

ESTUDO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* FABRICIUS 1794 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE). Joyce Regina Zapaterini, Daniela Carvalho dos Santos. - Morfologia - Ciências Biológicas - Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências de Botucatu - Campus de Botucatu.

A larva de *Diatraea saccharalis* Fabricius 1794 (Lepidoptera: Crambidae), conhecida popularmente como broca da cana-de-açúcar, tem grande interesse econômico, pois afeta direta e indiretamente o cultivo e o aproveitamento industrial da cana-de-açúcar, além de atacar outras gramíneas como arroz, sorgo, milho e trigo (Botelho & Macedo, 2002). A *D. saccharalis* é um inseto que apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Seus ovos são depositados nas folhas ainda verdes e a duração desta fase é bastante variável, dependendo principalmente da temperatura, sendo, nas condições brasileiras de uma a duas semanas. Após a eclosão do ovo, a larva alimenta-se da folha e/ou da casca da cana. Durante esta fase, a larva sofre uma ou duas ecdises, quando inicia a perfuração do colmo da cana, abrindo extensas galerias no seu interior (Botelho & Macedo, 2002). Durante o período larval, o inseto sofre um número variável de ecdises, frequentemente 6, e a duração desta fase é de aproximadamente 70 dias. Próximo à pupação, a larva abre um orifício no colmo da cana e o fecha parcialmente com fios de seda e restos de sua alimentação, e assim protegida passa para a fase de pupa, que tem duração média de 10 dias, quando emerge o adulto. O período de vida do adulto é de 4 a 5 dias (Botelho & Macedo, 2002).

Dentre os principais prejuízos causados pelo ataque da broca da cana na cultura canavieira estão a morte da gema apical, brotamento lateral, perda de peso da cana, enfraquecimento dos colmos com conseqüente aumento no número de canas quebradas e entrenós atrofiados. Já os danos indiretos são causados por microorganismos, predominantemente fungos, que invadem os entrenós através dos orifícios abertos pelas larvas, causando a conhecida “podridão vermelha”. Além disto, ocorre a diminuição da pureza do caldo e problemas de contaminação no processo de fermentação alcoólica nas indústrias de açúcar e álcool (Graça, 1976).

Embora existam grandes laboratórios entomológicos direcionados à criação da *D. saccharalis* com o objetivo de controle biológico da praga, poucos são os estudos visando o conhecimento detalhado da morfologia interna deste inseto (Santos & Gregório, 2002, 2003, 2006; Falleiros *et al.*, 2003; Victoriano *et al.*, 2003; Rigoni *et al.*, 2004) especialmente do seu sistema reprodutor masculino. Neste sentido, o conhecimento da histologia do testículo da broca da cana é de extrema importância para fundamentar pesquisas básicas relacionadas à reprodução nos insetos e também estudos aplicados visando o desenvolvimento e aperfeiçoamento de mecanismos de controle biológico desta grande ameaça da cultura da cana-de-açúcar.

Segundo Philips (1970), a maioria dos insetos apresenta um par de testículos, revestidos externamente por epitélio simples e internamente por um epitélio germinativo que em geral encerra numerosos folículos que variam em forma e quantidade de um grupo de insetos para outro.

O epitélio germinativo é constituído por grupos de células interconectadas, formando um sincício com número fixo de células definido para cada espécie. Cada grupo de células germinativas é envolvido por células somáticas de natureza epitelial formando um cisto (Bairati, 1967). O número de células germinativas espermáticas por cisto é característico para os diferentes grupos de animais, seguindo a razão 2^n , onde o n equivale ao número de divisões (mitóticas e meióticas) sofridas pelas espermatogônias para originar os espermátocitos, espermátides e espermatozóides (Phillips, 1970; Dumser, 1980). Em *Bombyx mori*, após 6 ciclos de divisões mitóticas, cada espermatogônia produz um cisto contendo 64 espermátocitos interconectados, devido a citocinese incompleta que ocorre durante os ciclos de mitose. Os espermátocitos sofrem meiose e conseqüentemente geram 256 espermátides no cisto, as quais darão origem aos espermatozóides. Em insetos da ordem Lepidoptera dois tipos de espermatozóides são formados, chamados eupyrene, que são nucleados e férteis e os apyrene, anucleados e inférteis (Tazima, 1964; Kawamura *et al.*, 2000; Miyagawa *et al.*, 2005).

Morfologicamente a forma e o tamanho de cada cisto dependem do grau de maturação das células germinativas que o compõem. Cistos que contém espermatogônias, espermátocitos ou espermátides jovens são grandes e com forma esférica ou poliédrica e se localizam na periferia do testículo e os cistos que contém espermátides em estágios finais de diferenciação apresentam-se menores e com

forma mais cilíndrica ou alongada o que caracteriza a região mais central do testículo, onde também estão os espermatozóides maduros (Phillips, 1970).

Tendo em vista a inexistência de estudos direcionados para o conhecimento da morfologia interna do aparelho reprodutor masculino da *D. saccharalis* e dada a grande importância econômica deste inseto, o presente estudo teve por objetivo a descrição histológica dos testículos de larvas de *D. saccharalis*, visando uma contribuição para o conhecimento mais abrangente da biologia reprodutiva deste inseto, assim como para o desenvolvimento de possíveis novas estratégias de controle desta praga.

Para tanto foram utilizadas larvas de 5º instar de *D. saccharalis* fornecidas pelo Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista, SP. As larvas foram dissecadas ventralmente, sob microscópio estereoscópio e os testículos foram identificados e fixados imediatamente por solução fixadora (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) por 24 horas. Posteriormente, o material foi submetido ao protocolo convencional para inclusão em historresina (Leica). Os cortes histológicos foram corados em Hematoxilina-eosina e as lâminas histológicas foram montadas, analisadas em microscópio óptico e as imagens foram capturadas em sistema de captação de imagens (QWIN – Leica).

Os resultados histológicos obtidos até o momento evidenciaram que em larvas de 5º instar de *D. saccharalis* cada testículo compreende quatro folículos. Estes folículos são separados por septos de tecido conjuntivo, o estroma, que é contínuo ao epitélio de revestimento externo do testículo. Internamente, os folículos são compostos por epitélio germinativo, o qual é composto por vários cistos (Fig.1A). Estes cistos são formados por células da linhagem germinativa em diferentes graus de desenvolvimento espermatogênico e por células somáticas que os revestem externamente. Tal descrição é comum para a grande maioria dos insetos, já que de uma maneira geral, as células germinativas sofrem divisões mitóticas incompletas dando origem a grupos de células interconectadas por pontes citoplasmáticas, que resulta em um processo de diferenciação sincronizado das células que compõem cada grupo (Bairati, 1967; Philips, 1970; Dumser, 1980).

Em *D. saccharalis*, pequenos cistos foram observados na periferia dos folículos contendo células arredondadas, com núcleo e citoplasma bastante basófilos, as espermatogônias. Em direção à região central do folículo foram detectados cistos maiores formados por células grandes com núcleo arredondado e volumoso e citoplasma um pouco menos basófilo, os espermatócitos. Na região central dos folículos, foram visualizados cistos contendo pequenas células de formato alongado exibindo núcleo reduzido e citoplasma bastante acidófilo, as espermátides. Finalmente grandes feixes de espermatozóides maduros, alinhados paralelamente, foram detectados no centro de cada folículo, tais células exibiram formato filiforme com núcleo bastante reduzido na região da cabeça (Figs.1B,1C,1D). Tais resultados relacionados à disposição dos cistos dentro de cada folículo testicular da broca da cana, vem de encontro aos dados da literatura sobre o processo de espermatogênese (maturação das células da linhagem espermatogênica e conseqüente formação dos espermatozóides) descrito para outros insetos (Bairati, 1967; Tokuyasu, 1972 a, 1972b; Grassiotto, 1993; Bao, 1987), que parece acontecer da periferia para o centro de cada folículo testicular.

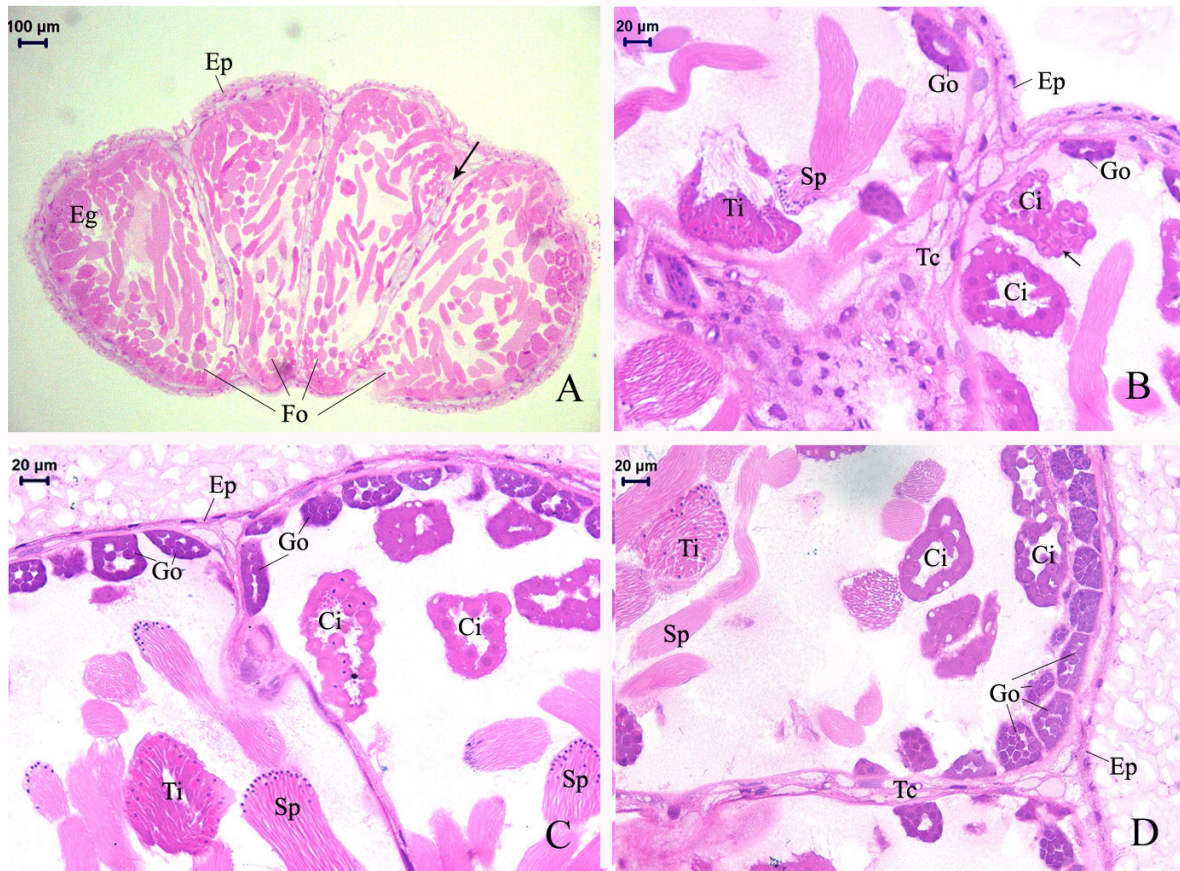
Os resultados parciais obtidos até o momento sobre a caracterização histológica dos testículos da *D. saccharalis* nos permitem concluir que tanto a histologia dos testículos, quanto o processo de maturação das células da linhagem espermatogênica e a conseqüente formação dos espermatozóides são semelhantes aos dados descritos na literatura para outros Lepidoptera (Phillips, 1970), entretanto estudos ultraestruturais serão realizados visando uma melhor caracterização das células envolvidas no processo de espermatogênese da broca da cana-de-açúcar.

Referências Bibliográficas

- BAIRATI, A. Struttura ed ultrastruttura dell' apparato genitale maschile di *Drosophila melanogaster* Meig. I. II testicolo. **Z. Zellforsch.**, v.76, p.56-99, 1967.
- BAO, S.N. **Estudo ultra-estrutural da espermiogênese no mutante olho róseo comparativo à linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*** Weidmann (Diptera-Tephritidae). 1987. 103p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BOTELHO, P.S., MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P., et al. **Controle biológico no Brasil**. Manole: São Paulo, 2002. p.409-21.

- DUNSER, J.B. The regulation of spermatogenesis in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v.25, p.341-369, 1980.
- FALLEIROS, A.M.F., BOMBONATO, M.T.S., GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.46, p.287-94, 2003.
- GRAÇA, L.R. Estimativa econômica dos prejuízos causados pelo complexo broca-podridões na cana-de-açúcar. **Bras. Açúcar.**, v.88, p.12-34, 1976.
- GRASSIOTTO, G.I. **Espermatogênese em *Dermatobia hominis*** (Diptera: Cuterebridae) **aspectos ultra-estruturais**. 1993. 135p. Dissertação-Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- KAWAMURA, N. *et.al.* Peristaltic squeezing of sperm bundles at the late stage of spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*. **J. Morphol.**, v. 246: 3–58, 2000.
- LIMA FILHO, M., LIMA, J.O.G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepdoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: numero de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hemnoptera: trichogrammatidae) em condições de campo. **Neotrop. Entomol.**, v.30, p.483-487.
- MIYAGAWA, Y. *et.al.* T. Differential expression of a *Bombyx mori* AHA1 homologue during spermatogenesis. **Insect. Mol. Biol.**, v.14, n.3, p. 245-253, 2005
- PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and mofogenesis. **J.Cell Bio**, v.44, p.243-277, 1970.
- RIGONI, G.M., TOMOTAKE, M.E.M., CONTE, H. Morphology of malpighian tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at final larval development. **Cytologia**, v.69, p.1-6, 2004.
- SANTOS, D.C., GREGÓRIO, E.A. Deposition of the eggshell Layers in the Sugar cane Borer (Lepdoptera: Pyralidae): Ultrastructural Aspects. **Acta Microsc.**, v.12, n.1, p.37-41, 2003.
- SANTOS, D.C., GREGÓRIO, E.A. Morphological aspects of cluster formation in the germarium of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepdoptera: Pyralidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 35, p. 120-131, 2006.
- SANTOS, D.C., GREGÓRIO, E.A. Ultrastructure of the ovariole sheath in *Diatrea saccharalis* (Lepdoptera: Pyralidae). **Biocell**, v.26, p.229-235, 2002.
- TAZIMA, Y. Genetics of Silkworm. Logos Press, London, 1964.
- TOKUYASU, K.T., PEACOCK, W.J., HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. **Z. Zellforsch.**, v.124, p.479-506, 1972a.
- TOKUYASU, K.T., PEACOCK, W.J., HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Colling process. **Z. Zellforsch.**, v.127, p.492-525, 1972b.
- VICTORIANO, E., MORENO, M.H., GREGORIO, E. Ultrastructural modification along the glandular region of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) silk gland, ate the end of the larval stage. **Acta Microsc.**, v.12, p.31-6, 2003.

Bolsa: PROEX



Legendas das figuras

Figura 1A - Aspecto geral do testículo de *D.saccharalis* evidenciando o epitélio de revestimento (Ep) e os septos de tecido conjuntivo (→) subdividindo os 4 folículos (Fo). Epitélio germinativo (Eg).

Figuras 1B, 1C e 1D – Cistos compostos por espermatogônias (Go) localizados na periferia dos folículos. Cistos contendo espermatócitos (Ci) com imagens de metáfases (→). Cistos formados por espermatídes (Ti) e feixes de espermatozóides maduros (Sp) alinhados paralelamente. Septo de tecido conjuntivo (Tc). Epitélio de revestimento (Ep).