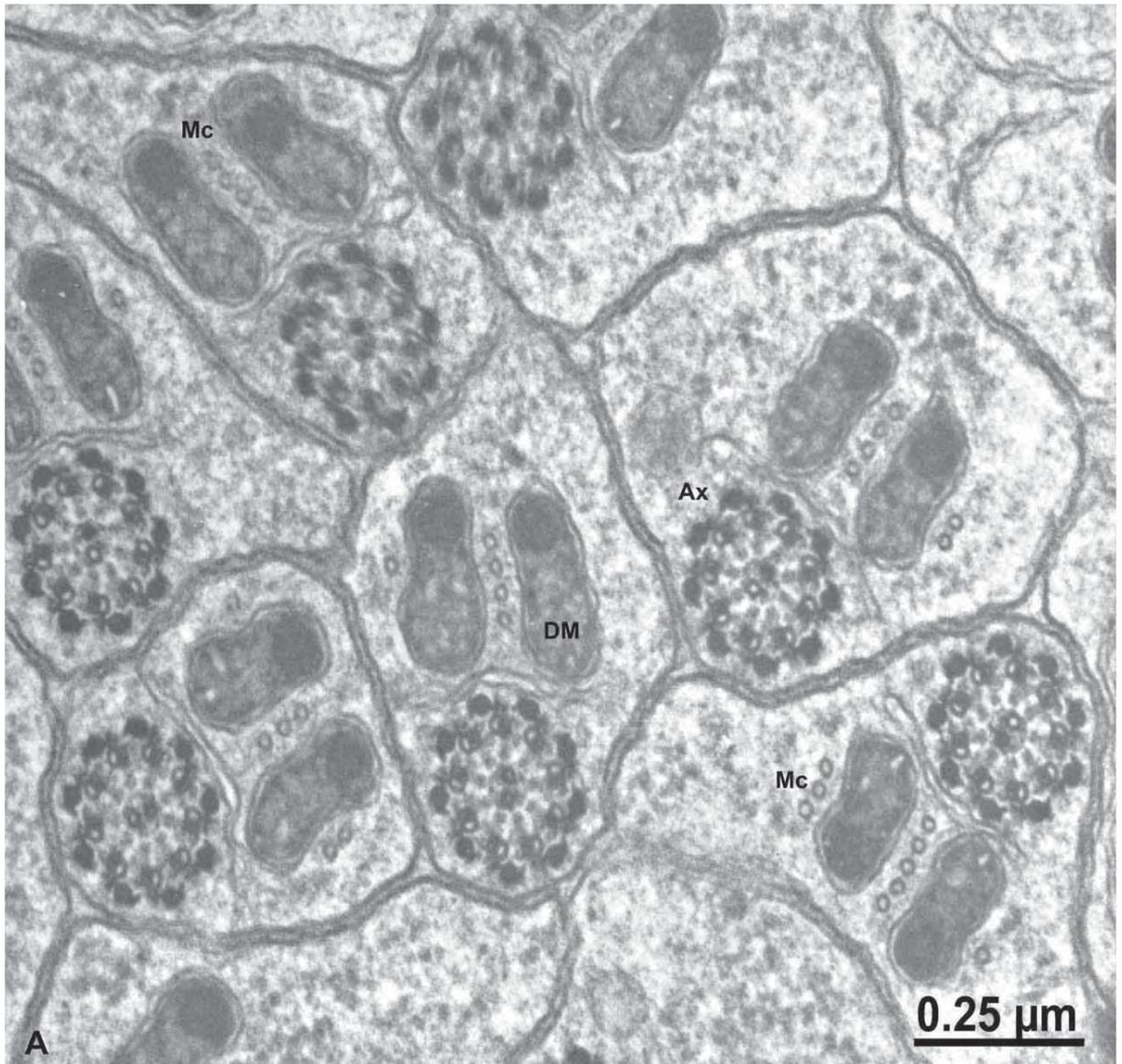


FIGURA 13

Eletromicrografias de espermatozóides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermatozóides em corte transversal exibindo diferentes planos de corte. Notar as regiões anteriores (RA) dos espermatozóides bem como as regiões flagelares (RF). Os espermatozóides estão mergulhados no citoplasma das células císticas (CC). É possível observar o capuz denso (CD) que encobre a região anterior dos espermatozóides. Cisto individualizado por célula cística (CC)
- B)** Corte transversal de regiões proximais de espermatozóides apirenes em diferentes níveis, mergulhados no citoplasma da célula cística; mostrando a extremidade mais anterior do espermatozóide, ao nível do capuz denso (CD), (1) até a região inicial do flagelo (5). Complexo de Golgi (G) da célula cística.
- C)** Corte transversal de porções anteriores (1, 2, 3) dos espermatozóides em diferentes alturas no citoplasma da célula cística.

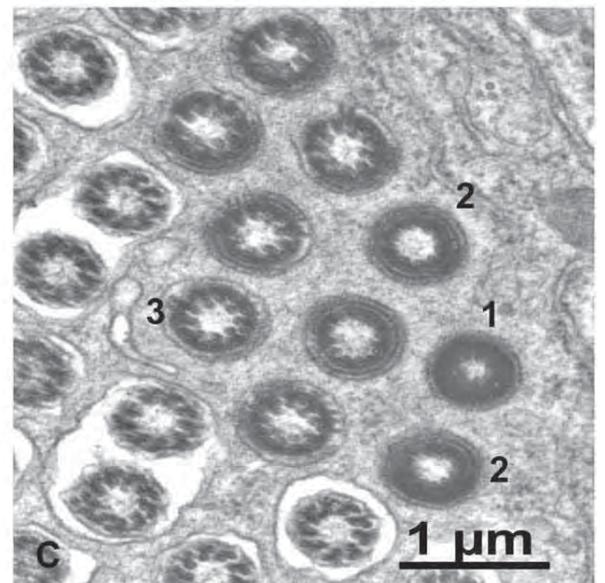
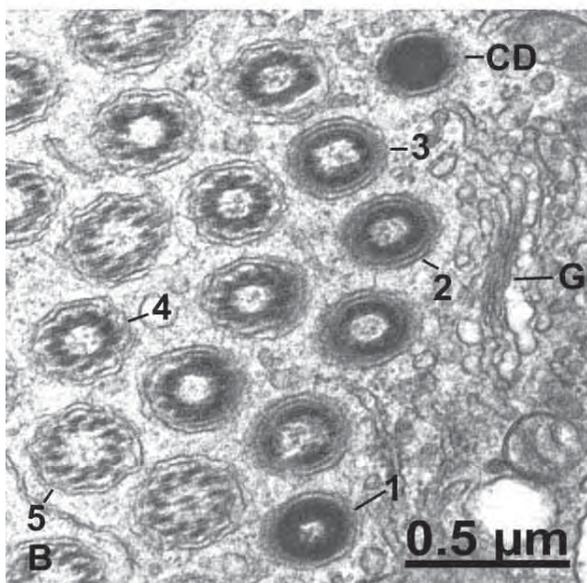
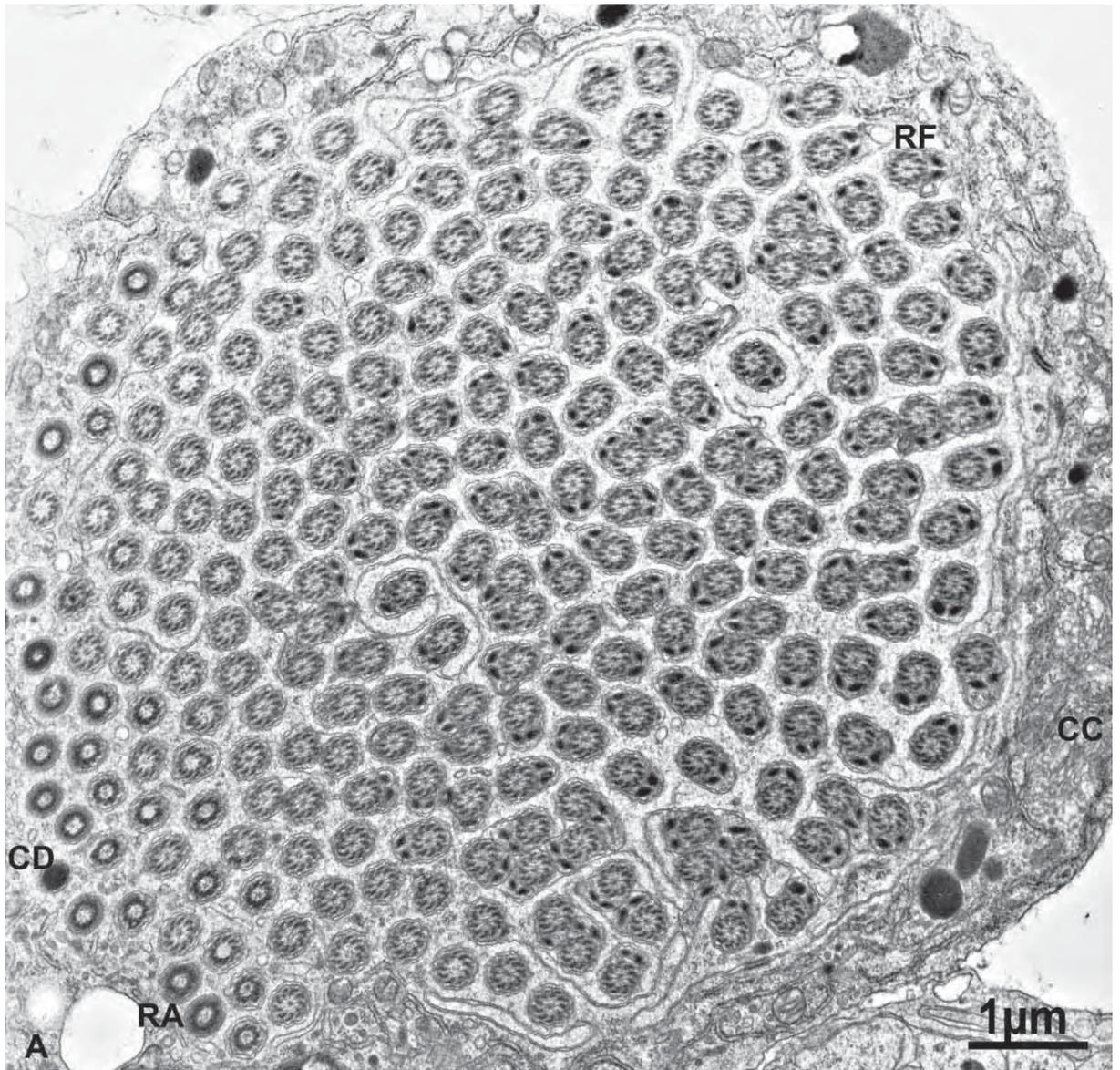


FIGURA 14

Eletromicrografias de espermatozóides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Corte transversal ao nível dos flagelos de espermatozóides apirenes. Flagelo composto por axonema (Ax) com padrão microtubular “9+9+2” sendo 9 microtúbulos acessórios densos, 9 pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais, sendo que em algumas imagens observa-se que um desses microtúbulos é denso. Além do axonema, o flagelo compõe-se por dois derivados mitocondriais (DM) muito elétrondensos com regiões internas paracristalinas; os derivados mitocondriais apresentam uma disposição em “V”.
- B)** Corte transversal das regiões flagelares de espermatozóides apirenes. Flagelo composto por axonema (Ax) e dois derivados mitocondriais (DM) bastante elétrondensos com regiões internas paracristalinas. Notar desorganização do axonema (1,2,3) de acordo com a aproximação da extremidades final do flagelo.

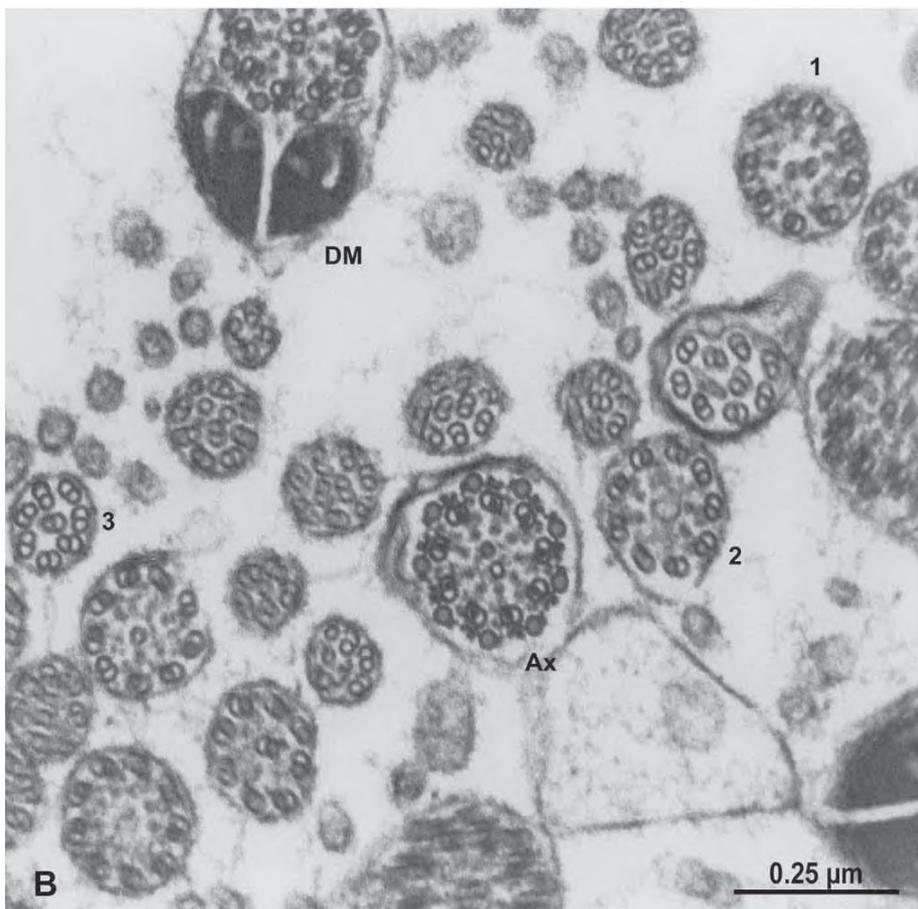
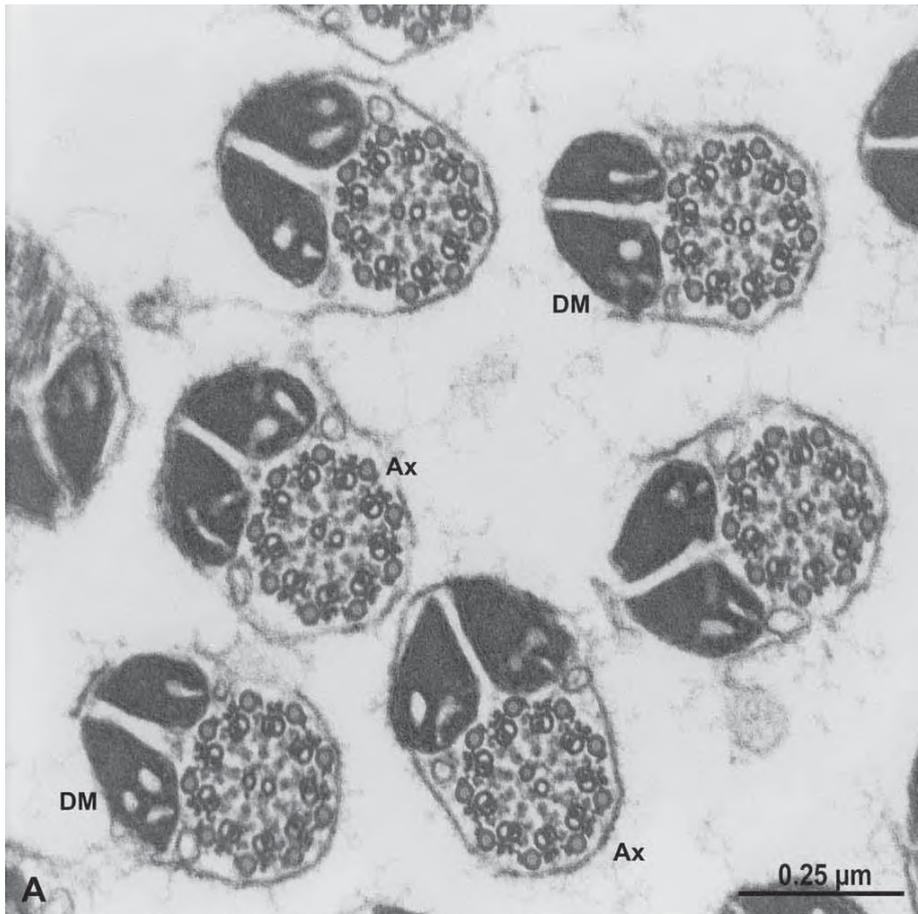


FIGURA 15

Eletromicrografias de espermátides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermátides apirenes em corte transversal; as células possuem formato arredondado e encontram-se em estágios iniciais de desenvolvimento; apresentam grande volume citoplasmático no qual se encontram micronúcleos (Mn) espalhados. Observa-se também a presença de complexos mitocondriais ou “nebenkern” (Nk) em formação.
- B)** Detalhe do cisto de espermátides. O cisto encontra-se individualizado por célula cística (CC) a qual apresenta mitocôndrias (Mi) espalhadas pelo citoplasma. As células apresentam citoplasma bastante volumoso no qual se observa retículo endoplasmático rugoso (RER), micronúcleos (Mn) e “nebenkern” em formação (Nk).

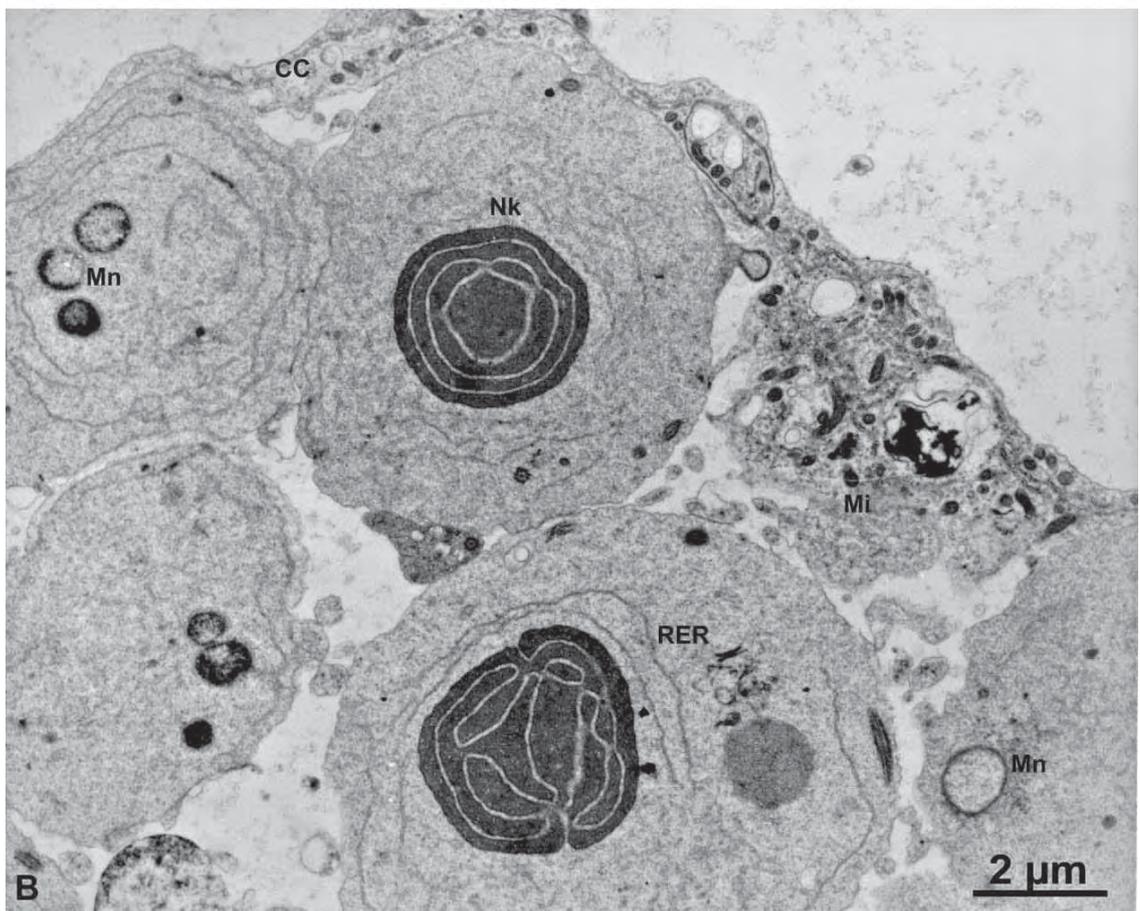
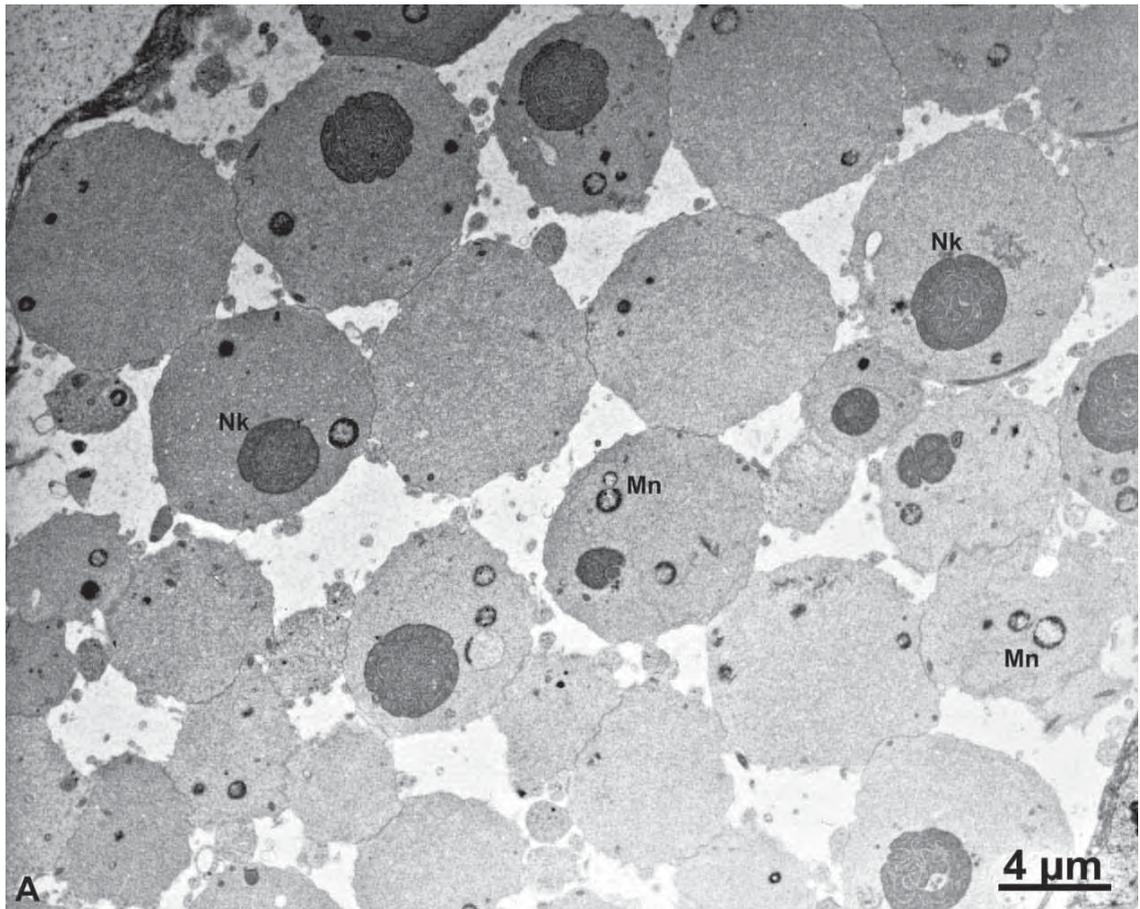


FIGURA 16

Eletromicrografias de espermátides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermátides apirenes envolto por célula cística (CC) com citoplasma apresentando grande quantidade de mitocôndrias (Mi), núcleo (N) volumoso e irregular com nucléolo (Nu) evidente. As espermátides possuem grande volume citoplasmático onde encontramos grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER); observa-se também a presença de micronúcleos (Mn) e complexo mitocondrial ou “nebenkern” (Nk).
- B)** Detalhe de cisto de espermátides exibindo citoplasma volumoso com retículo endoplasmático rugoso (RER), corpúsculo basal (CB), micronúcleos (Mn) e “nebenkern” (Nk).

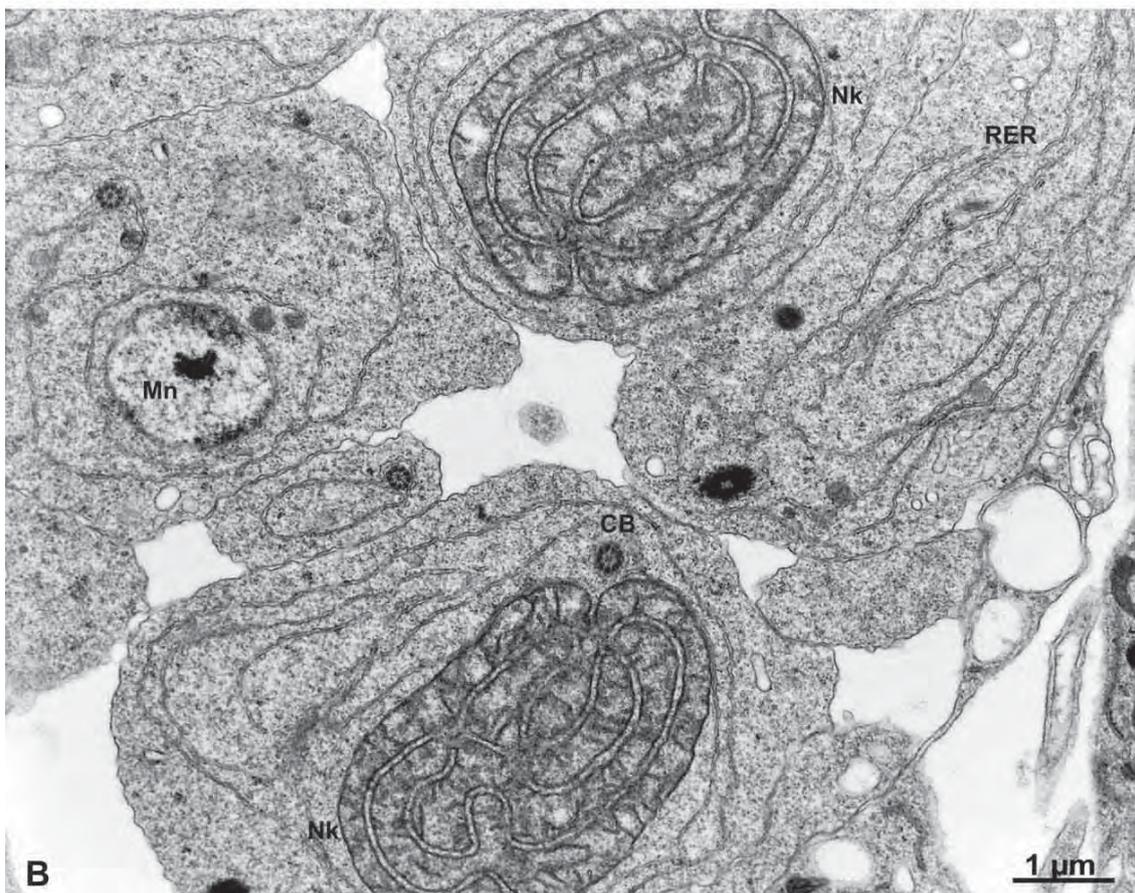
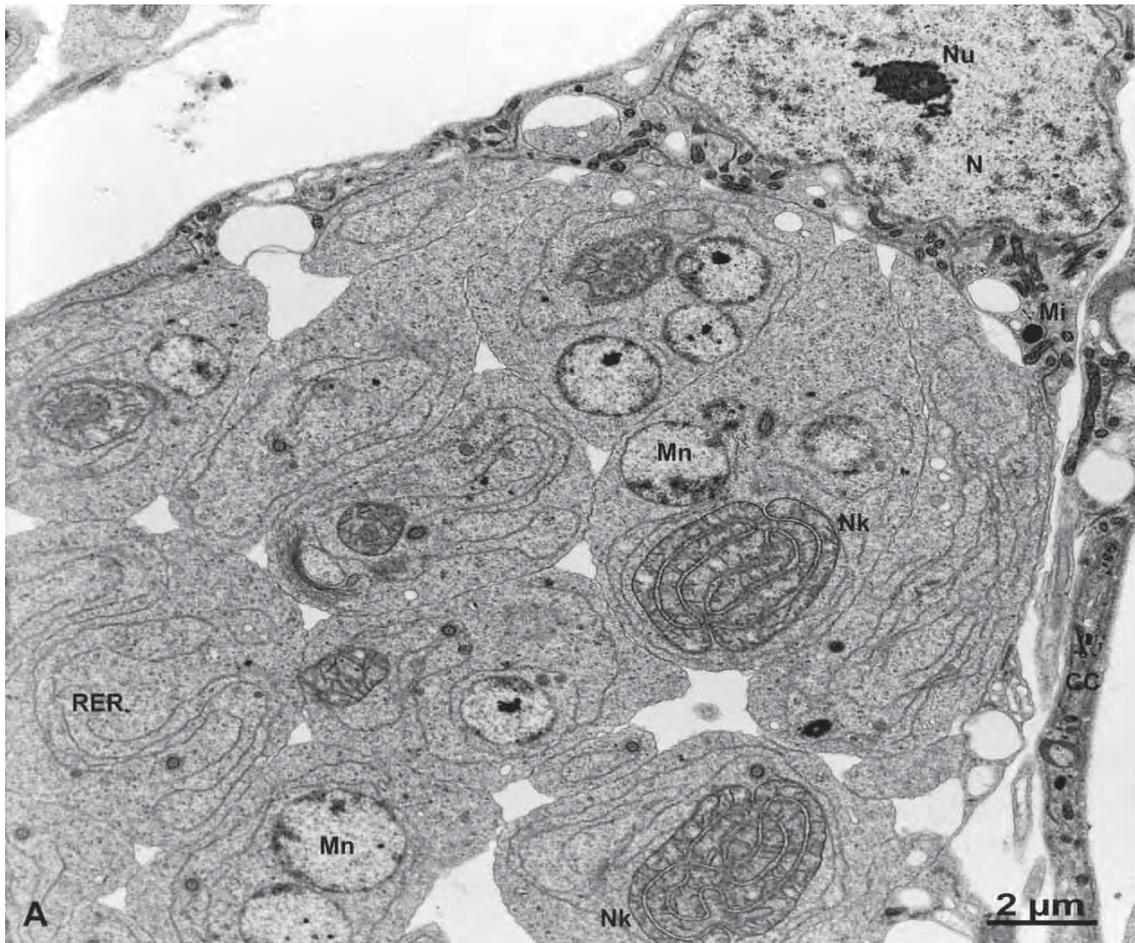


FIGURA 17

Eletromicrografias de espermátides apirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Corte transversal de espermátide apirene evidenciando um complexo mitocondrial ou “nebenkern” (Nk) em estágio conhecido como “bolota de barbante” e localizado próximo ao micronúcleo (Mn).

- B)** Corte transversal de espermátide mostrando complexos mitocondriais ou “nebenkern” (Nk) em etapa denominada “bolota de barbante”.

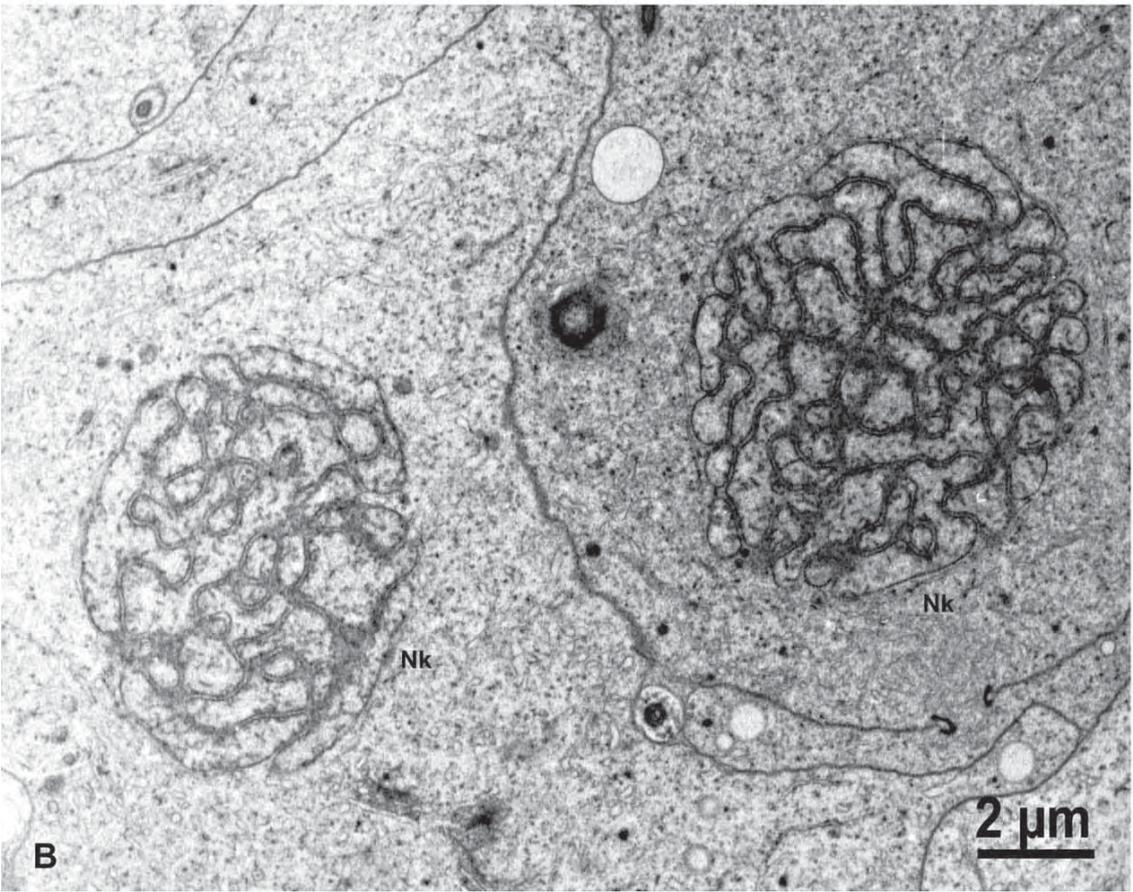
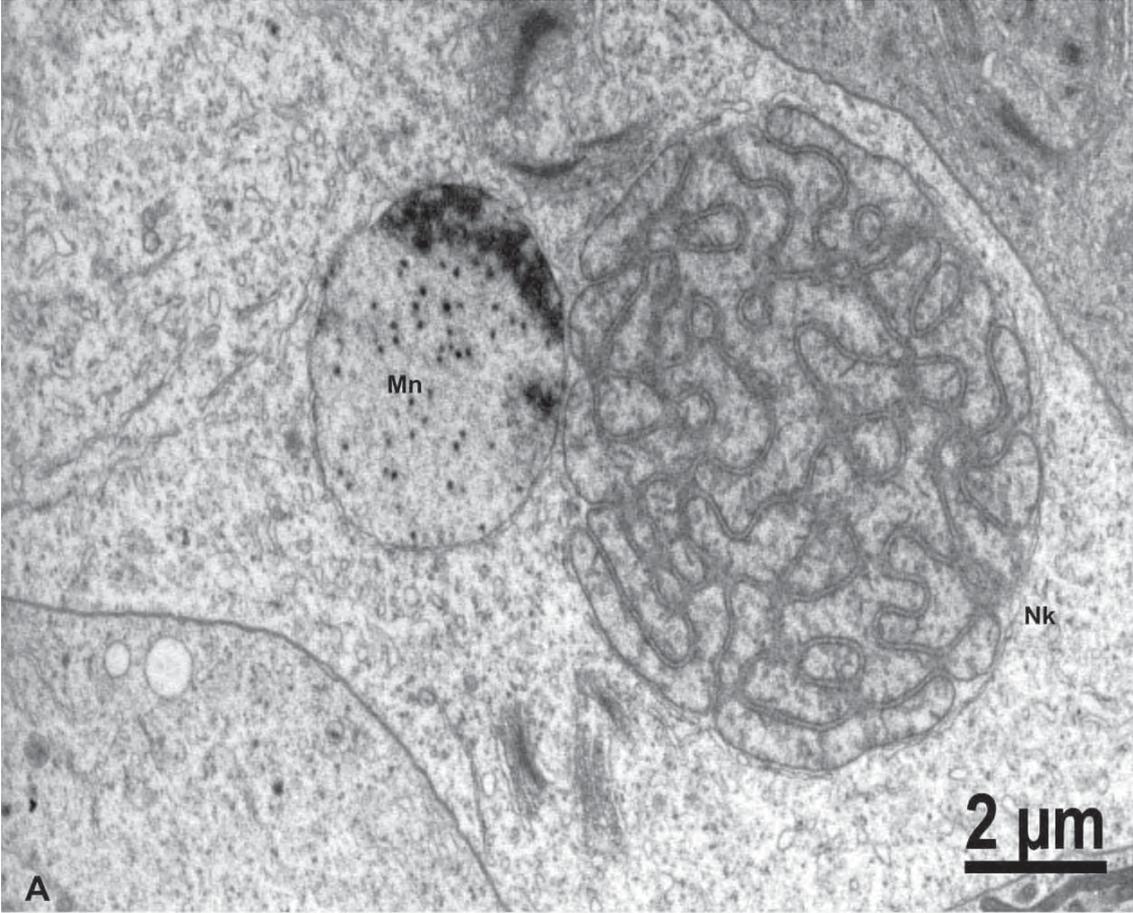


FIGURA 18

Eletromicrografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Espermátides eupirenes em processo de alongamento com volume citoplasmático ocupado em sua maior parte por complexo mitocondrial ou "nebenkern" (Nk) em etapa anterior a de sua divisão. Em algumas células é possível observar a presença de núcleo circular (N).
- B)** Espermátides eupirenes em alongamento com citoplasma volumoso no qual se encontram derivados mitocondriais (DM) em divisão. Observa-se a presença de núcleo circular e volumoso (N) em algumas células.

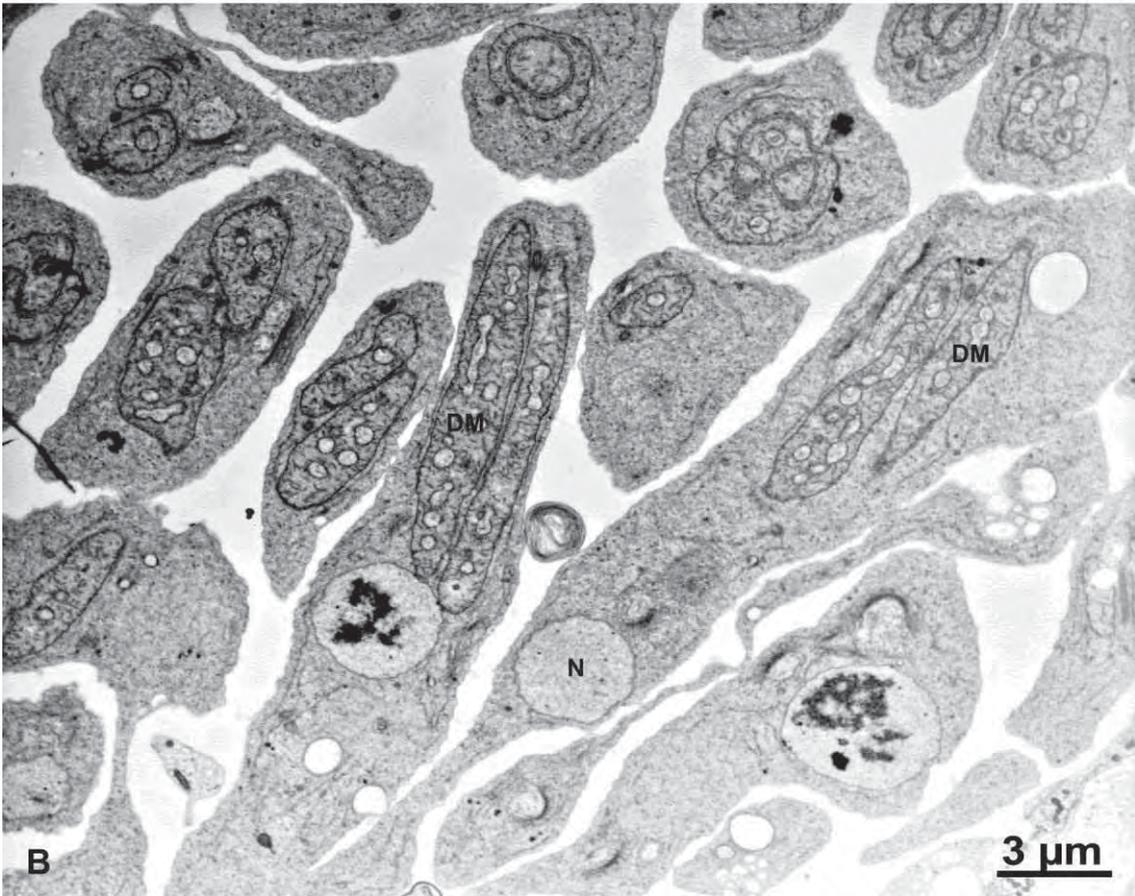


FIGURA 19

Eletromicrografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Espermátide eupirene alongada em corte longitudinal evidenciando núcleo (N) circular e bastante volumoso com corpúsculo basal (CB), do qual parte o axonema (Ax). Nota-se a presença de acrossoma (Ac) atado a membrana celular.
- B)** Espermátides eupirenes alongadas em corte transversal evidenciando núcleo (N) circular e bastante volumoso com axonema (Ax) inserido neste e apresentando padrão microtubular do tipo “9+9+2”. Derivados mitocondriais (DM) com disposição paralela entre si e localizados ao lado do núcleo. Presença de apêndice reticular (AR).

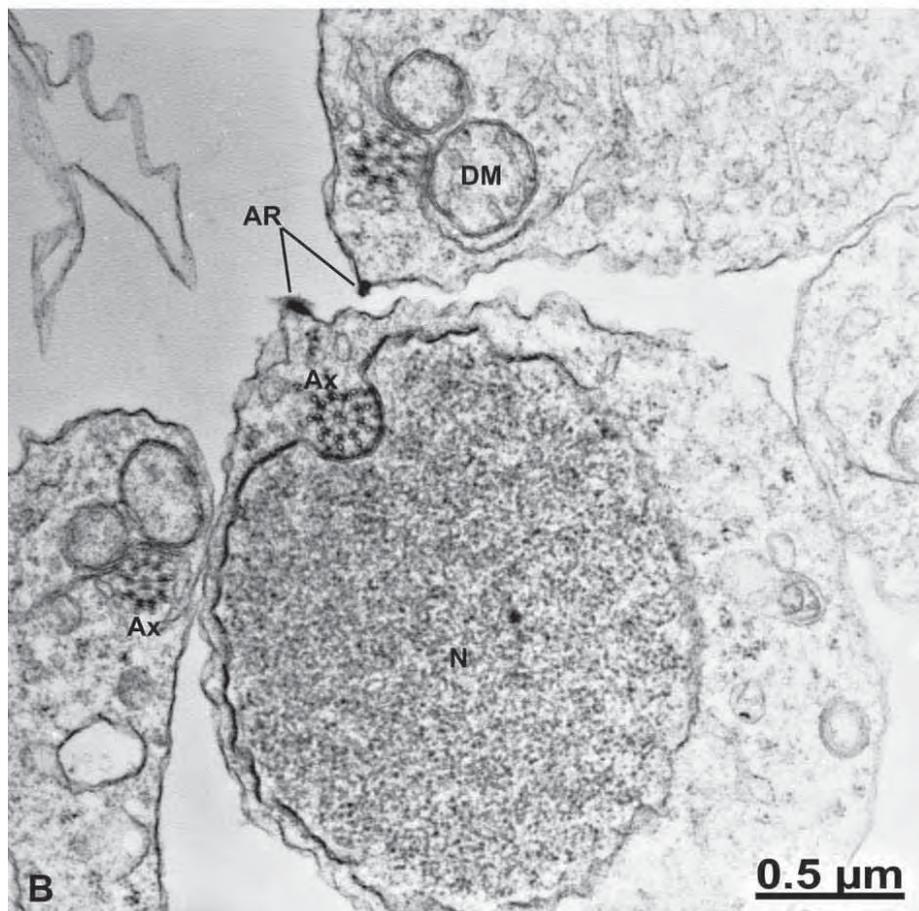
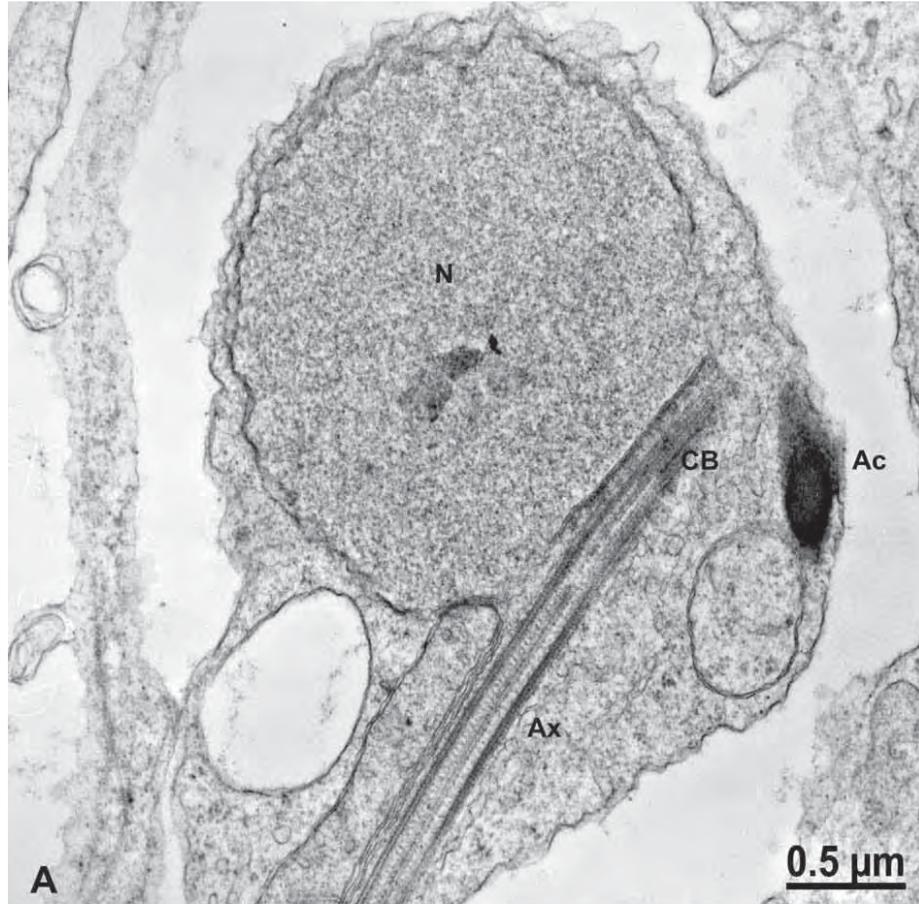


FIGURA 20

Eletromicrografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Espermátides eupirenes em alongamento com citoplasma contendo derivados mitocondriais (DM) finalizando divisão. Observam-se a presença de várias vesículas ao longo da espermátide, vesículas (V) que contém excesso de citoplasma celular e que será eliminado posteriormente pela extremidade distal da célula. Apêndice reticular (AR).
- B)** Espermátide eupirene alongada com núcleo (N) circular volumoso do qual se estende o axonema (Ax) ladeado por dois derivados mitocondriais (DM).

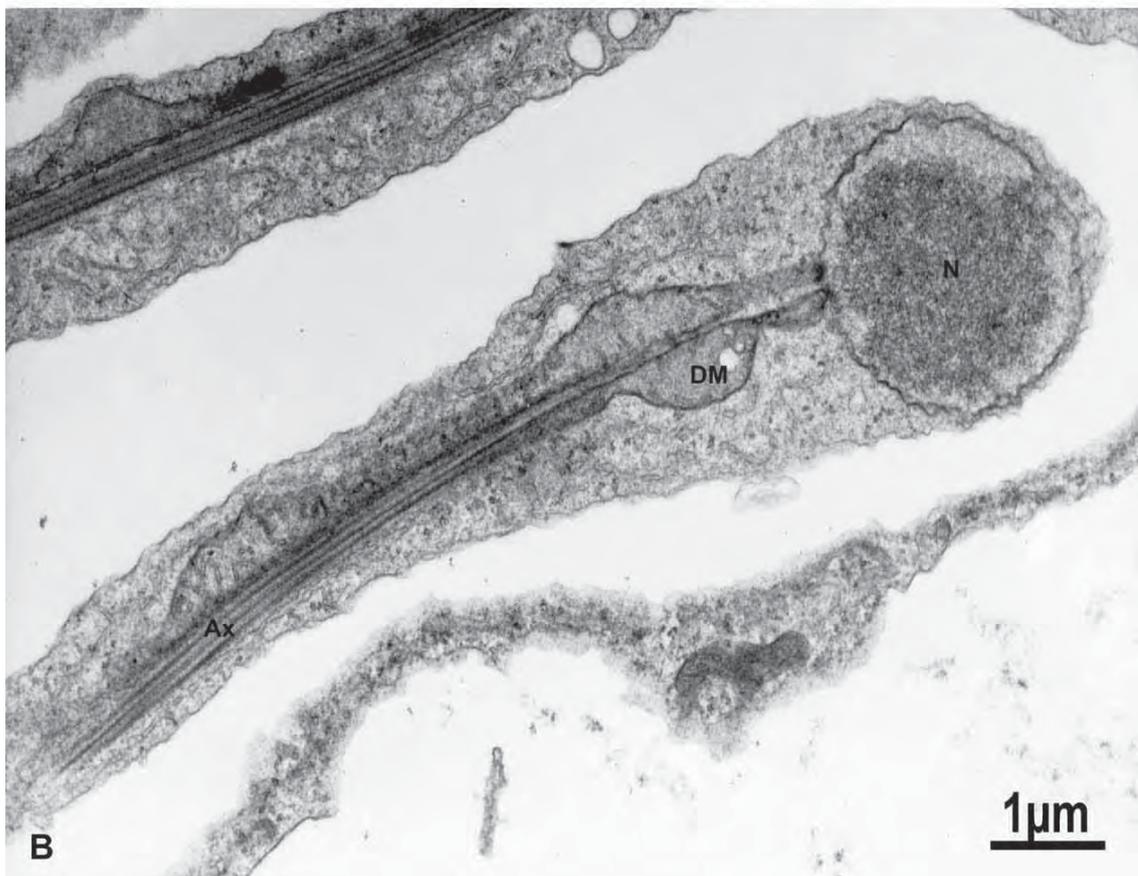
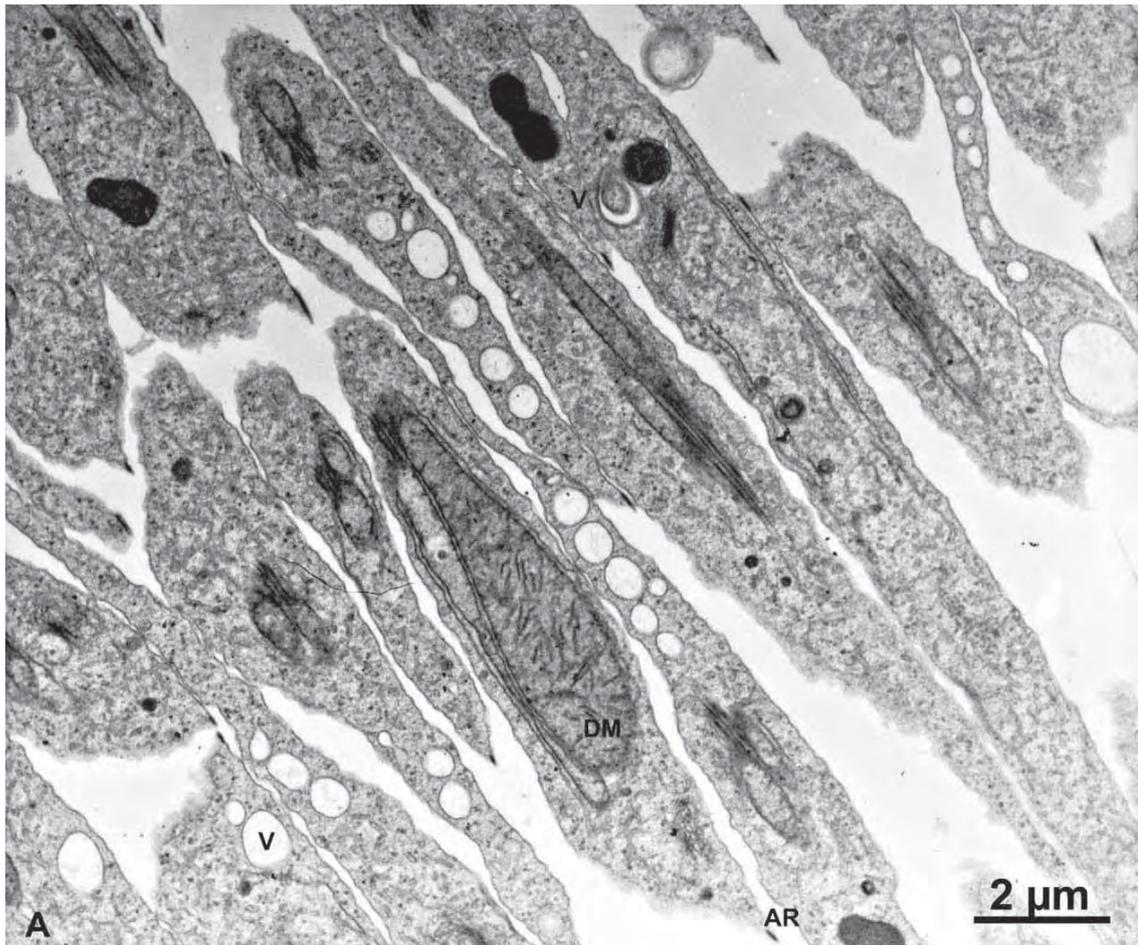


FIGURA 21

Eletromicrografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermátides eupirenes alongadas envolvido por célula cística (CC) a qual possui citoplasma com mitocôndrias (Mi); as espermátides possuem núcleo arredondado (N) e bastante volumoso e em alguns se nota acrossoma (Ac) atado. Em alguns núcleos também se observa corpúsculo basal (CB) inserido, do qual se estende o axonema (Ax). Derivados mitocondriais (DM) e apêndice reticular (AR).
- B)** Espermátide eupirene alongada com núcleo (N) circular com corpúsculo basal (CB) inserido e axonema (Ax) partindo deste. Acrossoma (Ac) atado ao núcleo e apêndice reticular (AR).
- C)** Detalhe do núcleo (N) de espermátide eupirene, acrossoma (Ac) atado ao núcleo e apêndice reticular (AR).

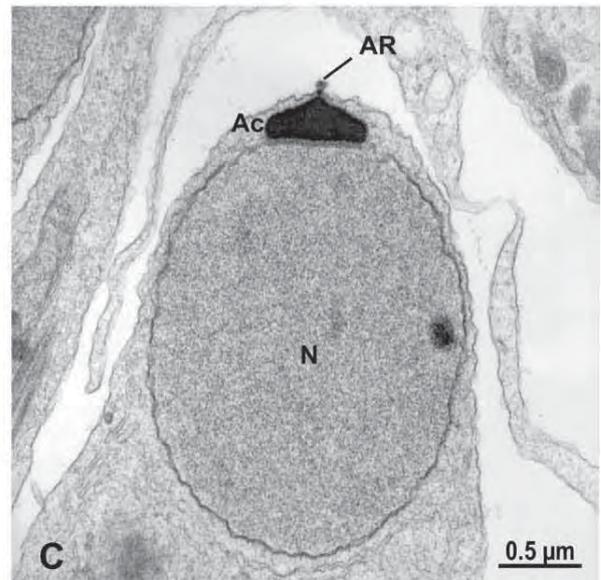
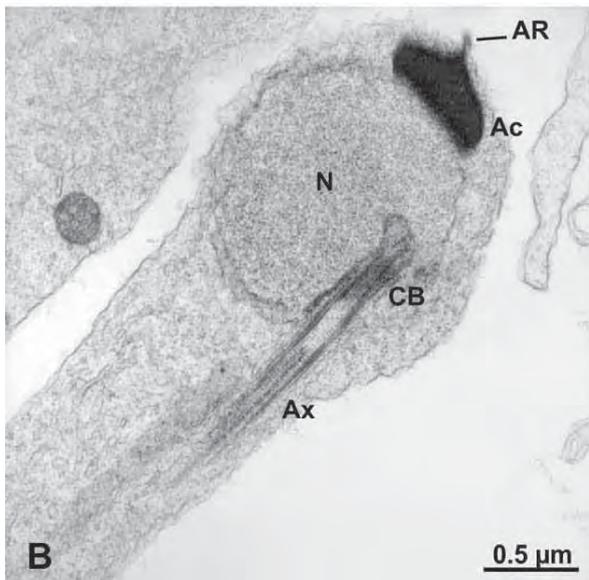
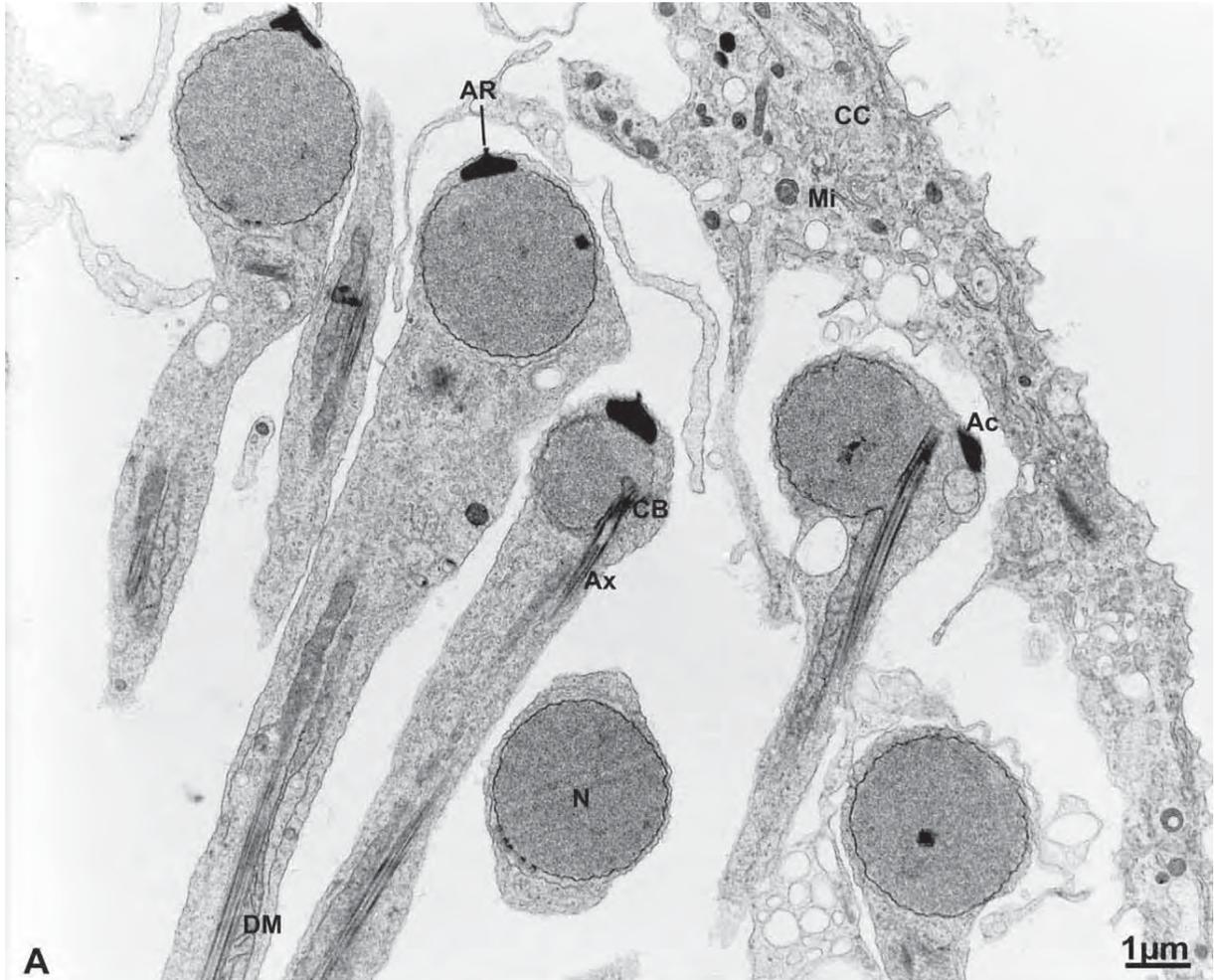


FIGURA 22

Eletronicografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A) Cisto de espermátides eupirenes alongadas envolvido por célula cística (CC). Espermátides com núcleo (N) circular, acrossoma alongado (Ac) atado ao núcleo, axonema (Ax) e derivados mitocondriais (DM).

- B) Detalhe do núcleo (N) de espermátide eupirene com corpúsculo basal (CB) e acrossoma (Ac).

- C) Espermátide evidenciando o núcleo (N) com acrossoma alongado (Ac).

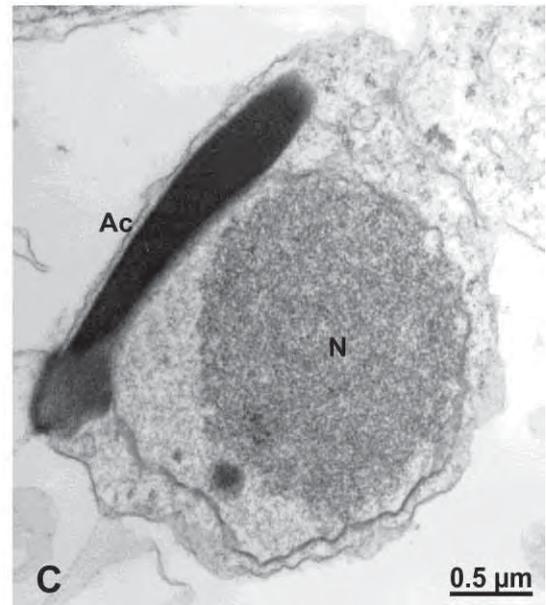
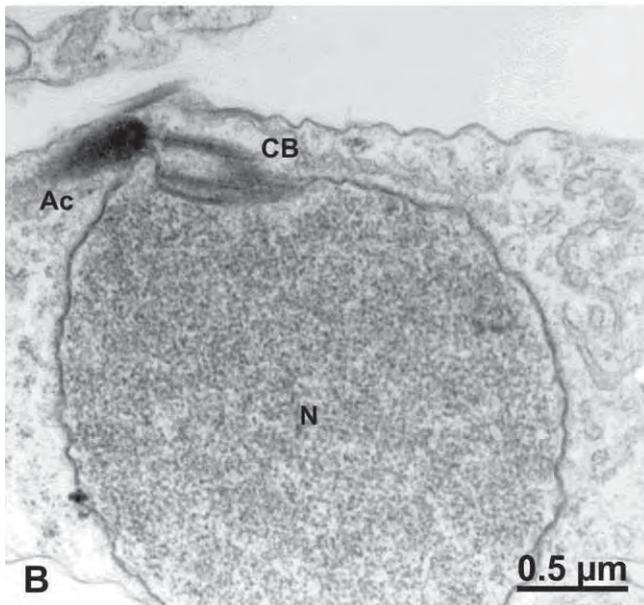
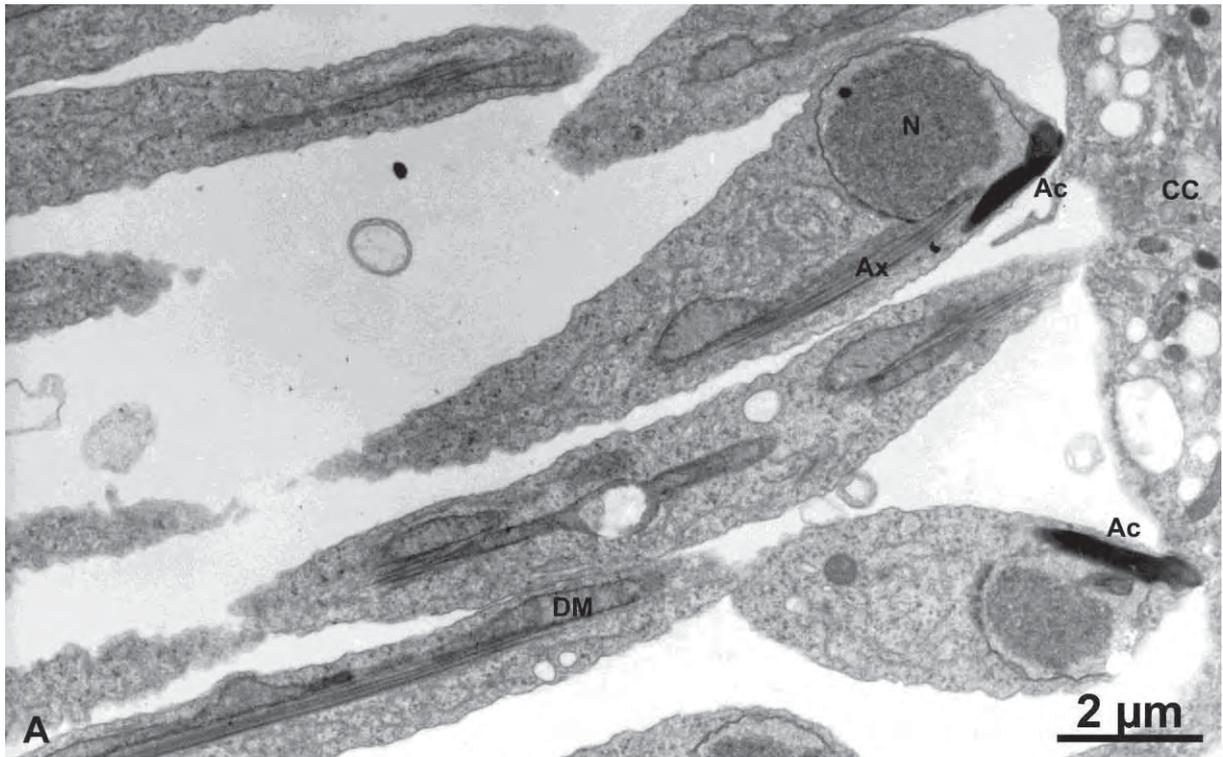


FIGURA 23

Eletronicografias de espermátides e espermatozóides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Estágio avançado da transformação do flagelo. Espermátide eupirene com axonema exibindo arranjo de microtúbulos do tipo “9+9+2”. O derivado mitocondrial maior (DM) apresenta-se elétron- denso e o derivado mitocondrial menor aparece mais elétron-transparente. Cisternas alongadas (Ci) contornando o axonema e os derivados mitocondriais. Fileiras simples de microtúbulos (Mc) citoplasmáticos posicionados próximos aos derivados mitocondriais e ao apêndice reticular. Apêndice reticular (AR) localizado em uma depressão da membrana plasmática e ligado a ela por meio de septos.
- B)** Corte transversal exibindo axonema (Ax) com padrão de organização microtubular do tipo “9+2”. Os derivados mitocondriais (DM) apresentam diferentes formas e tamanhos. Observam-se cisternas alongadas (Ci) ao redor dos derivados mitocondriais.
- C)** Corte transversal de espermatozóide eupirene mostrando a região flagelar com apêndice reticular (AR) e apêndices laciniados (AL) bem desenvolvidos; derivado mitocondrial (DM) e axonema (Ax) com padrão microtubular “9+9+2”.

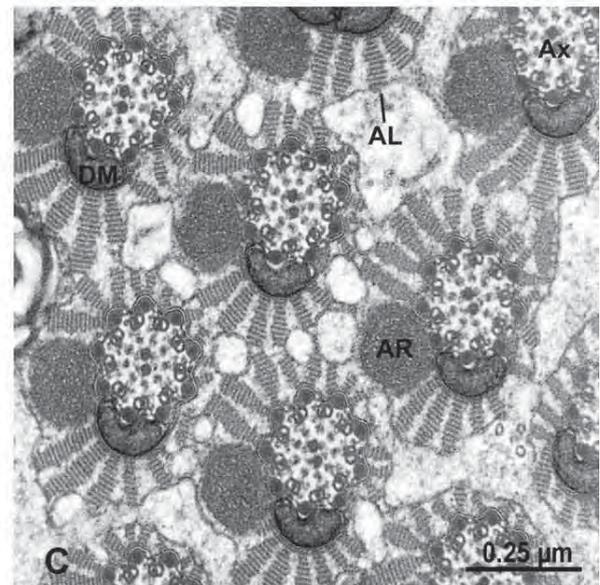
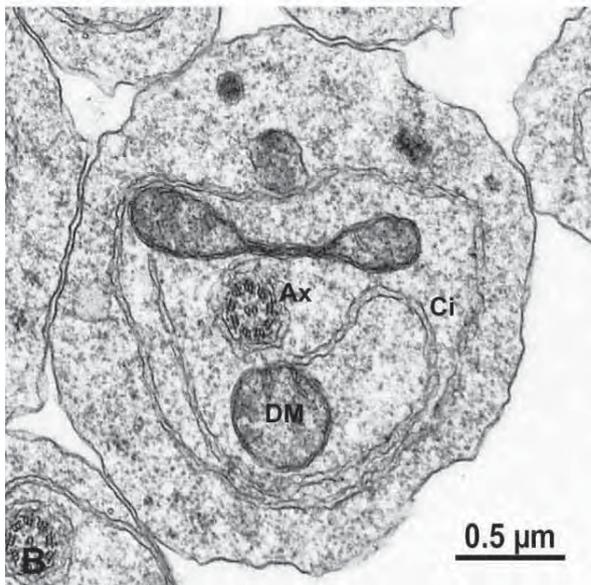
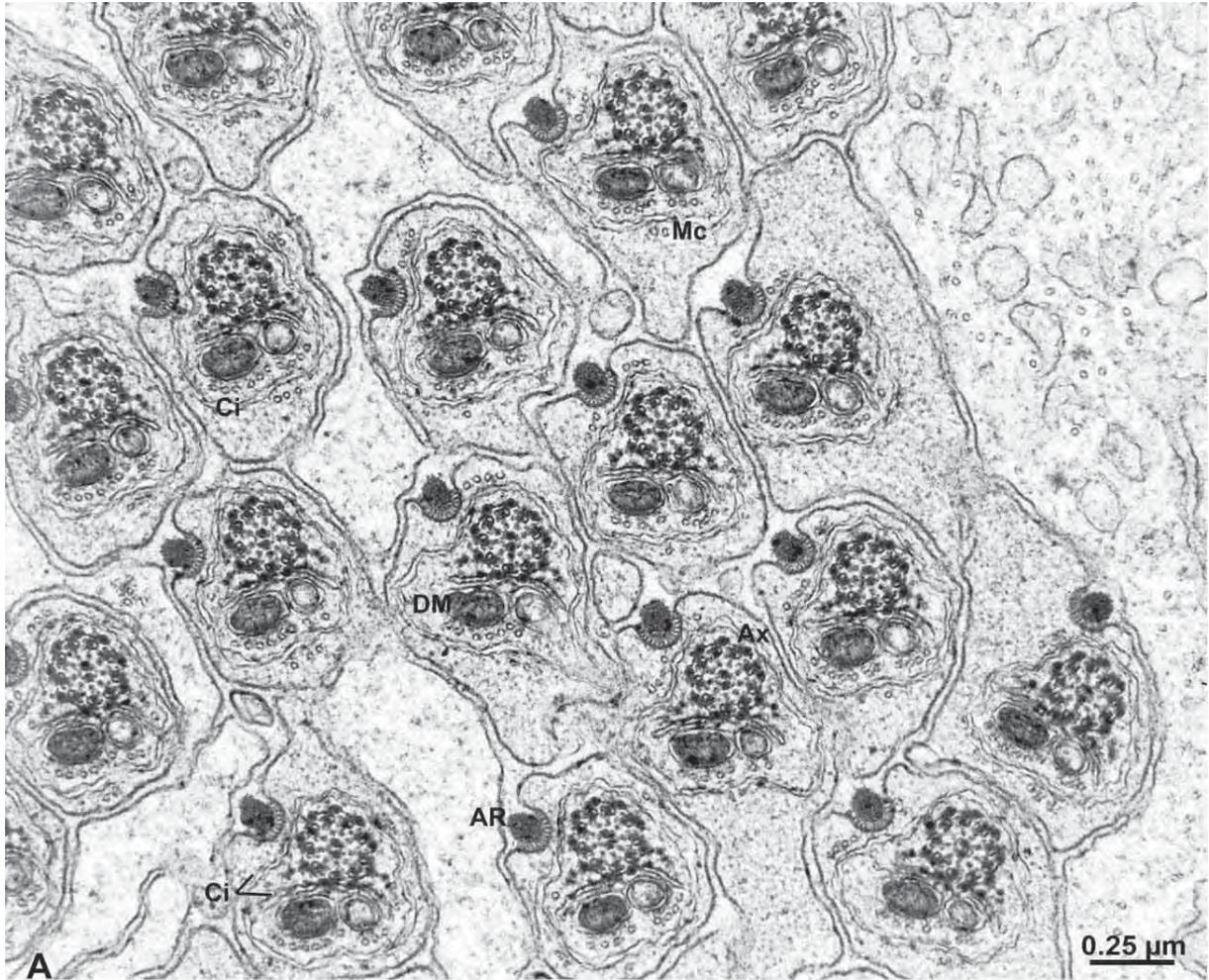


FIGURA 24

Eletromicrografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A) Cisto de espermátides eupirenes individualizado por célula cística, em corte transversal na região anterior das espermátides eupirenes.

- B) Espermátides eupirenes cortadas transversalmente no nível do núcleo (N), evidenciando o corpúsculo basal (CB) que está alojado em uma depressão no núcleo. O núcleo apresenta cromatina com aspecto granular; observa-se a presença de acrossoma tubular (Ac) e apêndice reticular (AR).

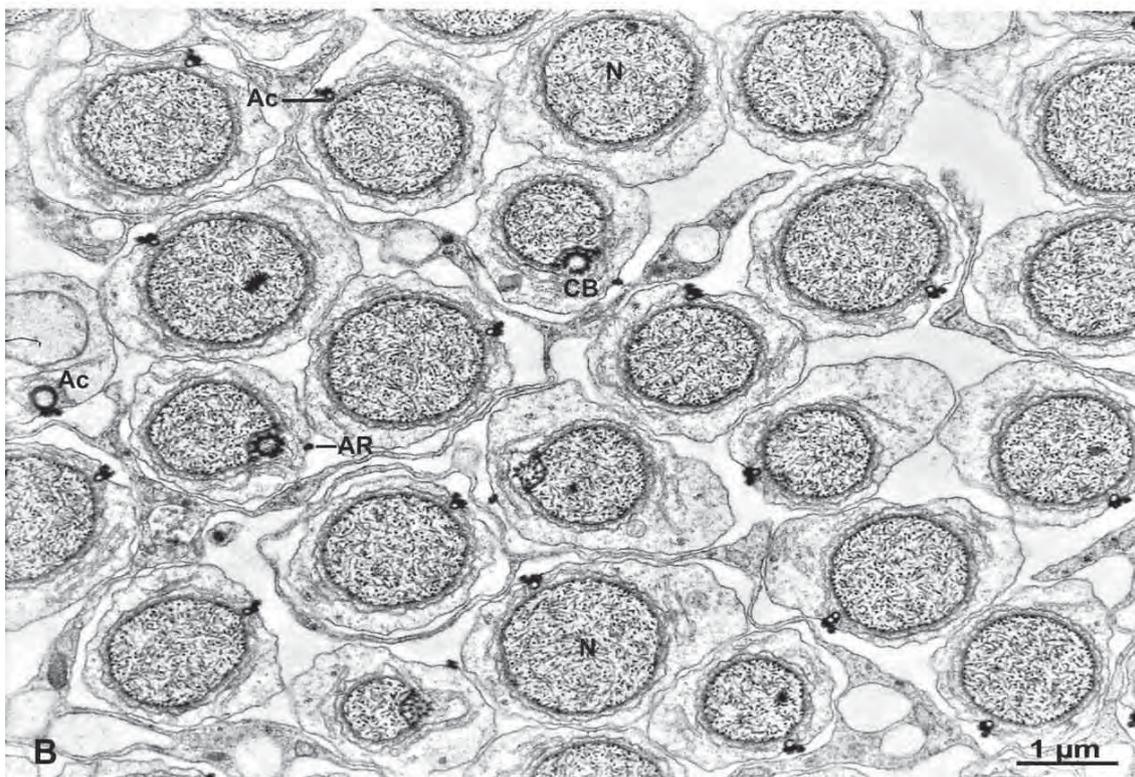
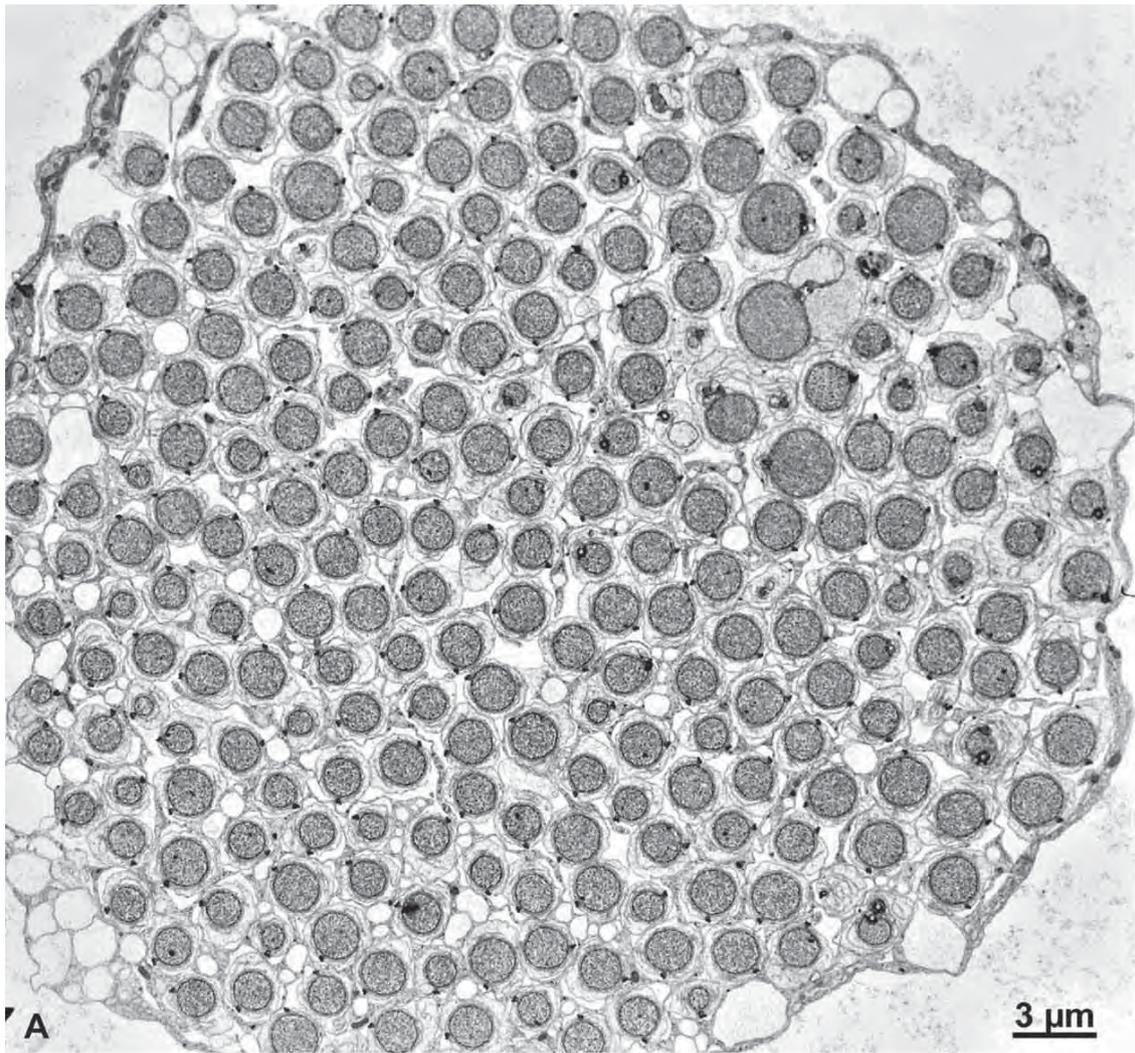


FIGURA 25

Eletromicrografias de espermatozóides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Cisto de espermatozóides eupirenes em corte transversal no nível das regiões anteriores dos espermatozóides. Observa-se núcleo (N), apêndice reticular (AR), apêndices laciniados (AL) e axonema (Ax).

- B)** Espermatozóides eupirenes em corte transversal, mostrando núcleo (N), axonema (Ax), apêndices laciniados (AL) e apêndice reticular (AR).

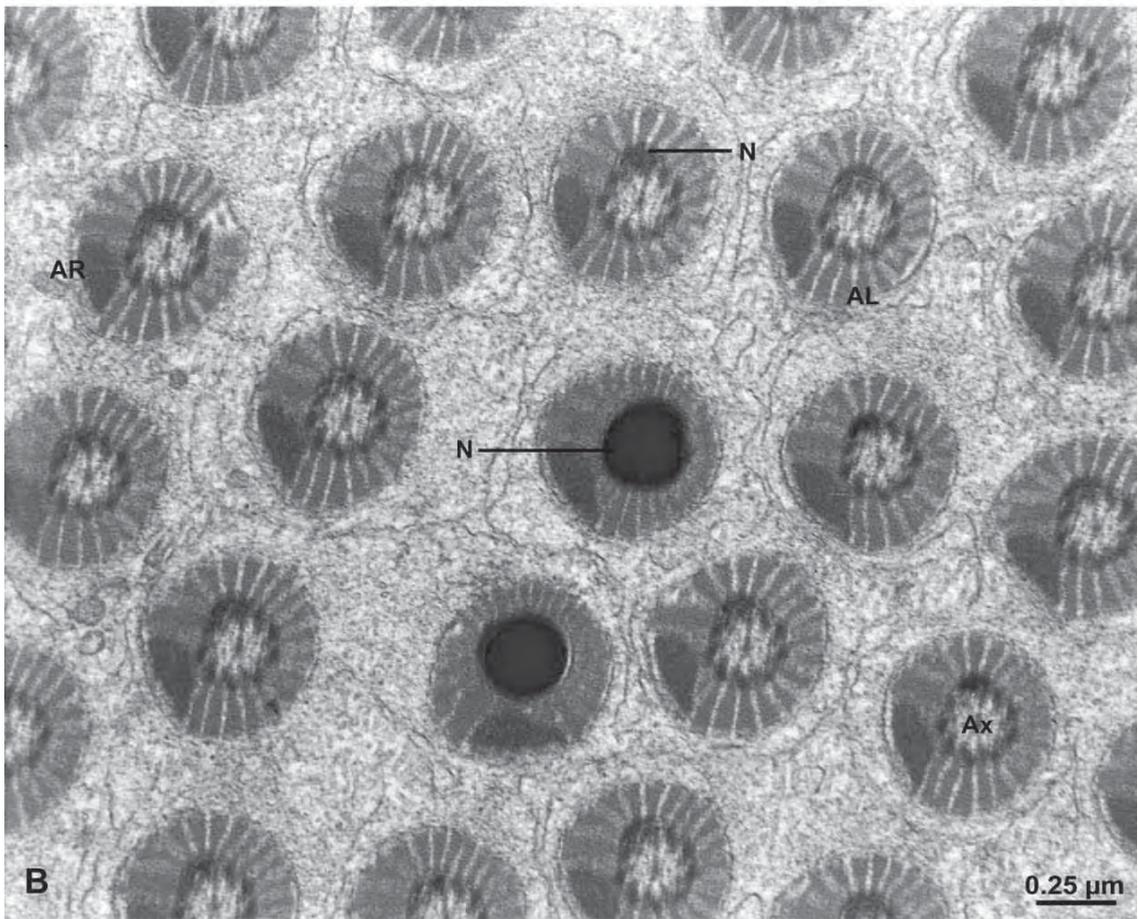
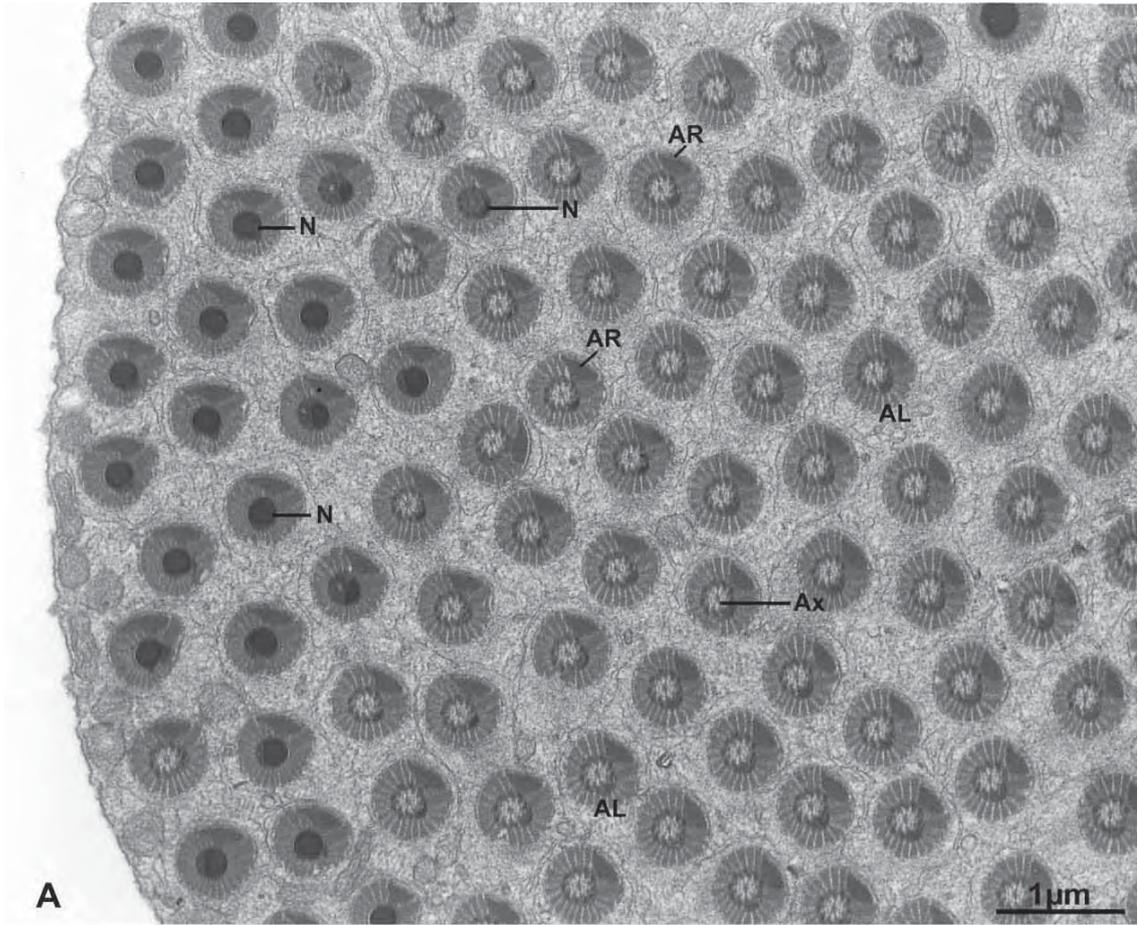


FIGURA 26

Eletromicrografias de espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A) Corte transversal mostrando núcleo (N), acrossoma (Ac) e axonema (Ax).
- B) Corte transversal mostrando núcleo (N), acrossoma (Ac), axonema (Ax) e derivado mitocondrial (DM).
- C) Corte transversal mostrando núcleo (N) e acrossoma (Ac).

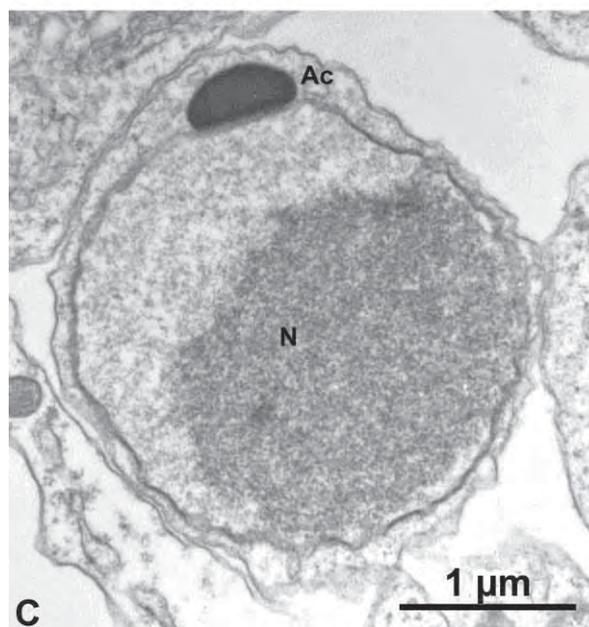
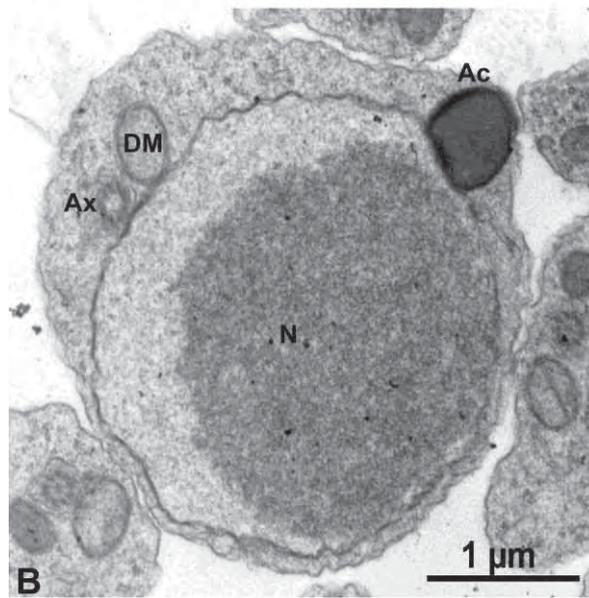
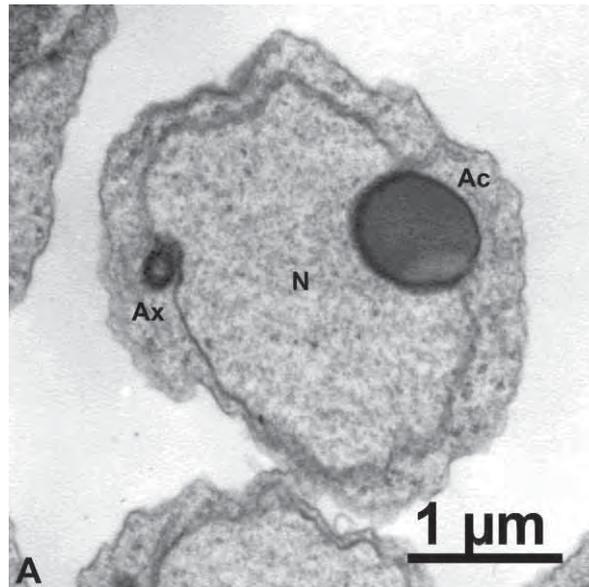


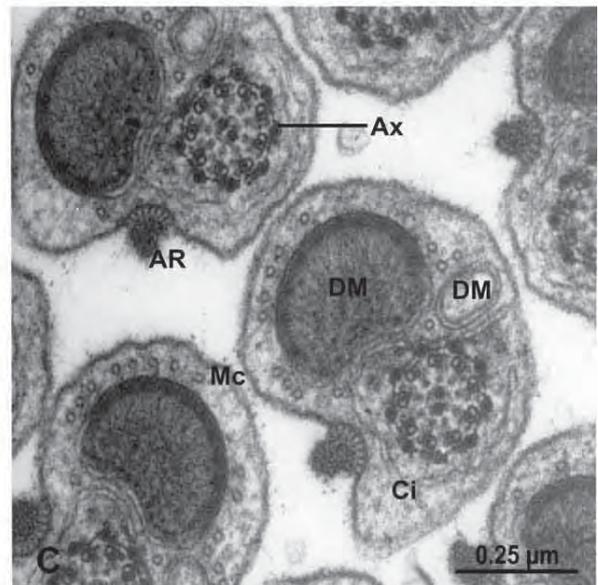
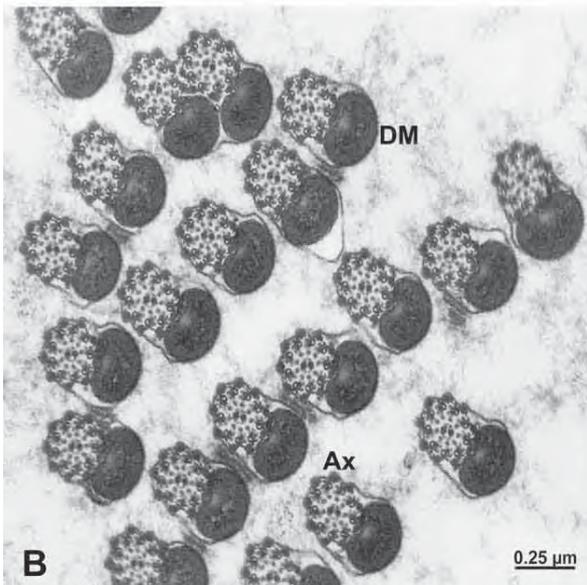
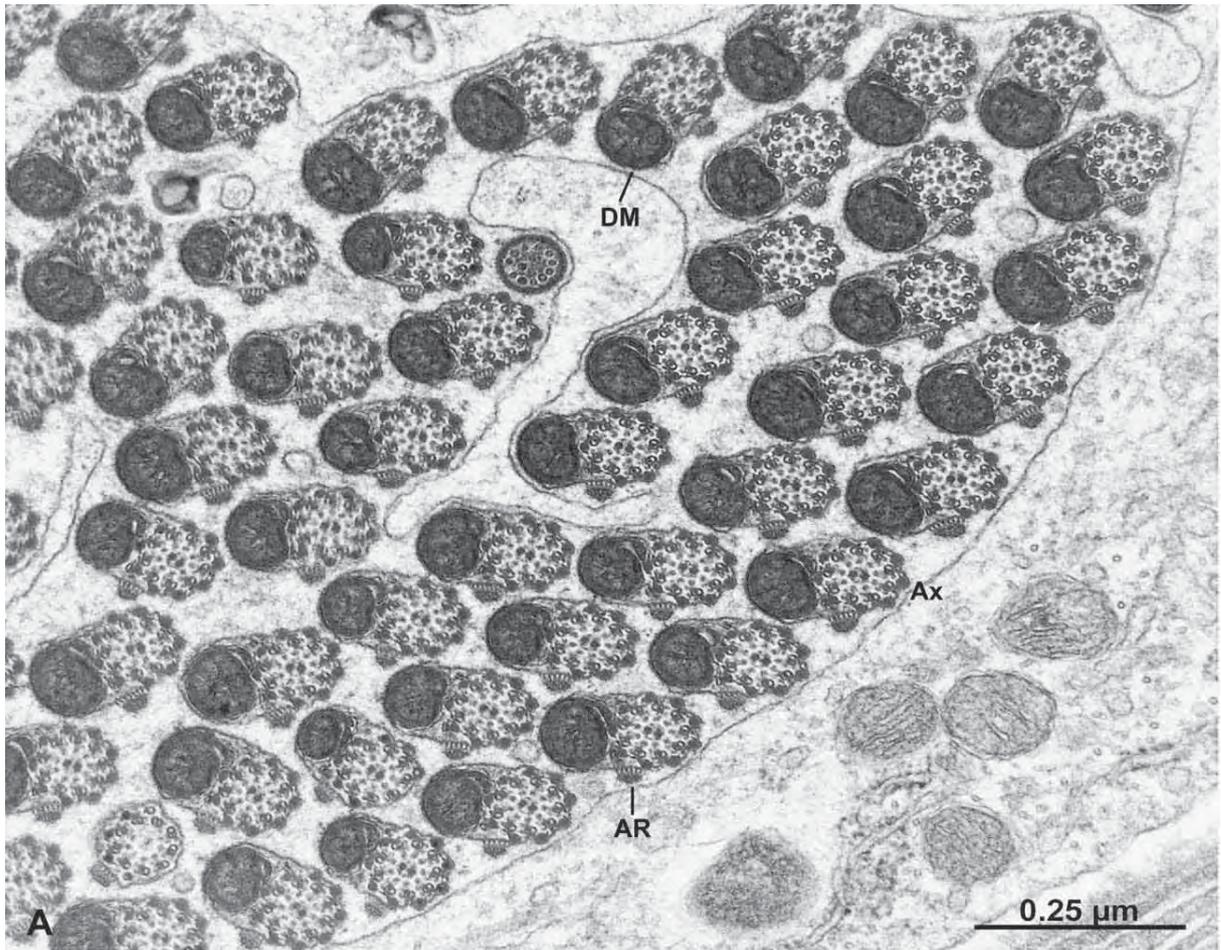
FIGURA 27

Eletromicrografias de espermatozóides e espermátides eupirenes em *Diatraea saccharalis*

- A)** Parte de um cisto de espermatozóides eupirenes em corte transversal de regiões posteriores dos flagelos. Axonema (Ax), derivado mitocondrial (DM) e apêndice reticular (AR) ligado à membrana por meio de septos.

- B)** Corte transversal do flagelo de espermatozóides eupirenes onde se observa somente o derivado mitocondrial (DM) maior que se apresenta muito elétron-denso e axonema (Ax) com arranjo microtubular do tipo “9+9+2”.

- C)** Detalhe de espermátide eupirene em corte transversal da região flagelar onde se observam dois derivados mitocondriais (DM), sendo um maior e elétron-denso, e outro menor e elétron-lúcido; o derivado mitocondrial está rodeado por microtúbulos (Mc) simples; axonema (Ax) com arranjo do tipo “9+9+2” e circundado por cisternas alongadas (Ci). Apêndice reticular (AR) ligado à membrana plasmática por meio de septos.



6. DISCUSSÃO

Larvas de *D. saccharalis* apresentam um par de testículos com formato riniforme de coloração transparente, revestido por uma túnica celular externa. Justaposta a ela, se encontra uma túnica celular interna que divide cada testículo em quatro folículos. Larvas de *Calpodus ethlius* Stoll (Lepidoptera: Hesperiiidae) possuem testículo com formato de feijão, de coloração transparente e esbranquiçada, tornando-se mais opaca e amarela com o passar da idade. O testículo é revestido externamente por uma multicamada celular que está sobrejacente a outra, a denominada camada folicular, que divide o testículo em quatro folículos (Lai-Fook, 1982). Larvas de *Methona themisto* (Lepidoptera: Ithomiidae) possuem testículo de formato riniforme dividido em quatro folículos (Corsato-Alvarenga, 1987).

Adultos de *D. saccharalis* possuem um único testículo de formato arredondado e coloração transparente e esbranquiçada, revestido assim como em larvas, por uma túnica celular externa. Abaixo desta, se encontra uma túnica celular interna que divide o testículo em oito folículos. Mancini; Dolder (2004 b) relatam que adultos de *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) possuem um único testículo fundido de formato esférico e coloração vermelha, o qual se limita externamente por uma túnica de células. Os autores citam que o testículo é formado por folículos, porém sem revelar a quantidade.

Segundo Friedländer *et al.* (2005) insetos da ordem Lepidoptera apresentam dois testículos com formato riniforme e composto de quatro folículos; durante a fase de adulto esse par de testículos pode se fundir ou permanecer separado. Adultos de *Calpodus ethlius* Stoll (Lepidoptera: Hesperiiidae) possuem um único testículo esférico dividido em oito folículos, o qual é resultado da fusão, cerca de doze horas antes da pupação, do par existente em larvas desta espécie (Lai-Fook, 1982). Também, Alves *et al.* (2006), afirmam que adultos de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) possuem um único testículo, resultado de uma fusão, composto por um grande número de folículos. Provavelmente o processo de fusão dos testículos também aconteça em adultos de *D. saccharalis*, uma vez que em larvas encontrou-se um par de testículos, cada qual dividido em quatro folículos, e em adultos encontrou-se um único testículo formado por oito folículos.

Em *D. saccharalis* o desenvolvimento sincrônico de células de linhagem germinativa ocorre no interior de cistos envoltos por células císticas, nos quais contêm somente células apirenes ou eupirenes, assim como em outros lepidopteros (Wolf & Traut, 1987; França & Bão, 2000; Mancini & Dolder, 2004b). Phillips (1971) relata a espermatogênese centrípeta em 18 espécies de mariposas e borboletas, assim como relata Medeiros (1986) em *Alabama argillacea*, Mancini & Dolder (2004b) em *Euptoieta hegesia* e Alves *et al.* (2006). Foi constatado em *D. saccharalis*, no presente estudo, esse mesmo tipo de

espermatogênese centrípeta, ao contrário do que foi descrito por Leviatan; Friedlander (1979 a), em que cistos de células apirenes e eupirenes são distribuídos aleatoriamente no testículo da mariposa *Ectomyelois ceratoniae*. De acordo com Holt; Noth (1970) em *Trichoplusia ni* e Gelbic; Metwally (1981), em *Spodoptera littoralis*, os testículos são compostos por espermatozóides maduros e espermátides no final do desenvolvimento, assim como encontrado nos testículos de adultos em *D. saccharalis*.

A presença de mitocôndrias e de retículo endoplasmático nas células císticas de *D. saccharalis*, já havia sido descrita anteriormente em *B. mori* (Yasuzumi; Oura, 1964, 1965 a, b; Oura, 1966) e em *Myogryllus* sp. (Cruz-Landim; Ferreira, 1981). As características que foram encontradas em testículos de larvas e adultos de *Diatraea saccharalis*, tais como formato, tecido de revestimento e de divisão dos folículos, distribuição dos cistos de células da linhagem espermatogênica nos testículos e o processo de desenvolvimento celular, são similares as características encontradas na maioria dos insetos da ordem Lepidoptera.

De acordo com Mancini; Dolder (2004 b) as espermatogônias formam densos cistos celulares e se caracterizam por conter citoplasma denso e abundante com núcleo esférico. Os espermátócitos são caracterizados por possuírem grande quantidade citoplasmática, núcleo esférico com aglomerados densos de cromatina e nucléolo evidente. Características semelhantes foram observadas nas espermatogônias e espermátócitos em *D. saccharalis*.

Espermátides iniciais apirenes de *Eupitoeia hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) possuem formato esférico com grande volume citoplasmático no qual se encontram micronúcleos que serão eliminados em espermátides tardias e nota-se também, a presença de corpúsculo basal/ centríolo (Mancini, Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005). Espermátides apirenes em *D. saccharalis* possuem formato irregular, diferente do descrito acima para *Eupitoeia hegesia*, porém, *D. saccharalis* também apresenta micronúcleos dispersos pelo citoplasma e corpúsculo basal, assim como em outros insetos Lepidoptera; *Ephestia cautella* (Friedlander; Miesel, 1977), *Orgyia thyellina* (Wolf, Baumgart, Traut, 1987) e *Dione Juno* (Corsatto-Alvarenga, 1989).

Espermátides apirenes iniciais em *D. saccharalis* apresentam axonema com arranjo microtubular do tipo “9+2”, que posteriormente se transforma em espermátides tardias, em um arranjo “9+9+2”, do qual se estende a partir do corpúsculo basal. Espermátides apirenes também possuem dois derivados mitocondriais com regiões paracristalinas, conforme observado em *E. hegesia* pelos seguintes autores Mancini; Dolder (2004 a), Mancini & Dolder (2004b) e Mancini *et al.*(2005). Espermátides apirenes maduras em

Lymantria díspar (Lepidoptera: Lymantriidae) também apresentam dois derivados mitocondriais equivalentes em formato e tamanho, porém, diferentemente do que foi constatado neste estudo, esses derivados possuem regiões elétron-densas (Garvey *et al.*, 2000). Microtúbulos citoplasmáticos observados em estágios intermediários de desenvolvimento de espermatídes apirenes em *D. saccharalis*, também foram evidenciados por outros autores em de *Eupitoieta hegesia* (Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005),

Assim como acontece em *D. saccharalis*, durante a espermiogênese eupirene em *E. hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) há a formação da vesícula acrossomal que inicialmente apresenta um formato redondo e posteriormente se transforma em uma estrutura tubular; e juntamente com a formação do acrossomo o núcleo também passa por modificações (Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b). O flagelo da espermatíde eupirene apresenta inicialmente um axonema com arranjo microtubular do tipo “9+2” que em processos posteriores se modifica, passando a ser do tipo “9+9+2” (Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005). Espermatídes eupirenes também possuem dois derivados mitocondriais, um apêndice reticular atado à membrana plasmática desde a formação inicial da espermatíde, que em *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) aparece conectado a espermatíde por lamelas finas (França; Bão, 2000) e apêndices laciniados, como constatado em *D. saccharalis*. Em estágios intermediários de desenvolvimento, espermatídes eupirenes apresentam microtúbulos citoplasmáticos (Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005), assim como constatado em *D. saccharalis*.

Ao final da espermiogênese, espermatídes eupirenes maduras em *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) apresentam núcleo e acrossomo em sua região anterior, em sua região flagelar existem dois derivados mitocondriais, sendo um maior e mais elétron-denso e outro menor e menos elétron-denso (Garvey *et al.*, 2000), como acontece em *D. saccharalis*.

De acordo com Garvey *et al.* (2000), em *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) tanto em espermatídes apirenes, quanto em espermatídes eupirenes, as mitocôndrias se agregam em um dos pólos da célula, fusionam suas membranas e formam o “nebenkern”, que em espermatídes tardias são transformados em derivados mitocondriais. Processo igualmente notado em *D. saccharalis*.

Em *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperidae) as mitocôndrias começam a se agregar no estágio de espermatócito secundário em preparação para a formação do

“nebenkern” (Lai-Fook, 1982). Neste estudo, foi notado tal processo em espermátócitos, porém sem especificar se a célula era primária ou secundária.

Segundo Kawamura *et al.* (1998) em *Bombyx mori* (Lepidoptera) o “nebenkern” começa a se dividir em dois após o alongamento da espermátide. Porém, o contrário do que foi descrito para *D. saccharalis*, 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 *D. saccharalis*.

A principal característica de espermatozóides apirenes é a ausência de núcleo (Friedlander; Miesel, 1977; Lai-Fook, 1982; Medeiros, 1997) o que também caracteriza espermatozóides apirenes em *D. saccharalis*. A região anterior do espermatozóide, ao invés de núcleo, possui um capuz denso (Riemann, 1970; Phillips, 1970a; Lai-Fook, 1982; Jamieson, 1987; Medeiros; Silveira, 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França; Báó, 2000), como descrito para os seguintes lepidopteros: *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Nocutidae), *Eupitoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (França; Báó, 2000; Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006). Os resultados obtidos em *D. saccharalis* confirmam os dados acima citados.

Em *D. saccharalis*, bem como em *Anticarsia gemmatalis*, *Eupitoieta hegesia*, *Lymantria díspar*, *Leucoptera coffeella* e outros lepidopteros, o flagelo apirene é composto por um axonema de padrão microtubular do tipo “9+9+2” e dois derivados mitocondriais de formato e tamanho similar, com uma orientação em “V”, que ladeiam paralelamente o axonema. Na região posterior dos espermatozóides os derivados terminalizam em alturas diferentes e a partir deste ponto o axonema se torna desorganizado, primeiramente com a perda dos microtúbulos acessórios, seguidos pelos dois centrais e pelas duplas periféricas (Medeiros & Silveira, 1996; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França & Báó, 2000; Garvey *et al.*, 2000; Mancini & Dolder, 2004a; Mancini & Dolder, 2004b; Mancini *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006).

Diferentemente do que ocorre em *D. saccharalis*, os espermatozóides apirenes em *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) possuem regiões elétron-densas nos derivados mitocondriais e axonema com arranjo do tipo “9+9+2” com os nove microtúbulos acessórios

e os dois centrais apresentando conteúdo opaco (Garvey *et al.*, 2000). Alves *et al.* (2006) afirmam que espermatozóides apirenes em *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) possuem axonema do tipo “9+9+2”, sendo que um microtúbulo do par de periféricos e um dos dois dos microtúbulos centrais possuem conteúdo elétron-denso; e os dois derivados mitocondriais são desprovidos de regiões paracristalinas.

Espermatozóides eupirenes são caracterizados por conter região anterior formada por núcleo, acrossoma e dois apêndices extracelulares denominados laciniado e reticular, que se estendem por todo o comprimento do espermatozóide (Phillips, 1970 a, 1971; Leviatan; Friedländer, 1979; Medeiros, 1986; Kubo-Irie *et al.*, 1998; França; Bão, 2000). Segundo França; Bão (2000) em *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Nocutidae) os espermatozóides eupirenes são compostos em sua porção anterior por núcleo e acrossomo, assim como *Eupitoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) (Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005). A função desempenhada pelos apêndices laciniado e reticular ainda é desconhecida e tais estruturas também foram encontradas em *D. saccharalis*. Espermatozóides eupirenes em *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Nocutidae) apresentam apêndices laciniados, em número de 14 a 24, que se caracterizam pela alternância de áreas elétron-densas e elétron-lúcidas, e apêndice reticular (França; Bão, 2000). *D. saccharalis* assim como *A. gemmatalis* apresenta um apêndice reticular, porém o número de apêndices laciniados é diferente, já que em *D. saccharalis* foi observado um número fixo de 18 apêndices laciniados em cada célula eupirene. Trabalhos com insetos da ordem Lepidoptera descrevem que espermatozóides eupirenes possuem apêndices extracelulares como os descritos acima, porém não especificam a quantidade de apêndices laciniados (Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005).

D. saccharalis assim como alguns lepidopteros apresentam flagelo eupirene composto por um axonema com padrão microtubular do tipo “9+9+2” e dois derivados mitocondriais sem regiões paracristalinas (Lai- Fook, 1982; Medeiros, 1986; Kubo-Irie *et al.* 1998; Garvey *et al.*, 2000; Mancini; Dolder, 2004 a; Mancini; Dolder, 2004 b; Mancini *et al.*, 2005).

Adultos de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) apresentam somente um tipo de espermatozóide nucleado, com flagelo composto por dois derivados mitocondriais, um axonema e dois corpos acessórios em formato triangular. Em cortes transversais o derivado maior apresenta forma oval e o menor é mais circular. O padrão microtubular do axonema é de “9+9+2” com os nove microtúbulos acessórios contendo material elétron-denso (Lino-Neto *et al.*, 2000a). *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Trichogramma*

atopovirilia (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Solenopsis invicta* (Hymenoptera, Formicidae) e *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) também apresentam somente um tipo de espermatozóide que é nucleado (Lino-Neto *et al.*, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini *et al.*, 2006). Desde 1903 quando Meves fez a primeira descrição do dimorfismo de espermatozóides em Lepidoptera, em todas as mariposas e borboletas estudadas tem se relatado a ocorrência dos 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). Os insetos da ordem Lepidoptera apresentam espermatogênese dicotômica, com a produção de dois tipos de espermatozóides: apirene (anucleado) e eupirene (nucleado) (Meves, 1903; Zylberberg, 1969; Phillips, 1970 a; Riemann, 1970; Friedländer; Gitay, 1972; Lai-Fook, 1982; Medeiros, 1986, 1997; Corsatto-Alvarenga *et al.*, 1987; Friedländer, 1997; Jamieson *et al.*, 1999; Mancini; Dolder, 2001, 2003, 2004; Mancini, 2003; Alves *et al.*, 2006). A espermatogênese dicotômica também foi por nós detectada em *D. saccharalis*.

De acordo com Garvey *et al.* (2000) espermatozóides nucleados apresentam axonema típico em lepidopteras, derivados mitocondriais e apêndices extracelulares. O derivado mitocondrial menor em *Lymantria dispar* é difícil de ser visualizado e em regiões posteriores dos espermatozóides, eles não são observados; já o derivado maior, possui um formato riniforme (com a região circundante da concavidade elétron-densa) e se estende por todo o comprimento flagelar.

Em *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) os espermatozóides eupirenes são bem distintos dos mesmos em *D. saccharalis*. Os espermatozóides eupirenes em *Leucoptera coffeella* possuem núcleo, acrossomo e microtúbulos acessórios em sua região anterior. O acrossomo se estende bilateralmente ao núcleo, e contém duas grandes porções. Entre essas duas estruturas, a região anterior é composta por um arco de oito microtúbulos acessórios conectados individualmente a membrana através de densas pontes. O flagelo é constituído por axonema do tipo “9+9+2”, sendo um do par de periféricos e um dos centrais elétron-densos, e dois derivados mitocondriais com formato e tamanho iguais e com região paracristalina (Alves *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados encontrados na caracterização morfológica e ultraestrutural dos testículos de larvas e adultos e na descrição do processo de espermatogênese, é possível concluir que em *D. saccharalis*:

1. Os testículos de larvas se apresentam como um par de formatos riniforme e em adultos esses órgãos se fundem originando um único testículo de formato arredondado.
2. A espermatogênese é um processo sincrônico, onde as células da linhagem germinativa se desenvolvem no interior de cistos formados por células somáticas.
3. A espermatogênese acontece da região folicular apical para a região basal em larvas, e em adultos, o processo ocorre de maneira centrípeta, sendo que cistos de espermatogônias e espermatócitos se localizam na periferia do órgão e os cistos de espermatídes e feixes de espermatozóides estão localizados na região central, próximos aos vasos deferentes.
4. A espermatogênese é um processo dicotômico que origina espermatozóides eupirenes (nucleados) e espermatozóides apirenes (anucleados).

8.REFERÊNCIAS

- 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.
- BOMBONATO, M. T. S. **Análise morfológica e quantitativa dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) frente ao parasitóide *Metagonistylum minense* (Diptera, Tachinidae)**. 90f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1994.
- BOMBONATO, M. T. S.; GREGÓRIO, E. A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v. 12, p. 867-879, 1995.
- BOMBONATO, M. T. S.; GREGÓRIO, E. A. Hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae): avaliação de técnicas para análise em microscópio de contraste de fase. **Iheringia Ser. Zool.**, v. 80, p. 105-110, 1996.
- BROWN JR., K. S.; FREITAS, A. V. L. Lepidoptera. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (Orgs). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. 5 – Invertebrados terrestres. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 225-243.
- CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larva de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera, Braconidae)**. 1994. 160f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.
- CONTE, H. **Morfologia do tubo digestivo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae) durante o desenvolvimento larval. Estudo anatômico e histológico**. 1985. 94f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1985.
- CORSATTO-ALVARENGA, L. B. F. **Estudos sobre a espermatogênese nos Lepidoptera *Dione Juno* (Cramer, 1779) e *Methona themisto* (Hubner, 1818)**. 1989. 122f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

- 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.
- CRUZ-LANDIN, C.; FERREIRA, A. Studies on the fine structure of cyst cells and its relationships with the spermatids on *Myogryllus* sp. (Orthoptera). **Rev. Bras. Biol.**, v. 41, n. 2, p. 401-406, 1981.
- DUMSER, J. B. The regulation of spermatogenesis of insects. **Ann. Rev. Ent.**, v. 25 p. 341-369, 1980.
- FALLEIROS, A. M. F. **Células sanguíneas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). Estudo citoquímico, ultraestrutural e à microscopia eletrônica de varredura.** 1995. 154f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.
- FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A. Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v. 12, p. 751-758, 1995.
- 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.
- FRIEDLANDER, M. Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. **J. Insect Physiol.**, v. 43, n. 12, p. 1085-1092, 1997.
- FRIEDLANDER, M. et al. Eupyrene and Apyrene Sperm: Dichotomous Spermatogenesis in Lepidoptera. **Adv. Insect Physiol.**, v. 32, p. 206-308, 2005.
- FRIEDLANDER, M.; GITAY, H. The fate of the normal-anucleated spermatozoa in inseminated females of the silkworm *Bombyx mori*. **J. Morphol.**, v. 138, p. 121-130, 1972.
- 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.
- GARBINI, C. P.; IMBERSKI, R. B. Spermatogenesis in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 96, n. 2, p. 189-203, 1977.
- 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.
- GELBIC, I.; METWALLY, M. M. Changes in the development of male germinal cells in *Spodoptera littoralis* caused by the effects of juvenoids (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Entomol. Bohemoslov.**, v. 78, p. 10-7, 1981.
- GULLAN, P. J. **Os insetos: um resumo de entomologia.** São Paulo: Roca, 2007.

- HAMON, C.; CHAUVIN, G. Ultrastructural analysis of spermatozoa of *Karscheltellus lupulinus* L. (Lepidoptera: Micropterigidae). **J. Insect Morphol. Embryol.**, v. 21, p. 149-160, 1992.
- HANNAH-ALAVA, A. The premeiotic stages of spermatogenesis. **Adv. Genet.**, v.13, p. 157-226, 1965.
- HENSLEY, S. D.; HAMMOND, A. M. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on artificial diet. **J. Econ. Entomol.**, v. 61, p. 1742-1743, 1968.
- HOLT, G. G.; NORTH, D. T. Spermatogenesis in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 63, n. 2, p. 501-507, 1970.
- 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. Science Publishers.
- 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. et al. 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. et al. 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 *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): an ultrastructural study of eupirene sperm in sterile backcross males. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1988b.
- LaCHANCE, L. E.; OLSTAD, G. Spermiogenesis of eupirene sperm in prepupae, pupae, and adults of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): an ultrastructural study. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 81, n.2, p. 292 – 300, 1988a.

- LAI-FOOK, J. Structural comparison between eupyrene and apyrene spermiogenesis in *Calpodex 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.
- LEVIATAN, R.; FRIEDLÄNDER, M. The eupyrene-apyrene dichotomous spermatogenesis of Lepidoptera. **Dev. Biol.**, v.68, p. 515-24, 1979a.
- LINO NETO, J. **Estudo ultraestrutural da espermiogênese e dos espermatozoides *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae)**. 1993. 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
- 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. et al. Immunocytochemical localization of tubulins in spermatids and spermatozoa of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Tissue & Cell**, v. 37, p. 81-89, 2005.
- MANCINI, K. et. al. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). **Insect. Soc.**, v. 53, p. 333-338, 2006.
- MANCINI, K. **Ultra-estrutura e citoquímica dos espermatozoides em *Euptoieta hegesia* (Insecta: Lepidoptera) ao longo dos tratos reprodutores masculino e feminino**. 2003. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Dichotomic Spermiogenesis in *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 21, n. 1, p. 13-23, 2004.
- 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 *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Tissue & Cell**, v. 33, n. 3, p. 301-308, 2001.

- 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. **Caracterização ultra-estrutural de espermatozoides eupirenes e apirenes de *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), ao nível dos testículos e das vias genitais de imagos machos e fêmeas até a espermateca.** 1986. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.
- 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.
- MEVES, F. Ueber oligopyrene und apirene Spermien und über ihre Entsechung, nach Beobachtungen an *Paludina* und *Pygaera*. **Arch. Mikrosk. Anat Entwicklungsmechanik**, v. 61, p. 1-82. 1903.
- MORAES, S. **Estudo do desenvolvimento das gônadas e órgãos anexos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae).** Botucatu: UNESP, 1983. 47p.
- OSANAI, M.; KASUGA, H.; AIGAKI, T. Physiological role of apyrene spermatozoa of *Bombyx mori*. **Experientia** (Basel), v. 43, n. 6, p. 593-596, 1987.
- OURA, C. Electron microscope studies on the fine structure of nutritive cells in the testis of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Okajimas Folia Anat. Jpn.**, v. 42, p. 171-87, 1966.
- PARRA, J. R. P. et. al. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores.** São Paulo: Manole, 2002. p. 609.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied.** Edinburgh: Churchill Livinsgtone, 1972. 759p.
- PHILLIPS, D. M. **Insect flagellar tubule patterns: theme and variations.** In: BACCETTI, B. (Ed.). **Comparative spermatology.** Rome: Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970b. p. 263-273.
- 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.

- PINTO, A. S. **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP: Biocontrol, 2006. (Boletim Técnico Biocontrol, v. 1).
- PINTO, A. S. et. al. **Controle biológico de pragas**. Piracicaba, SP: Biocontrol, 2006a.
- PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; OLIVEIRA, H. N. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et. al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP: Biocontrol, 2006b.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. **Espermatogênese em *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). Aspectos ultraestruturais**. 1993. 135f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.
- 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° ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.
- SADO, T. Spermatogenesis of the silkworm and its bearing on radiation induced sterility. **J. Fac. Agr. Kyushu Univ.**, v. 12, n. 4, p. 359-85, 1963.
- SANTOS, D. C. **Folículos ovarianos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae): formação e desenvolvimento pré-vitelogênico**. 1997. 110f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.
- SONNENSCHN, 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, 1982. v. 1, p. 32-60.
- VOLPE, H. X. L. **Distribuição espacial do parasitismo de *Cotesia flavipes* (CAMERON, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) em cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- 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.
- WOLF, K. W.; TRAUT, W. Ultrastructure of distal flagellar swellings in spermatocytes and spermatids of *Ephestia kuehniella* Z. (Pyrilidae, Lepidoptera). **Cell Tissue Res.**, v. 250, p. 421-424, 1987.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XIII formation of a tubular structure and two bands in the developing spermatid of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. **Z. Zellforsch.**, v. 64, p. 210-26, 1964b.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XIV the fine structure of the clear band and tubular structure in late stages of development of spermatids of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. **Z. Zellforsch.**, v. 66, p. 182-96, 1965a.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XV the fine structure of the middle piece in the developing spermatid of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. **Z. Zellforsch.**, v. 67, p. 502-20, 1965b.
- ZAMA, U. et al., Ultrastructural characterization of spermatozoa in euglossine bees (Hymenoptera, Apidae, Apinae). **Insect. Soc.**, v. 52, p. 122–131, 2005.
- ZYLBERBERG, L. Contribution a l'étude de la double spermatogenese chez um lépidoptère. (*Pierres brassicas* L., Pieridae). **Ann Sci. Nat. Zool.**, v. 11, p. 569-626, 1969.