

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Ultraestrutura do aparelho reprodutor feminino e mecanismos de transmissão transovariana de endossimbiontes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae)

Fábio Cleisto Alda Dossi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fábio Cleisto Alda Dossi
Biólogo

Ultraestrutura do aparelho reprodutor feminino e mecanismos de transmissão transovariana de endossimbiontes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae)

Orientador:
Prof. Dr. FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Dossi, Fábio Cleisto Alda

Ultraestrutura do aparelho reprodutor feminino e mecanismos de transmissão transovariana de endossimbiontes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) / Fábio Cleisto Alda Dossi. - - Piracicaba, 2008.

91 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Greening (Doença de planta) 3. Insetos sugadores 4. Insetos vetores 5. Morfologia animal 6. Simbiose 7. Ovários - Ultra-estrutura I. Título

CDD 632.75

D724u

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À Deus, meu refúgio e fortaleza, fonte inesgotável de força e fé.

Aos meus pais Abílio J. Dossi e Gilda A. Alda Dossi, pelo amor, incentivo, apoio, carinho e ensinamentos fundamentais em minha vida;

Ao meu irmão, Sandro A. Dossi, pelo amor, apoio e incentivo.

À minha noiva Gislaine, pelo amor, compreensão e apoio valiosos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Prof. Dr. Fernando L. Cônsoli, pela orientação e compreensão dispensadas e pelo aprendizado adquirido no convívio;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento do presente trabalho;

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, coordenador do NAP/MEPA, pela colaboração e disponibilização do laboratório para condução dos experimentos;

Ao Prof. Dr. Francisco Tanaka (NAP/MEPA), pela atenção e colaboração técnica dispensados;

Ao Renato Salaroli (NAP/MEPA), pelo apoio técnico na condução dos trabalhos;

À Profa. Dra. Sanae Kasahara – IB-UNESP-Rio Claro, pela presteza e disponibilização do microscópio de fluorescência para a condução de parte de meus trabalhos;

Ao Prof. Dr. José Roberto P. Parra, pela cessão de uso de estufa, utilizada para a manutenção de plantas de *Murraya paniculata*;

Ao Prof. Dr. Evôneo Berti Filho, pela cessão de uso de sala, empregada na criação de *Diaphorina citri*;

Ao amigo Prof. Dr. Hélio Conte, pelos ensinamentos e amizade valiosos;

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Nutricional e Molecular de Insetos, Aline Guidolin, Carolina Schultz, Cláudia Marinho, Daniela Pinheiro, Gabriela Salvador, Guilherme Rossi, Izabela Salvador, Jaci Mendes, Michele, Priscila Fortes, Tiago Zucchi e Tibério Graco, pela amizade, colaboração e companheirismo;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Entomologia e do NAP/MEPA, que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação e/ou realização dos trabalhos;

A todos os colegas da Pós-Graduação em Entomologia pelos momentos de aprendizado, descontração e colaboração durante o curso;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização dos meus trabalhos, meus sinceros agradecimentos.

“The harmonious co-operation of all beings arose, not from the orders of a superior authority external to themselves, but from the fact that they were all parts in a hierarchy of wholes forming a cosmic pattern, and what they obeyed were the internal dictates of their own natures.”

CHUNG TZU

(Filósofo Taoísta, século III a.C.)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
Referências	12
2 MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DO APARELHO REPRODUTOR DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)	15
Resumo	15
Abstract.....	15
2.1 Introdução.....	16
2.2 Revisão Bibliográfica	17
2.2.1 Morfologia do aparelho reprodutor feminino.....	17
2.3 Material e Métodos.....	20
2.3.1 Obtenção de ovários	20
2.3.2 Preparação de ovários para análise em montagem total.....	20
2.3.3 Preparação de ovários para análise histológica	21
2.3.4 Microscopia de fluorescência.....	21
2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura	22
2.3.7 Desenvolvimento ovariano e análise da influência da cópula na maturação dos ovários de <i>D. citri</i>	23
2.4 Resultados.....	23
2.4.1 Morfologia geral do aparelho reprodutor feminino de <i>Diaphorina citri</i>	23
2.4.2 Análise estrutural do aparelho reprodutor de <i>D. citri</i>	24
2.4.3 Desenvolvimento ovariano e análise da influência da cópula na maturação dos ovários de <i>D. citri</i>	46
2.5 Discussão	51
2.5.1 Morfologia geral do aparelho reprodutor de <i>D. citri</i>	51
2.5.2 Análise estrutural do aparelho reprodutor de <i>D. citri</i>	51
2.6 Conclusões.....	58

Referências	59
Resumo	67
Abstract.....	67
3.1 Introdução.....	68
3.2 Revisão Bibliográfica	69
3.2.1 Interações endossimbiontes - sugadores de seiva.....	69
3.3 Material e Métodos.....	71
3.3.1 Obtenção de ovários	71
3.3.2 Preparação de ovários para análise em montagem total.....	71
3.3.3 Preparação de ovários para análise histológica	72
3.3.4 Microscopia de fluorescência	73
3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura	73
3.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	74
3.4 Resultados.....	74
3.4.1 Estrutura do bacterioma.....	74
3.4.2 Migração de endossimbiontes do bacterioma para oócitos em processo de maturação.....	77
3.5 Discussão	85
3.6 Conclusões.....	87
Referências	87

RESUMO

Ultraestrutura do aparelho reprodutor feminino e mecanismos de transmissão transovariana de endossimbiontes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908

(Hemiptera: Psyllidae)

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) tornou-se um psílídeo de grande importância para a citricultura paulista após a constatação da bactéria *Candidatus Liberibacter* sp., causadora do Huanglongbing ('greening'). Sabe-se que esse inseto abriga microrganismos endossimbiontes, os quais desempenham papel fundamental em sua ecologia nutricional, sendo transmitidos verticalmente à progênie. Dessa forma, propomos caracterizar a morfologia do aparelho reprodutor feminino durante o seu desenvolvimento para embasar a identificação do processo de migração dos simbiossiontes do bacterioma aos tecidos reprodutivos. *D. citri* possui ovário do tipo telotrófico, com ovariolos organizados em "bouquet" e características gerais semelhantes às observadas para outros Sternorrhyncha. Os trofócitos parecem ser desprovidos de delimitação por membrana no ovariolo desenvolvido. Um único oócito se desenvolve por ciclo no vitelário, o qual mantém-se em contato com a câmara trófica por um prolongamento citoplasmático, denominado cordão trófico. As informações morfo-estruturais do aparelho reprodutor de *D. citri* obtidas indicam similaridades importantes a de outros membros de Sternorrhyncha. Nesse contexto, a migração de simbiossiontes do bacterioma para os oócitos em maturação de *D. citri*, ocorre de modo semelhante ao descrito para aleirodídeos, caracterizando-se pela migração de bacteriócito intacto. Este último, atravessa o epitélio de revestimento do oócito, formado por células foliculares, e invade o oócito, liberando as bactérias nele contidas. Entretanto, os simbiossiontes associados ao sincício do bacterioma, são liberados na hemocele através de uma pequena abertura formada no epitélio de revestimento dessa estrutura, invadindo o oócito por um mecanismo distinto. Os simbiossiontes contidos no oócito, formam um agrupamento de aspecto arredondado (= "symbiont ball") na região posterior do oócito, próximo ao pedicelo.

Palavras-chave: Psílídeo dos citros; Ovário; Morfologia; Oogênese; Endossimbiontes; Ultraestrutura

ABSTRACT

Ultrastructure of the female reproductive system and mechanisms of transovarial transmission of endosymbionts of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae)

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) became a serious problem to the citrus industry in São Paulo State once the Huanglongbing disease (“greening”), which is caused by the bacteria *Candidatus Liberibacter* sp., was detected. Psyllids are known to harbor endosymbiont microorganisms, which are vertically transmitted to the progeny and play a key role in the nutritional ecology of their hosts. Therefore, we aimed to characterize the morphology of the reproductive system during *D. citri* development as a tool for further investigation on the symbiont migration from the bacteriome to the reproductive tissues. *D. citri* has telotrophic ovaries with ovarioles organized in a bouquet, sharing all other characteristics with the remaining Sternorrhyncha. In developed ovarioles, trophocytes seem to lack any membrane delimitation. Only one oocyte develops at a time in the vitellarium, remaining in communication with the trophic chamber by a cytoplasmic bridge, named trophic cord. The morphostructural information reported in here on the *D. citri* reproductive system shows important similarities with other Sternorrhyncha. Symbionts associated to the bacteriome of *D. citri* migrate to the ovaries and invade the oocytes during ovary maturation, as previously reported for aleyrodids. In this case, symbionts will move within the bacteriocyte as it detaches from the bacteriome and moves through the oocyte follicular epithelium, releasing the contained bacteria into the oocyte. However, symbionts associated to the bacteriome syncytium are released into the hemocoel through small openings on the bacteriome epithelium, invading the oocyte by a different mechanism. All symbionts that invaded or were discharged into the oocyte aggregate into a ball-like symbiont structure at the posterior pole close to the egg pedicel.

Keywords: Citrus psyllid; Ovary; Morphology; Oogenesis; Endosymbionts; Ultrastructure

1 INTRODUÇÃO

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) adquiriu “status” de uma das mais importantes pragas dos citros por ser vetora da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., fitopatógeno causador do “greening” ou Huanglongbing. Essa doença afeta severamente espécies cítricas de interesse comercial, causando alterações que prejudicam ou inviabilizam a industrialização e/ou a comercialização do fruto *in natura* (COLETTA FILHO et al., 2004; COLETTA FILHO, 2007; TEIXEIRA et al., 2008).

Apesar da relevância dessa espécie devido à sua interação com microrganismos fitopatogênicos (COLETTA FILHO et al., 2004; HUNG et al., 2004), pouco se sabe sobre os aspectos morfo-fisiológicos relacionados à reprodução e/ou demais simbiontes presumivelmente associados ao aparelho reprodutor, e consequente sucesso bioecológico desse psíldeo (WITLACZIL, 1885; BÜNING, 1994; SUBANDIYAH et al., 2000; THAO et al., 2000)

Os ovários de insetos são órgãos geralmente simétricos e dispostos lateralmente ao canal alimentar, no abdome. Cada ovário constitui-se de unidades funcionais cilíndricas ou afiladas, denominadas ovaríolos, nas quais se desenvolvem os folículos ovarianos, dando origem aos ovos maduros. O número de ovaríolos por ovário pode ser variável entre espécies, podendo ainda, haver assimetria em um mesmo indivíduo. Os dois ovários estão dispostos na extremidade dos ovidutos laterais, os quais se combinam posteriormente para formar o oviduto comum. O oviduto comum possui estruturas anexas relacionadas à cópula e/ou oviposição, tais como espermateca e glândulas acessórias e/ou coletéricas, e abre-se ventralmente na extremidade posterior do sétimo, oitavo ou nono segmentos abdominais na maioria das espécies (KING; BÜNING, 1985; YAOGUO; SONNINO; CIRIO, 1988; KAULENAS, 1992; BÜNING, 1994; SZKLARZEWICZ; JABLONSKA; BILINSKI, 2004; TOGASHI; ITABASHI, 2005; NARDON, 2006). Os ovaríolos são organizados em regiões morfo-funcionais distintas, ao longo de seu eixo antero-posterior, sendo observados o filamento terminal, germário e/ou câmara trófica, vitelário e pedicelo. O filamento terminal desempenha função de suporte, dando sustentação ao ovário ou ovaríolos na cavidade abdominal. Contudo, este pode apresentar-se de tamanho reduzido ou rudimentar, condição na qual a inervação traqueolar e mesmo o tecido adiposo conferem sustentação às gônadas. O germário é o sítio de divisão e diferenciação das células germinativas, as quais formam cistos (= grupos de células germinativas diferenciadas), a partir dos quais terão origem os trofócitos e oócitos que, juntamente com células somáticas, formarão os folículos ovarianos.

Estes, por sua vez, no vitelário, região do ovaríolo posterior ao germário, sofrem modificações morfo-funcionais conspícuas, resultando no completo desenvolvimento ou maturação do ovo. Quando da oviposição, o pedicelo, uma barreira celular na base do vitelário responsável pela comunicação deste com o lúmen do oviduto lateral, permite a passagem do ovo posteriormente no oviduto lateral (BÜNING, 1994; 1998; STYS; BÜNING; BILINSKI, 1998; SANTOS, 2001; SZKLARZEWICZ et al., 2008; TWORZYDLO; BILINSKI, 2008). Sugere-se ainda, que substâncias secretadas pelas células pedicelares possam influenciar na maturação do aparelho reprodutor (MARIANO; IBÁÑEZ; BOZZINI, 2008).

D. citri, a exemplo de outros insetos sugadores de seiva da subordem Sternorrhyncha, mantêm associações de simbiose obrigatória com microrganismos procariotos, os quais se alojam em estruturas celulares específicas, bacteriócitos ou micetócitos, contidas no interior do hospedeiro, em estruturas chamadas de bacterioma ou micetoma (DOUGLAS, 1998; BAUMANN, 2005). O tipo mais comum de bacterioma descrito consiste em uma estrutura complexa formada por três tipos celulares: *tecido sincicial*, que compreende uma área multinucleada central, circundada por *bacteriócitos* uninucleares arredondados; e um envelope de *células achatadas* envolvendo todo o órgão. O citoplasma dos bacteriócitos contém bactérias pleomórficas Gram negativas, denominadas endossimbionte primário, o qual é transmitido verticalmente à progênie, via aparelho reprodutor. No sincício do bacterioma ocorrem bactérias morfológicamente distintas, também transmitidas verticalmente (SUBANDIYAH et al., 2000). No entanto, apesar do crescente volume de trabalhos em relação à associação inseto-simbionte, são poucos os estudos voltados aos mecanismos de transmissão de endossimbiontes do bacterioma aos tecidos reprodutivos (ZELAZOWSKA; BILÍNSKI, 1999; SACCHI et al., 2000; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006). Dessa forma, considerando a importância da transmissão vertical desses simbiossiontes na interação multitrófica *inseto - microrganismo - planta*, o presente trabalho teve por objetivo avaliar morfológica e ultraestruturalmente o aparelho reprodutor de *D. citri*, enfatizando o ovário e os parâmetros envolvidos na transmissão transovariana de endossimbiontes. Tais informações poderão embasar novos estudos acerca da reprodução dessa espécie, bem como pesquisas aplicadas visando o desenvolvimento de técnicas de controle dessa praga ou do patógeno por ela veiculado.

Referências

- BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.
- BIN, F.; VINSON, S.B.; STRAND, M.R.; COLAZZA, S. Source of and egg kairomone for *Trissolcus basalis*, a parasitoid of *Nezara viridula*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 18, p. 7-15, 1993.
- BÜNING, J. The ovary of Ectognatha, the Insecta *s.str.* In: BÜNING, J. (Ed.). **The insect ovary: ultrastructure, previtellogenic growth and evolution** London: Chapman & Hall, 1994. p. 281-299.
- COLETTA FILHO, H.D. Huanglongbin – HLB (Ex-Greening) no Brasil: situação atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., 2007, Maringá-PR, 2007. Disponível em: <<http://www.amea.org.br>>. Acessado em: 15 out 2008.
- COLETTA FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; CARLOS, E.F.; MACHADO, M.A. A bactéria *Candidatus Liberibacter* em plantas com hunglongbin (ex- greening) no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 2, p. 367-374, 2004.
- CONTI, E.; BIN, F. Parasitoids of concealed noctuid eggs and their potential in biological control of gramineae stemborers. **Redia**, Portici, v. 83, p. 87-104, 2000.
- DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect-microbial symbiosis: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 17-37, 1998.
- HUNG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbin in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 96-102, 2004.
- KAULENAS, M.S. **Insect accessory reproductive structures**. Function, structure, and development. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 224p.
- KING, R.C.; BUNING, J. The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology: embryogenesis and reproduction**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 1. p.37-825.
- MARIANO, M.I.; IBÁÑEZ, C.I.; BOZZINI, J.P. Post embryonic development of ovariole pedicels in *Triatoma infestans* (Klugh, 1834). A morphometrical approach. **Acta Microscopica**, Caracas, v. 17, n. 1, p. 28-38, 2008.
- NARDON, P. Ovogenèse et transmission des bactéries simbiotiques chez le charançon *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionoidea). **Annales de la Société Entomologique de France**, Leiden, v. 42, n. 2, p. 129-164, 2006.
- SACCHI, L.; NALEPA, C.A.; LENZ, M.; BANDI, C.; CORONA, S.; GRIGOLO, A.; BIGLIARDI, E. Transovarial transmission of symbiotic bacteria in *Mastotermes darwiniensis*

(Isoptera: Mastotermitidae): ultrastructural aspects and phylogenetic implications. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, n.6, p. 1308-1313, 2000.

SANTOS, D.C. **Vitelogênese e coriogênese em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae)**: estudo morfológico e citoquímico. 2001. 151p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2001.

SZKLARZEWICZ, T.; MOSKAL, A. Ultrastructure, distribution, and transmission of endosymbionts in the whitefly *Aleurochiton aceris* Modeer (Insecta, Hemiptera, Aleyrodinea). **Protoplasma**, Leipzig, v. 218, p. 45-53, 2001.

STYS, P.; BÜNING, J.; BILINSKI, S.M. Organization of the tropharia in the telotrophic ovaries of the dipsocoromorphan bugs *Cryptostemma alyenum* Herrich-Schaeffer and *C. carpaticum* Josifov (Heteroptera: Dipsocoridae). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 129-133, 1998.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, Tokyo, v. 17, p. 983-989, 2000.

SZKLARZEWICZ, T. Structure of ovaries of scale insects. II. Margarodidae (Insecta, Hemiptera, Coccinea). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 27, p. 319-324, 1988.

_____. Structure and development of the telotrophic ovariole in ensign scale insects (Hemiptera, Coccoomorpha: Ortheziidae). **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 29, p. 31-38, 1997.

SZKLARZEWICZ, T.; MOSKAL, A. Ultrastructure, distribution, and transmission of endosymbionts in the whitefly *Aleurochiton aceris* Modeer (Insecta, Hemiptera, Aleyrodinea). **Protoplasma**, Leipzig, v. 218, p. 45-53, 2001.

SZKLARZEWICZ, T.; JABLONSKA, A.; BILINSKI, S.M. Ovaries of *Petrobius brevistylis* (Archaeognata, Machilidae) and *Tricholepidion gertschi* (Zygentoma, Lepidotrichidae): Morphology, ultrastructure and phylogenetic implications. **Pedobiologia**, Jena, v. 48, p. 477-485, 2004.

SZKLARZEWICZ, T.; KEDRA, K.; NIZNIK, S. Ultrastructure and transovarial transmission of endosymbiotic microorganisms in *Palaeococcus fuscipennis* (Burmeister) (Insect, Hemiptera, Coccinea: Monophlebidae). **Folia Biologica**, Kraków, v. 54, p. 69-74, 2006.

SZKLARZEWICZ, T.; JANKOWSKA, W.; WIECZOREK, K.; WEGIEREK, P. Structure of ovaries of primitive aphids *Phylloxera coccinea* and *Phylloxera glabra* (Hemiptera, Aphidinea, Phylloxeridae). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 89, p. 1-9, 2008.

TAEHYUN, K.; MYUNGJIN, M. Fine structure of female accessory reproductive gland in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Korean Journal of Entomology**, Suwon, v. 33, p. 165-172, 2003.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD-JAGOUEIX, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huaglongbin disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 139-150, 2008.

THAO, M.L.; MORAN, N.A.; ABBOT, P.; BRENNAN, E.B.; BURCKHARDT, D.H.; BAUMANN, P. Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66; p. 2898-2905, 2000.

TIRONE, G.; AVANCINI, M.P. Development of female accessory glands of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) during oogenesis. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 1-7, 1997.

TOGASHI, K.; ITABASHI, M. Maternal size dependence of ovariole number in *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Colydiidae). **Journal of Forest Research**, Tokyo, v. 10, p. 373-376, 2005.

TWORZYDLO, W.; BILINSKI, S.M. Structure of ovaries and oogenesis in dermaterans. I. Origin in functioning of the ovarian follicles. **Arthropod Structure & Development**, Amsterdam, v. 37, p. 310-320, 2008.

WITLACZIL, E. Die anatomie der psylliden. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, Leipzig, v. 42, p. 569-638; 1885.

YAOGE, H.; SONNINO, A.; CIRIO, U. Ovariole number of italian geographic populations of Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say). **American Potato Journal**, Washington, v. 65, p. 125-129, 1988.

ZELAZOWSKA, M.; BILÍNSKI, S.M. Distribution and transmittion of endosymbiotic microorganisms in the oocytes of the pig louse, *Haematopinus suis* (L.) (Insecta: Phthiraptera). **Protoplasma**, Leipzig, v. 209, p. 207-213; 1999.

2 MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DO APARELHO REPRODUTOR DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Resumo

Diaphorina citri tornou-se uma séria ameaça a citricultura paulista por ser o vetor do agente etiológico do “greening” ou Huanglongbing. Apesar da importância das interações desse inseto com microrganismos endossimbiontes, os quais desempenham papel fundamental em sua ecologia nutricional, não constam trabalhos acerca do aparelho reprodutor e do mecanismo de transmissão vertical de simbiontes via ovário. Dessa forma, este trabalho objetivou caracterizar morfológicamente o aparelho reprodutor feminino durante o seu desenvolvimento, para embasar a identificação do processo de transporte dos simbiontes do bacterioma aos tecidos reprodutivos. *D. citri* possui ovário do tipo telotrófico, com ovariolos organizados em “bouquet”, apresentando filamento terminal rudimentar, com demais características gerais semelhantes àsquelas observadas para outros Sternorrhyncha. Os trofócitos tornam-se desprovidos de membrana celular a partir da pré-vitelogênese, formando um trofário sincicial. Um cordão trófico mantém o oócito em desenvolvimento em comunicação com o trofário. O vitelário apresenta somente um oócito em crescimento em cada ciclo de maturação. A partir da vitelogênese observa-se intensa ocorrência de vesículas no sincício do trofário, indicando processo de síntese de componentes citoplasmáticos a serem encaminhados ao oócito. Durante a vitelogênese, ocorre intensificação do metabolismo das células foliculares, justificado pelo aumento no número de mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A incorporação de lipídeos e proteínas ao vitelo se dá ativamente através das células foliculares, sendo observadas vesículas volumosas se movimentando em direção ao oócito. A coriogênese torna-se evidente ao final do desenvolvimento do oócito pela atividade das células foliculares. O oócito, agora com seu desenvolvimento completo, passa através do pedicelo que se abre em comunicação com o bulbo do oviduto lateral correspondente.

Palavras-chave: Psilídeo dos citros; Ovários; Vitelogênese; Morfologia

Abstract

The psyllid *Diaphorina citri* became a serious threat for the Brazilian citriculture as it vectors the causative agent of the Huanglongbing. Despite the importance of the interactions with endosymbionts that play a key role in their nutritional ecology, there is no data available on the morphology and structure of the reproductive system and on the routes symbionts employ to migrate from the bacteriome to the ovary, as they are vertically transmitted. Thus, this study aimed to characterize the reproductive system during its development to support further studies on the symbiont migration from the bacteriome to the reproductive tissues. *D. citri* has telotrophic ovaries. Ovarioles are organized in a bouquet, and have a rudimentar terminal filament. All other general characteristics of the ovary are similar to those of other Sternorrhyncha. The trophocytes are devoided of cell membrane once vitellogenesis starts,

forming a trophic syncytium. A trophic cord maintains the developing oocyte in communication with the tropharium. Only one oocyte grows at a time in the vitellarium in each maturation cycle. Once vitellogenesis starts, there is an intense vesiculation in the trophic syncytium, indicating the synthesis of cytoplasmic components which are then transferred to the oocyte. The metabolism of the follicle cells is intensified during vitellogenesis, which is observed by the increase in the number of mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi complex. Lipid and protein accumulation in the oocyte occur by intensive activity of incoming vesicles through the follicular cells. The choriogenesis becomes evident at the end of oocyte development as the chorion is secreted by the follicular cells. The fully developed oocyte passes through the pedicel, which opens in the apical bulbous of the corresponding lateral oviduct.

Keywords: Citrus psyllid; Vitellogenesis; Female reproductive system; Morphology

2.1 Introdução

Os ovários de insetos são diferenciados morfo-funcionalmente em duas categorias, panoístico e meroístico (BONHAG, 1958; KING; BÜNING, 1985; BÜNING, 2006). Nos ovaríolos panoísticos, todas as oogônias diferenciam-se em oócitos, os quais são responsáveis pela síntese e armazenamento de determinados elementos, tais como RNA, importantes para assegurar o desenvolvimento do futuro embrião. No entanto, em ovaríolos meroísticos, algumas células germinativas transformam-se em células especializadas (= trofócitos) na síntese de componentes celulares, que serão acrescidos ao gameta funcional (= oócito). Os trofócitos, frequentemente poliplóides, suprem o oócito com macromoléculas e organelas durante o período de crescimento pré-vitelogênico. Outra característica distintiva atribuída aos ovários meroísticosestá no arranjo espacial e na interação entre trofócitos e oócitos em cada ovaríolo, podendo ser politrófico ou teletrófico. Em ovaríolos politróficos, cada oócito é acompanhado por seu próprio grupo de células nutridoras, sendo, este conjunto, revestido por células foliculares (somáticas), constituindo as unidades funcionais dos ovaríolos, denominadas folículos ovarianos ou câmaras-ovo. Já os ovaríolos telotróficos apresentam todos os trofócitos retidos em sua porção apical, formando o trofário ou câmara-trófica. Os oócitos, neste caso, localizam-se na porção basal do trofário, deslocando-se posteriormente no ovaríolo para o vitelário. Durante seu crescimento, o oócito mantém-se em comunicação com o trofário por meio de extensões citoplasmáticas denominadas cordões tróficos, através dos quais são transferidos os produtos de

secreção dos trofócitos ao oócito (PATRÍCIO; CRUZ-LANDIM, 2001; BÜNING, 2006; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2006; TWORZYDLO; BILÍNSKI, 2008).

Os ovariolos apresentam-se organizados morfo-funcionalmente em três regiões distintas, sendo: i) o filamento terminal, localizado na extremidade anterior do ovariolo, que pode unir-se aos demais filamentos do ovário, formando o filamento mediano, sustentando o ovário na cavidade abdominal; ii) o germário ou trofário, região apical do ovariolo logo abaixo do filamento terminal, abriga células que darão origem aos trofócitos, oócitos e células foliculares, constituintes do folículo ovariano; iii) o vitelário, região posterior ao trofário, na qual o oócito passa pelo processo de vitelogênese e coriogênese (BONHAG, 1958; BÜNING, 1994; SANTOS; GREGÓRIO, 2003).

O número de ovariolos por ovário varia consideravelmente entre os diferentes táxons, podendo ocorrer desde apenas um ovariolo funcional em pulgões vivíparos, a mais de 2000 ovariolos em rainhas de cupins (BÜNING, 1985; PATRÍCIO; CRUZ-LANDIM, 2001; GILLOT, 2005). Os representantes de Hemiptera possuem ovário do tipo meroístico telotrófico, exibindo entre 1 e 15 ovariolos por ovário nas subordens Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha, e cerca de 7 ovariolos na subordem Heteroptera (BÜNING, 1985; 1994; LALITHA; SHYAMASUNDARI; RAO, 1997; LEMOS et al., 2005; HUMMEL; ZALOM; PENG, 2006).

2.2 Revisão Bibliográfica

2.2.1 Morfologia do aparelho reprodutor feminino

O aparelho reprodutor feminino de insetos desempenha variadas funções, destacando-se a produção de ovos, recepção e armazenamento de espermatozóides e a coordenação de eventos envolvidos na oviposição (BÜNING, 1994; CHAPMAN, 1998; PAPAJ, 2000; SANTOS, 2001; SIMICZYJEW, 2003).

De forma geral, os ovários de insetos são formados por unidades tubulares, cilíndricas ou afiladas, denominadas ovariolos, onde os folículos ovarianos se desenvolvem dando origem aos oócitos maduros (BARKER, 1989; BUNING, 1994; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2006). Existem dois tipos básicos de ovariolos: panoístico e meroístico. Essa classificação baseia-se no destino das células germinativas no decorrer do desenvolvimento. Nos ovariolos panoísticos, todas as células germinativas podem tornar-se oócitos, enquanto nos meroísticos, as

divisões dos cistoblastos levam à formação de agrupamentos (“clusters”) de células-irmãs (cistócitos), as quais permanecem interconectadas por pontes citoplasmáticas formando um sincício/cisto (KING; BUNING, 1985; BUNING, 1994; SIMICZYJEW, 2003). Os cistócitos sofrem diferenciação dando origem aos trofócitos e oócitos. Os ovários meroísticos podem ser classificados em duas categorias básicas: (1) tipo politrófico, caracterizado pela formação alternada de trofócitos e oócitos ao longo do ovaríolo; e (2) tipo telotrófico, no qual as células tróficas são mantidas numa câmara terminal, comunicando-se com os oócitos através de cordões tróficos (KING; BUNING, 1985; KAULENAS, 1992; BUNING, 1994; BILÍNSKI, 1998; GILLOT, 2005). A estrutura morfológica de cada ovaríolo é representada basicamente por três regiões distintas: o *filamento terminal*, composto por tecido conectivo ou conjuntivo e disposto intimamente à extremidade distal do ovaríolo; o *germário ou trofário*, o qual situa-se na parte apical anterior, logo abaixo do filamento terminal, consistindo de uma massa de células capazes de se diferenciar em oócitos e/ou trofócitos; e o *vitelário*, no qual os oócitos, circundados pelas células foliculares, passam pelo processo de vitelogênese e aumentam de tamanho, compreendendo a maior porção do ovaríolo (KING; BUNING, 1985; SANTOS, 2001; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2006).

Os hemípteros apresentam ovaríolo meroístico telotrófico, sendo comum a existência de um grupo único de células germinativas em cada ovaríolo, formado a partir de divisões mitóticas de um único cistoblasto (BUNING, 1994). De estrutura complexa (ATELLA et al., 2005), todas as células nutridoras em potencial (= trofócitos) desse tipo de ovário são mantidas no germário, o qual se transforma em câmara terminal (= câmara trófica) durante o período reprodutivo (BRUNT, 1971; BUNING, 1979, 1994; SIMICZYJEW, 2003; BUNING, 2005). Na maioria dos insetos com ovaríolos telotróficos, a multiplicação de células germinativas e a formação de cistoblastos ocorrem apenas durante a fase pré-imaginal, com exceção de alguns grupos de hemípteros nos quais podem ocorrer mitoses para formação de trofócitos também em fêmeas adultas (HUEBNER; ANDERSON, 1972). Os oócitos em desenvolvimento mantêm-se conectados ao trofário através de projeções ou prolongamentos citoplasmáticos especializados, denominados cordões tróficos (CAVE, 1975; LALITHA et al., 1997; SZKLARZEWICZ et al., 2000; BUNING, 2005). Os cordões tróficos têm origem na extremidade posterior do centro trófico, uma região não-celularizada circundada pelos trofócitos, e se irradia para a porção posterior do ovaríolo, ligando-se ao oócito (LALITHA et al., 1997; SZKLARZEWICZ et al.,

2000). Geralmente, ricos em microtúbulos (HUEBNER; DIEHL-JONES, 1993; LANE; STTEBINGS, 1998), essas pontes citoplasmáticas que interligam os micro-ambientes celulares distintos de trofócitos e oócitos, transportam organelas, RNAs e proteínas do citoplasma do trofócito ao oócito, ao longo do seu processo de maturação (HUGHES; BERRY, 1970) até o final do processo vitelogênico, quando ocorrerá a deposição da membrana vitelínica e do córion (DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA; OGORZALEK, 2005). Durante as etapas de crescimento do oócito, o núcleo torna-se uma vesícula germinal dormente e o oócito adquire os componentes do vitelo via endocitose. As células nutridoras (= trofócitos), responsáveis pela síntese de elementos citoplasmáticos do oócito, tornam-se poliplóides e ativas, destinando a maioria do RNA e proteínas produzidas ao oócito via pontes citoplasmáticas. Apesar de manterem a comunicação intercelular em função da permanência das pontes citoplasmáticas, oócitos e trofócitos tornam-se morfológica e fisiologicamente diferentes. Dessa forma, a incorporação de elementos moleculares provenientes dos trofócitos no citoplasma do oócito obedece a eventos celulares regulados ativamente, como a polaridade na interface trofócito-oócito. O potencial elétrico gerado pela diferença de concentração de Ca^{2+} , estabelecido pelo gradiente iônico através das pontes citoplasmáticas, influencia a distribuição de proteínas endógenas solúveis, bem como o arranjo das proteínas carregadas eletricamente no citoplasma do oócito (BERRY, 1982; COLE; WOODRUFF, 1997; 2000; TELFER; WOODRUFF, 2002). Em ovaríolos telotróficos, o gradiente elétrico ocorre entre os trofócitos distais e o centro do trofário, sendo que todas as células comportam-se da mesma maneira em agrupamentos sinciciais. Assim como em ovários politrófico, grande parte da produção de RNA e proteínas do trofário é destinada a atravessar as pontes citoplasmáticas, ficando retidas no oócito (WOODRUFF; ANDERSON, 1984; MUNZ; DITTMAN, 1987; COLE; WOODRUFF, 1997; TELFER; WOODRUFF, 2002).

A organização dos ovaríolos é bastante variável em hemípteros. Os representantes de Coccoomorpha são os mais diversos, já que não apresentam o filamento terminal no ovaríolo (HUEBNER, 1984; BÜNING, 1993). A estrutura do aparelho reprodutor e o processo de oogênese em Hemiptera são bem estudados para representantes de Heteroptera (CARAYON, 1950; LALITHA et al., 1997; SZKLARZEWICZ et al., 2000; ATELLA et al., 2005; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2006), mas são poucos os trabalhos voltados aos Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha. As descrições do aparelho reprodutor de Sternorrhyncha baseiam-se naquelas realizadas principalmente para afídeos e coccídeos, havendo poucos relatos

para aleirodídeos e psilídeos (KSIAZKIEWICZ, 1980; BUNING, 1985; SZKLARZEWICZ, 1988; BUNING, 1994; SZKLARZEWICZ et al., 2000).

2.3 Material e Métodos

Os espécimes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 empregados nos experimentos foram provenientes de população mantida em condições controladas ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR, fotofase 14 h), utilizando-se mudas de murta, *Murraya paniculata*, como substrato de criação (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007). Ninfas de 4^o e 5^o ínstars e fêmeas adultas foram amostradas em diferentes estágios do desenvolvimento para a obtenção do aparelho reprodutor, o qual foi processado de acordo com as análises morfo-estruturais subseqüentes.

2.3.1 Obtenção de ovários

Ninfas de penúltimo e último instar, fêmeas de *D. citri* recém-emergidas e nas fases de pré-vitelogênese e vitelogênese, determinadas em testes preliminares, foram dissecadas em solução de Ringer tamponada para insetos ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, KCl 182mM, NaCl 46mM, Tris base 10mM, HCl 1N para ajustar pH 7,2) (CSH PROTOCOLS, 2007), sob microscópio estereoscópico Motic SMZ-168. Logo após a extração, os ovários foram transferidos imediatamente para solução fixadora condizente ao tratamento subseqüente.

2.3.2 Preparação de ovários para análise em montagem total

Ovários de *D. citri*, previamente fixados em solução AFATD (75 ml etanol 96%, 10 ml formaldeído 40%, 5 ml ácido acético, 10 ml dimetilsulfóxido, 1g ácido tricloroacético) por 2 h à temperatura ambiente, foram hidratados em série decrescente de etanol (96%, 80%, 70%, 50% e 30% - 5 min cada) e água destilada (5 min), sendo, posteriormente, hidrolisados em ácido clorídrico normal (5 min) (8,33 ml de HCl para 100 ml de H_2O). Após a hidrólise, os ovários foram tratados com reativo de Schiff (30 min), lavados em água destilada (5 min) e corados em verde luz (1 min) (MARTÍNEZ, 2002). Em seguida, o material foi lavado em água destilada (5 min), álcool absoluto (2x - 10 min/cada) e diafanizados em xilol (2x - 10 min/cada) para

montagem em lâmina e lamínula em Entelan[®] (Merck). As análises morfológicas e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axiostar Plus, equipado com câmera de captura de imagens Moticam 2000 e software Image Advanced 3.2 (Motic Co.).

2.3.3 Preparação de ovários para análise histológica

Logo após a dissecação, os ovários foram mergulhados em solução fixadora PFA-TBS (paraformaldeído 5%, Tween20 1%, em tampão fosfato 0,1%, pH 7,2) ou Karnovski (glutaraldeído 3%, paraformaldeído 3%, em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl₂), por 24 horas. Após a fixação, foram lavados no mesmo tampão (3x – 10 min) e desidratados em concentrações crescentes de etanol (1x - 30%, 50%, 70% e 90%, 3x - 100% - 10 min/cada). Na seqüência, o material foi infiltrado em solução de historresina-etanol absoluto (1:1) por 24 horas, seguido por historresina pura por 24 horas a 4°C. Logo após, os ovários foram transferidos para formas específicas, contendo solução de inclusão (Leica Historesin[®]), permitindo-se a polimerização da historresina a temperatura ambiente, por 48 h.

Cortes semi-finos (1-4 µm) foram obtidos em ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT e corados em solução aquosa de azul de toluidina (azul de toluidina 1%, borato de sódio 1% p/v) ou Azan Heidenhain-Mallory (azul de anilina 0,5%, laranja G 1%, fucsina ácida 3%, ácido fosfotúngstico 1%, p/v) (BEHMER et al., 2003) por 1 min. Após a coloração, os cortes foram rapidamente lavados em água destilada a fim de se retirar o excesso de corante, para posterior secagem a 60°C por 20 min, antes da montagem de lamínula em Entelan[®] (Merck). A análise e registro fotográfico do material processado foram realizados em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 equipado com câmera Axicam MRc (Carl Zeiss[®]).

2.3.4 Microscopia de fluorescência

Os ovários dissecados foram fixados em solução fixadora PFA-TBS (paraformaldeído 5%, tween20 1%, em tampão fosfato 0,1%, pH 7,2), por 24 horas. Em seguida, o material foi lavado no mesmo tampão (3x – 10 min) e desidratado em série crescente de etanol (1x - 30%, 50%, 70% e 90%, 3x - 100% - 10 min/cada). Os ovários foram infiltrados em solução de historresina-etanol absoluto (1:1) (24 h), seguido por historresina pura (24 h). Após a infiltração,

o material foi transferido para formas de formato cônico contendo solução de inclusão (Leica HistoResin[®]) para polimerização, durante 48 h, em temperatura ambiente.

Os cortes semi-finos (1 μm) obtidos em ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT, foram submetidos a tratamento com 1,5 μg de diamidino-2-fenilindol em meio de montagem Vectashield[®] (DAPI, Sigma Chemical Co.), durante 15 min, para detecção de DNA, e rodamina conjugada à faloidina (Sigma Chemical Co.), por 15 min, para a evidenciação de filamentos de actina. Após a coloração, o material foi coberto com lamínula e observado sob microscópio de fluorescência Olympus BX51 equipado com câmera Olympus DP 71 para captura de imagens.

2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Os ovários foram fixados em solução Karnovski (glutaraldeído 3%, paraformaldeído 3%, em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl_2), por 24 horas. Após a fixação, seguiu-se à lavagem do material no mesmo tampão (3x – 10 min), seguida pela pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato 50 mM (60 min) e contrastação *in bloc*o com acetato de uranila 0,5 %, por 12 horas. A desidratação foi realizada em concentrações crescentes de acetona (1x - 30%, 50%, 70% e 90%, 3x - 100%, 10 min/cada), procedendo-se à infiltração dos ovários em solução de resina:acetona (1:1) (EMBed 812, Electron Microscopy Science) (24 h) e resina pura (24 h), antes da transferência do material para formas adequadas para a polimerização em estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes ultra-finos (50-70 nm) obtidos com ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT, foram coletados sobre grades de cobre e contrastados em solução de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 1%, para posterior análise e captura de imagens ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900.

2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura

Os ovários e bacteriomas foram dissecados em solução fisiológica (Ringer) e imediatamente transferidos para tubos tipo eppendorf[®] contendo solução fixadora (3% glutaraldeído + 3% paraformaldeído em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl_2), sendo fixados por 24 horas à 4°C. Em seguida, os ovários foram lavados em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2 + 5 mM CaCl_2 (3×10^3), pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no

mesmo tampão (60°) e desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 100%), antes de secagem em ponto crítico (CPD-030 Balzers, BAL-TEC), montagem em “stubbs” e metalização com ouro (SCD-050 Sputter Coater, BAL-TEC). A análise e registro fotográfico foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO 435 VP (Carl Zeiss®).

2.3.7 Desenvolvimento ovariano e análise da influência da cópula na maturação dos ovários de *D. citri*

Adultos de *D. citri* recém-emergidos (≤ 12 h) foram sexados, sendo machos e fêmeas mantidos separados em plantas de murta no interior de gaiolas de polietileno (30 cm altura x 10 cm diâmetro). Embora de um modo geral, possa haver cópula a partir do 2-3 após a emergência (WENNINGER; HALL, 2007), testes preliminares indicaram heterogeneidade quanto ao período de pré-cópula, optou-se por permitir a cópula apenas no décimo dia após a emergência. Dessa forma, machos e fêmeas (proporção 1♀: 1♂) foram acondicionados em gaiolas com as mesmas dimensões supracitadas, permitindo-se o acasalamento por 24 h, após o qual, os machos foram retirados. Para a avaliação do desenvolvimento ovariano e do efeito da cópula na maturação do ovário de *D. citri*, fêmeas virgens e copuladas foram dissecadas a partir da cópula (décimo dia após a emergência) a intervalos de 48 h, até o décimo oitavo dia após a emergência. A confirmação da ocorrência de cópula foi obtida verificando-se o sucesso na transferência de esperma, dado pelo aspecto da espermateca, que, quando distendida, indica a ocorrência de cópula bem-sucedida. Para se avaliar o desenvolvimento do ovário durante o período reprodutivo de *D. citri*, foi considerado o grau de maturação dos ovariólos, se pré-vitelogênicos ou vitelogênicos ou pós-oviposição.

2.4 Resultados

2.4.1 Morfologia geral do aparelho reprodutor feminino de *Diaphorina citri*

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) possui ovário do tipo meroístico telotrófico, formado por cerca de 50 ovariólos dispostos em forma de “bouquet”, podendo haver variações nesse número entre os ovários de um mesmo indivíduo. O par de

ovários localiza-se ventro-lateralmente na região mediana do abdome, dispondo-se lateralmente ao tubo digestivo, sob o bacterioma, estando circundado por tecido adiposo e uma intrincada rede de traquéias, tanto na fase imatura quanto na fase adulta. Em fêmeas recém-emergidas, o ovário ainda é imaturo (Figura 1), e se localiza na região distal do abdome, bem próximo à terminália. Contudo, em fêmeas acasaladas, o ovário maduro (Figura 1) ocupa grande parte do abdome, estendendo-se até à região proximal.

Os ovários abrem-se no cálice ou bulbo apical dos respectivos ovidutos laterais, os quais convergem posteriormente, formando o oviduto comum. Três estruturas acessórias estão ligadas lateralmente ao oviduto comum, um par de glândulas acessórias, uma espermateca e uma glândula coletérica (Figura 2). As glândulas acessórias possuem coloração alaranjada *in situ*, aspecto tubular, com uma região levemente dilatada na extremidade apical e pequena estrutura sacciforme na região proximal, na junção com o oviduto comum. O duto da glândula une-se à porção mediana do oviduto comum, sendo as glândulas colocadas em lados opostos do oviduto. A espermateca está posicionada posteriormente em relação às glândulas acessórias. Apresenta estrutura sacciforme de formato arredondado ou riniforme, e se comunica com o oviduto comum por meio de um duto relativamente curto. A vagina caracteriza-se como uma dilatação na região distal do oviduto comum, imediatamente anterior ao ovipositor, na região da terminália. A glândula de cimento ou coletérica possui formato semelhante ao da espermateca, embora, seja menor. A glândula coletérica está posicionada lateralmente ao oviduto comum, próxima às glândulas acessórias, na base dos escleritos que compõem a terminália, comunicando-se com a região anterior da vagina através de um longo duto composto por estruturas anelares, semelhantes às tenídias presentes em traquéias.

2.4.2 Análise estrutural do aparelho reprodutor de *D. citri*

2.4.2.1 Estrutura dos ovaríolos

Os ovaríolos possuem quatro regiões distintas (Figura 3), sendo *i*) um filamento terminal rudimentar formado por um aglomerado de células somáticas em sua base, as quais tornam-se enfileiradas anteriormente, porém em número reduzido. Posteriormente, tais células parecem ter continuidade, participando da formação da camada de revestimento do ovaríolo, formando uma túnica externa ao redor da *ii*) câmara trófica, a qual possui aspecto ovóide-arredondado, onde

estão contidas as células germinativas. O cordão trófico, que parte do centro trófico, se mantém em comunicação com o oócito em crescimento no *iii*) vitelário, onde, caracteristicamente, apenas

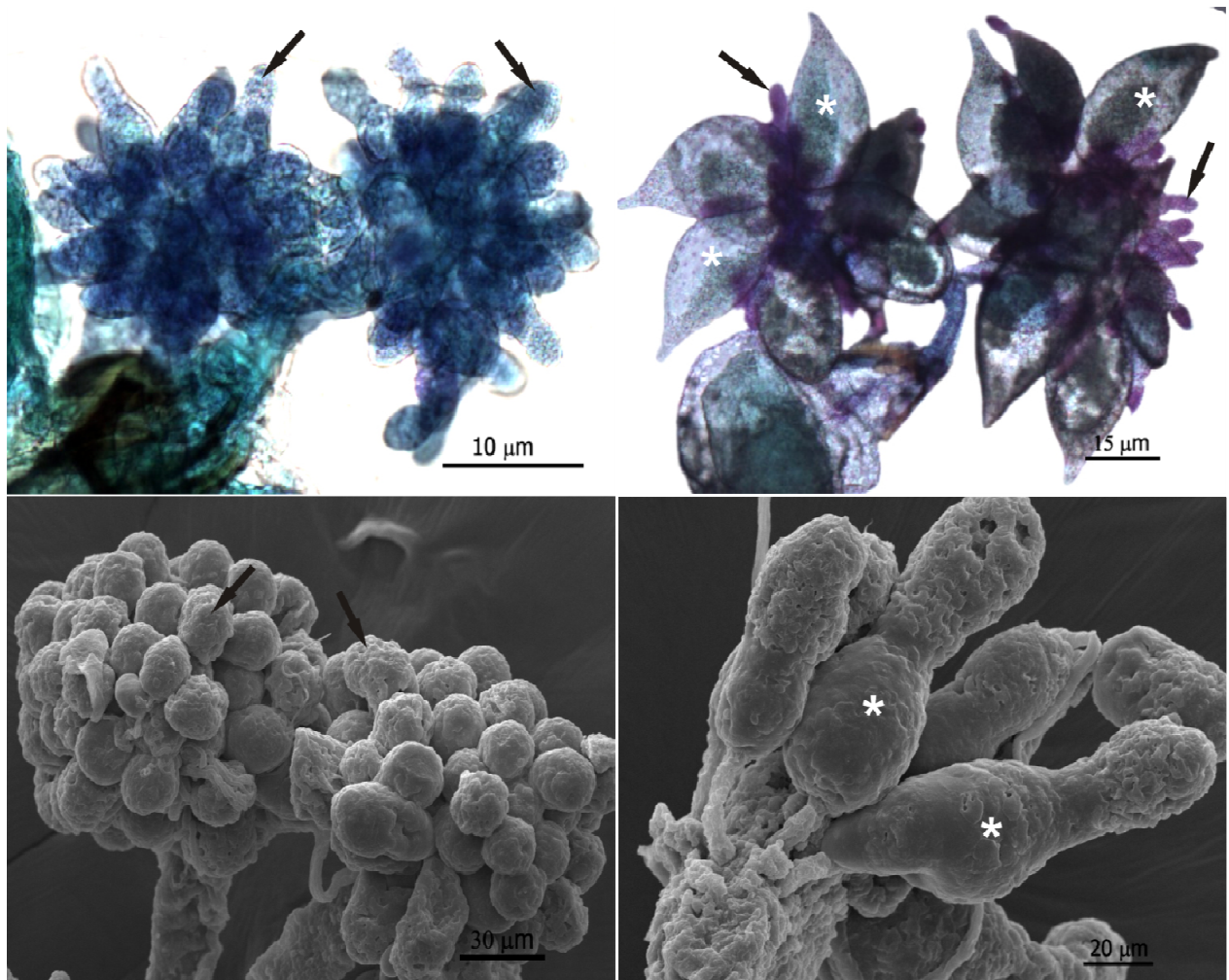


Figura 1 - Ovários de *Diaphorina citri* com evidente metacronia, ovariólos em diferentes graus de maturação. A e C, ovários com ovariólos pré-vitelogênicos (→); B e D, evidenciando ovariólos vitelogênicos (*) e pré-vitelogênicos (→). (A-B, microscopia de luz, A - azul de toluidina, B - Feulgen-verde luz; C-D, microscopia eletrônica de varredura)

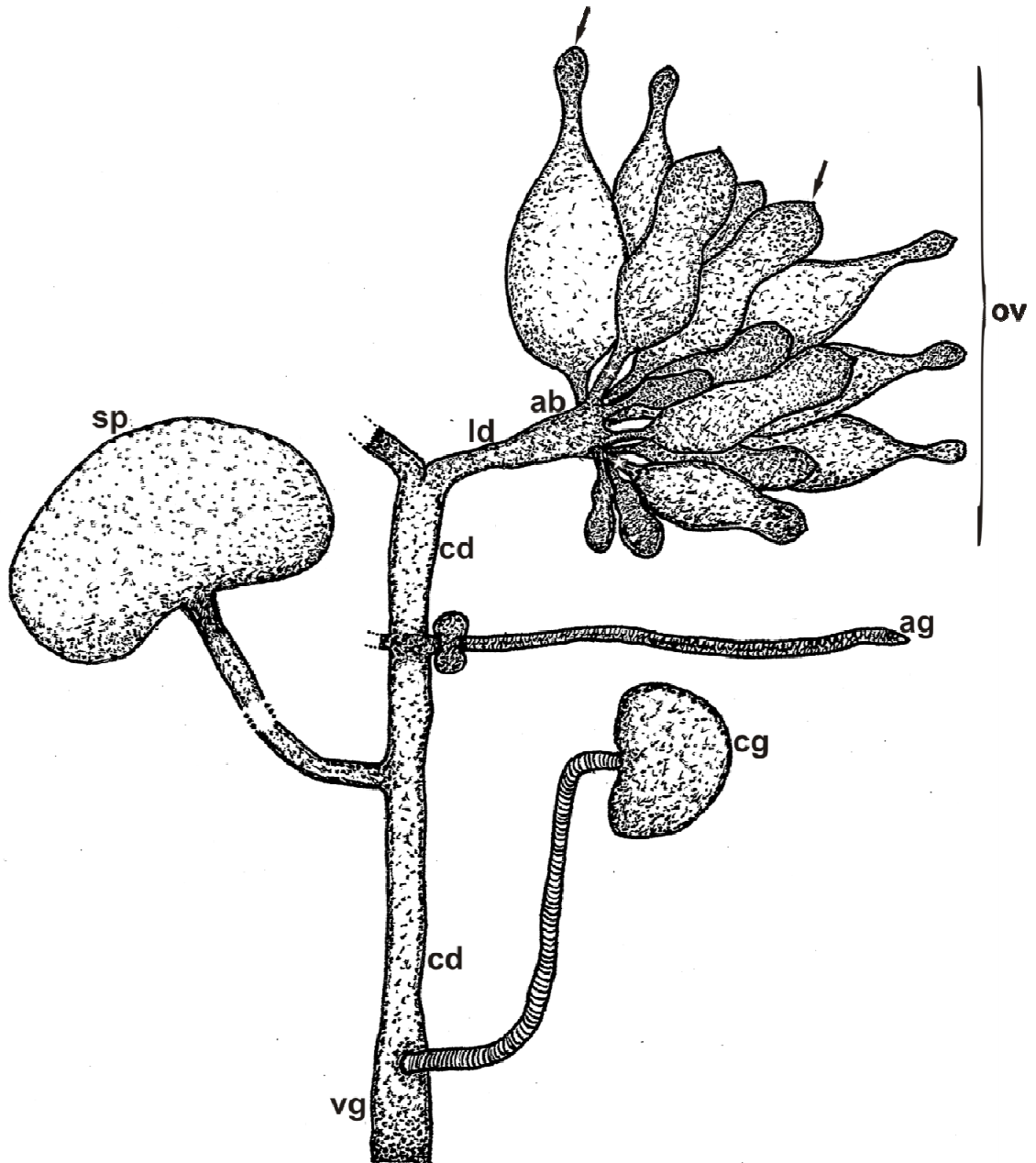


Figura 2 - Figura esquemática do aparelho reprodutor de *Diaphorina citri*, ilustrando o arranjo do ovário (OV) em forma de “bouquet”. Os ovaríolos (OVL), apresentam um pedicelo (PD) por meio do qual unem-se ao bulbo apical (BB) na região anterior do oviduto lateral (DL). O par de ovidutos laterais (oviduto lateral esquerdo não mostrado), unem-se para formar o oviduto comum (DC) ao qual ligam-se um par de glândulas acessórias (GA), uma espermateca (EP) e uma glândula coletérica (GC), esta última, abrindo-se na vagina (VG)

um oócito se desenvolve por ciclo de maturação. Posteriormente ao vitelário, existe o *iv*) pedicelo tubular, formado por células que se mantêm unidas, obstruindo a comunicação do vitelário com o oviduto lateral nos períodos anteriores à completa formação do oócito. No entanto, durante a ovulação, o pedicelo se abre permitindo a passagem do oócito para o oviduto lateral. A partir do final do penúltimo instar (= quarto instar), dois grupos de células alongadas, arranjadas em forma de “leque” (Figura 4), dispõem-se abaixo e lateralmente ao tubo digestivo, imediatamente acima da região que formará a genitália, indicando configuração antecedente ao agrupamento e diferenciação das células germinativas, que finalmente constituirão os ovaríolos. Após a muda para o último instar (= quinto instar), cada ovaríolo consiste de um germário (= câmara terminal), com os cystócitos arranjados em forma de roseta (Figura 4), como consequência de citocinese incompleta. Apesar do tamanho diminuto, o ovário passa a apresentar formato característico de “bouquet” (Figura 1). O arranjo celular em forma de roseta observado na câmara terminal dos ovaríolos imaturos é substituído naqueles mais desenvolvidos devido à diferenciação de células nutridoras e oócitos e da nova disposição dessas células na câmara terminal.

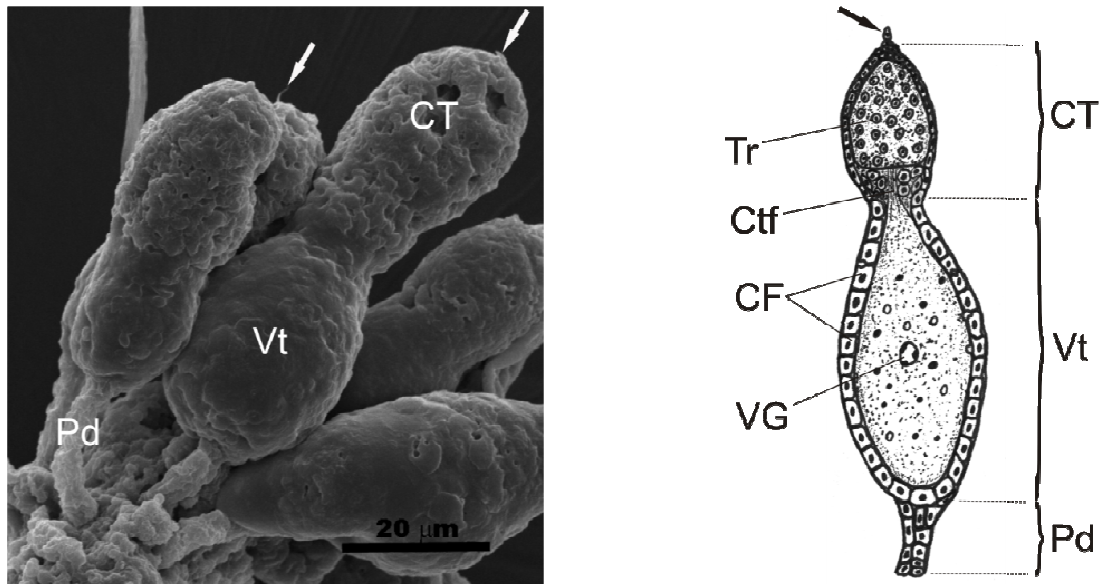


Figura 3 - Estrutura morfo-funcional de ovaríolos de *D. citri*. A) Eletromicrografia de varredura e B) Esquema ilustrativo de ovaríolo em corte e suas regiões funcionais. TF, filamento terminal; CT, câmara terminal; Tr, trofócitos (trofário sincicial); Ctf, cordão trófico; Vt, vitelário; Oo, oócito; VG, vesícula germinal; CF, células foliculares; Pd, pedicelo

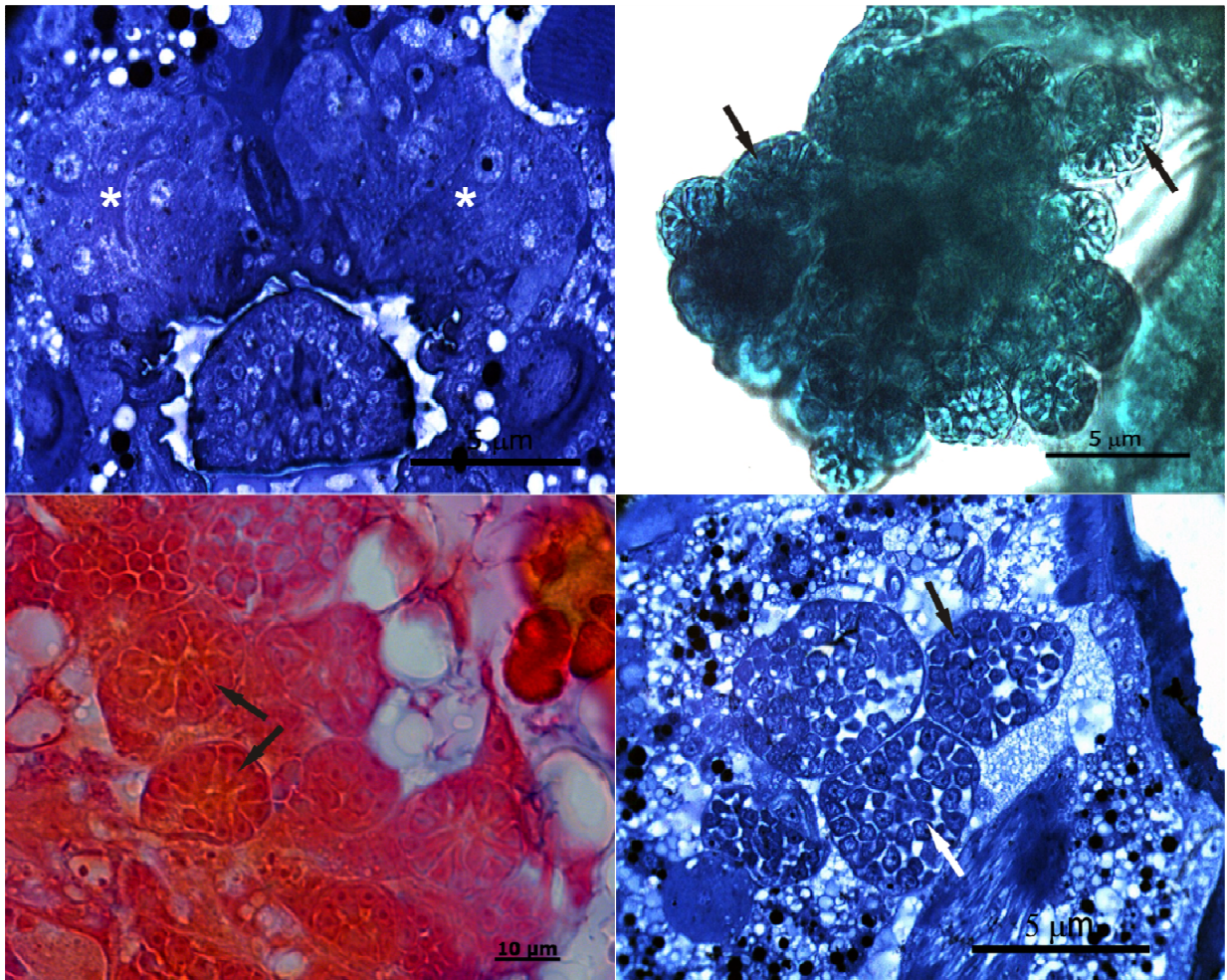


Figura 4 - Fotomicrografias de ovários de ninfas de *D. citri*. A, Corte transversal do abdome de ninfa do quarto ínstar, mostrando grupos celulares na futura área de alocação dos ovários (*); B-C, Ovários de ninfa do quinto instar, cujos ovaríolos apresentam organização celular em forma de roseta (→); D, ovaríolos em desenvolvimento mais avançado que o visualizado em B-C, células germinativas em diferenciação ou diferenciadas (→). A e D, cortes submetidos a coloração com azul de toluidina; B, montagem total, coloração verde-luz; C, corte tratado com azan heidenhain

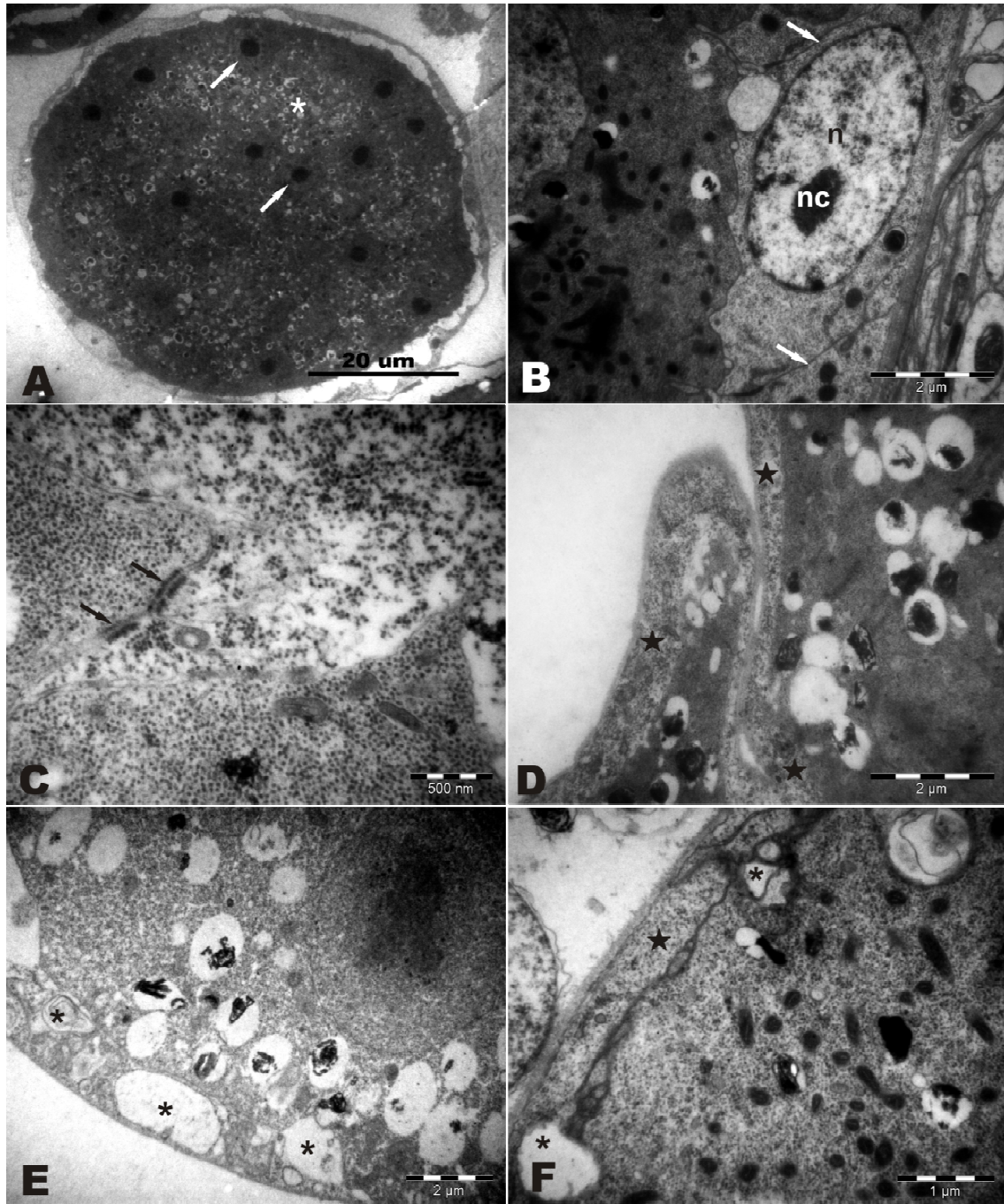


Figura 5 - Eletromicrografias de ovaríolos de *D. citri*. Características ultraestruturais da câmara trófica. A, corte transversal da região média do trofário sincicial, mostrando núcleos dos trofócitos (→) dispersos no citoplasma repleto de vesículas contendo material elétron-denso (*); B, detalhe de célula de revestimento do trofário, núcleo (n) volumoso e nucléolo (nc), limite intercelular (→); C, presença de junções (→) entre as células de revestimento do trofário; D e F, detalhe de células com citoplasma estreito em algumas regiões do epitélio (★); E-F, tráfego de vesículas provenientes da hemolinfa (*), através das células epiteliais

O filamento terminal representa a porção apical do ovaríolo, sendo formado por células enfileiradas em sua porção anterior, dispostas de forma fracamente empilhada na região basal (= posterior), espalhando-se lateralmente.

A câmara terminal (= câmara trófica) em *D. citri* é revestida por uma camada uniestratificada de células somáticas, as quais, em algumas áreas do trofário, podem ser observadas como traços citoplasmáticos delgados circundados por membrana, mas tornam-se espessos na região do núcleo. Essas células são revestidas externamente por uma túnica própria, a qual recebe traqueíolas. As células epiteliais de revestimento da câmara trófica participam do transporte de vesículas, as quais são descarregadas no sincício do trofário (Figura 5). Ao final da fase imatura, as células germinativas, agora diferenciadas, se distribuem ao longo da câmara terminal, sendo delimitadas por membrana plasmática e apresentam nucléolos desenvolvidos, sendo trofócitos e oócitos praticamente indistinguíveis morfologicamente.

Em adultos recém-emergidos, os trofócitos apresentam-se providos de membrana celular (Figura 6), a qual se torna reduzida e desaparece antes do início da pré-vitelogênese, quando o primeiro oócito começa o ciclo de maturação. Localizados na região posterior da câmara terminal (= trofário), os oócitos mantêm-se delimitados por membrana e permanecem estacionados na região basal da câmara terminal até o início da oogênese (Figura 7).

Os ovaríolos apresentam comportamento metacrônico de maturação, sendo que os ovaríolos localizados marginalmente no ovário, considerando o arranjo típico em forma de “bouquet”, tornar-se-ão vitelogênicos antes daqueles dispostos mais ao centro, os quais ainda estão na fase de pré-vitelogênese (Figura 8).

As células foliculares são células somáticas que formam o epitélio de revestimento do folículo ovariano, e diferem morfológica e funcionalmente em função do tempo e espaço, revestindo o oócito no vitelário no decorrer da oogênese. Originadas de divisões mitóticas de células pré-foliculares, as células foliculares ficam dispostas na base do trofário, próximas aos oócitos estacionados. Possuem formato elíptico ou arredondado, e formam um revestimento celular uniestratificado em torno do oócito durante a oogênese, passando por mudanças estruturais nesse período. Durante a pré-vitelogênese, as células foliculares, inicialmente colunares, adquirem formato cubóide, tornando-se retangular no decorrer da vitelogênese, assumindo formato delgado ao final da coriogênese. Tal mudança na arquitetura das células foliculares reside na ausência de divisões celulares nesse período e da conseqüente distensão para

assegurar o revestimento do oócito, que se expande em consequência do depósito de substâncias de reserva. A partir do início da vitelogênese, ocorre aumento conspícuo no metabolismo das

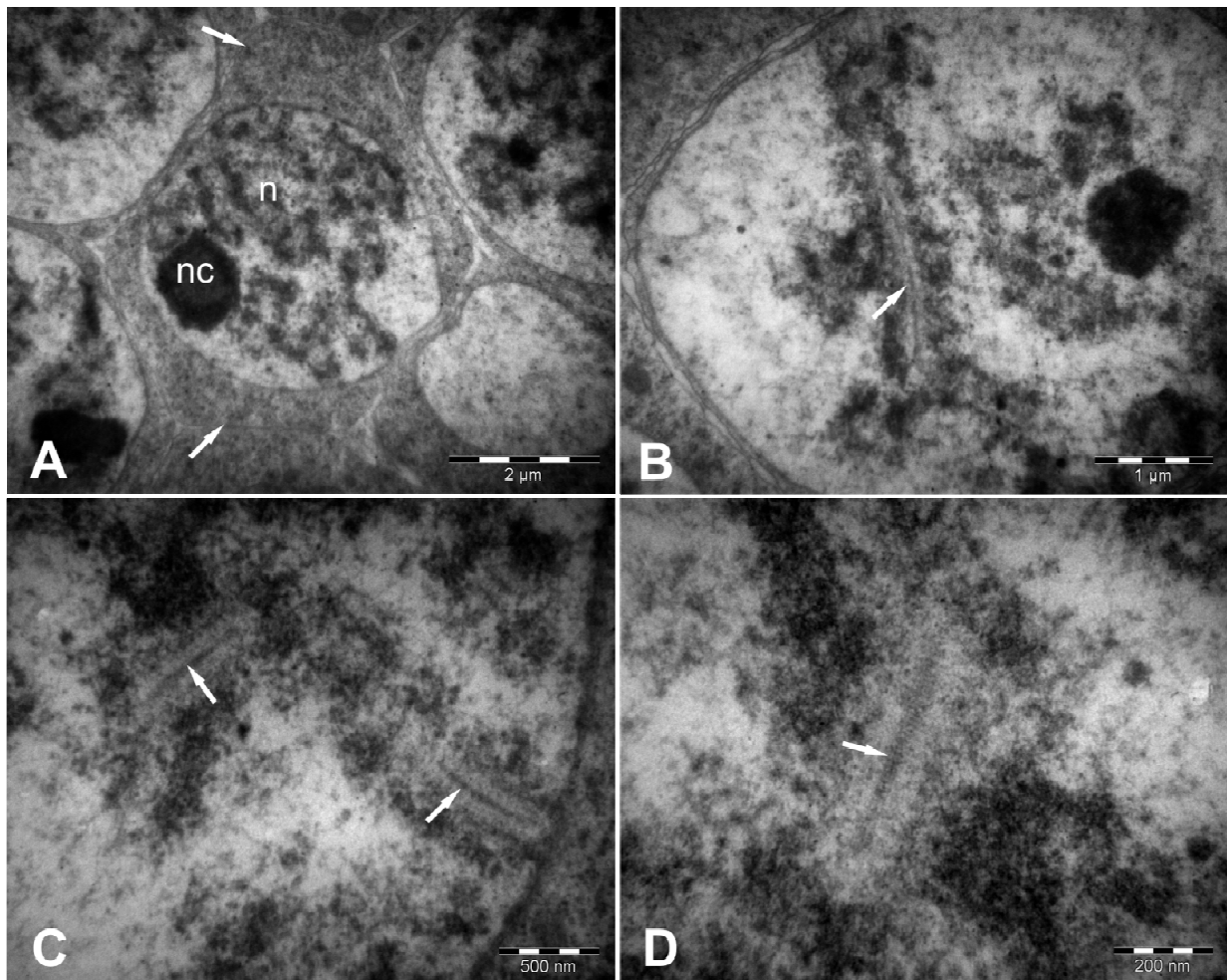


Figura 6 - Eletromicrografias de ovaríolos de *D. citri*. Formação dos trofócitos. A, aspecto de trofócito delimitado por membrana (→) contendo núcleo (n) com cromatina dispersa e nucléolo (nc); B, C-D, complexos sinaptonêmicos decorrentes de presumível diferenciação de cistócitos, dando origem a trofócitos e oócitos (não mostrados)

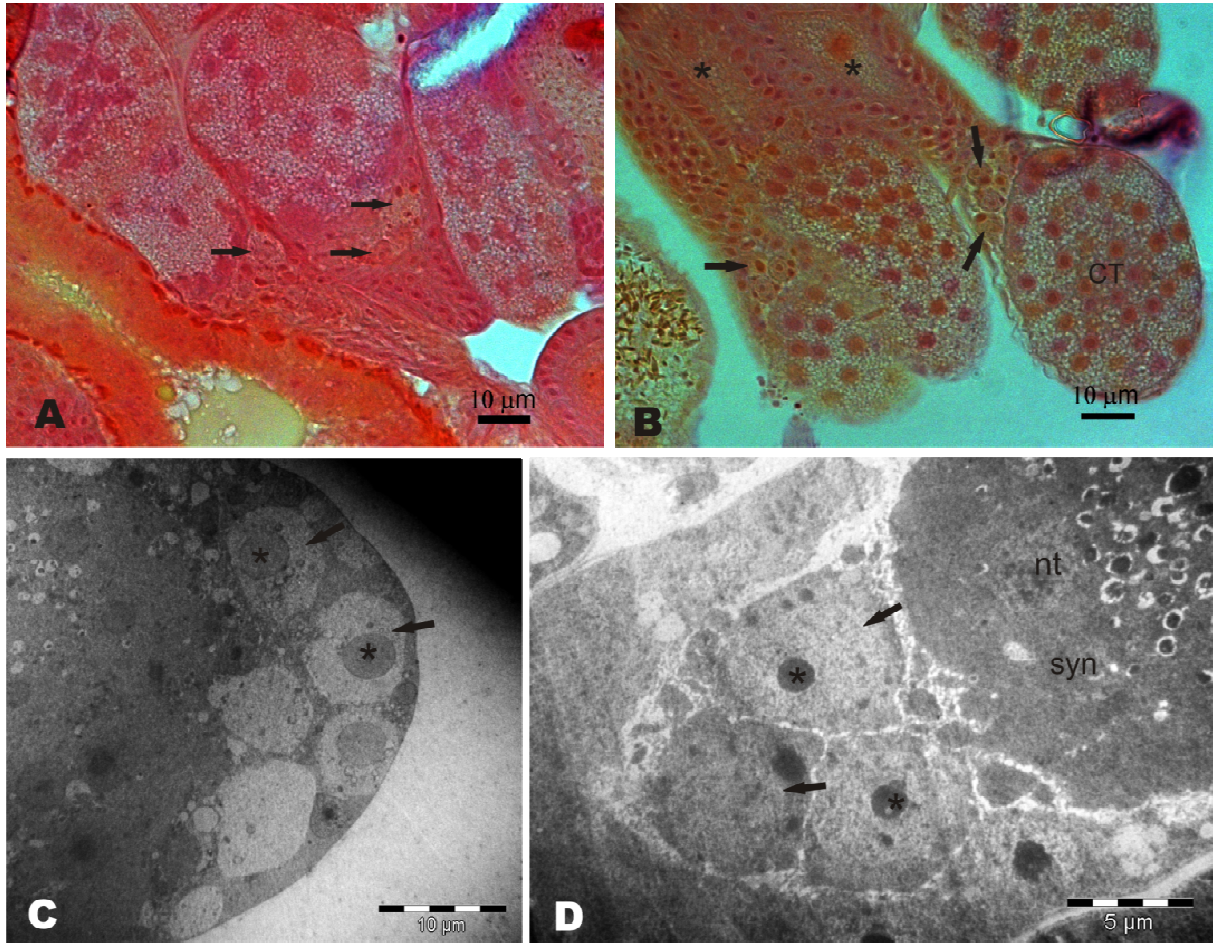


Figura 7 - Eletromicrografias de ovaríolos de *D. citri*. Localização dos oócitos primários na câmara terminal. A-B, corte longitudinal de ovaríolos pré-vitelogênicos, mostrando oócitos primários (→) na base da câmara terminal (CT) e oócitos pré-vitelogênicos (*); C, ovaríolo imaturo (oócitos não iniciaram ciclo oogênico) destacando aspecto dos oócitos (→) com núcleos (*) característicos; D, ovaríolo pré-vitelogênico (oócito em desenvolvimento, não mostrado) contendo oócitos primários estacionados na base do trofário (→) os quais apresentam nucléolo conspícuo (*), porém menor, em comparação ao núcleo dos trofócitos (nt), dispersos no sincício do trofário (syn)

células foliculares do vitelário, caracterizado pelo incremento na quantidade de ribossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e volume do nucléolo em comparação às mesmas células durante a pré-vitelogênese. Apesar do caráter epitelial dessas células, sua disposição justaposta e o reforço por microfilamentos, ocorre o distanciamento intercelular para aquisição de vitelogeninas produzidas durante a vitelogênese, permitindo, assim, a passagem dessas proteínas da hemolinfa para o oócito. Dessa forma, essas lipopoliproteínas e outros nutrientes são transportados tanto por via paracelular quanto transcelular, também observada pela intensa formação de vesículas transportadoras (= pinocíticas). Nesse período, embora em menor intensidade e tamanho, ocorrem vesículas oriundas da assimilação de substâncias da hemolinfa, também nas células de revestimento do trofário (Figura 9).

No período que antecede ao início do primeiro ciclo de oogênese, os trofócitos ainda encontram-se delimitados por membrana, apresentando citoplasma escasso em relação ao tamanho do núcleo, cromatina dispersa e nucléolo pequeno, dispostos marginalmente. O citoplasma celular é rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático e ribossomos livres, com a presença de vesículas dispersas no meio extracelular, as quais, provavelmente, são decorrentes do início da atividade secretora destas células. Nos ovaríolos, cujos oócitos iniciam seu desenvolvimento, os trofócitos apresentam-se desprovidos de membrana plasmática ou com membrana residual.

Essa condição resulta na formação de um trofário sincicial, no qual todos os núcleos compartilham o mesmo citoplasma. O sincício, nesse momento, contitui-se dos mesmos elementos celulares, antes contidos nas células tróficas.

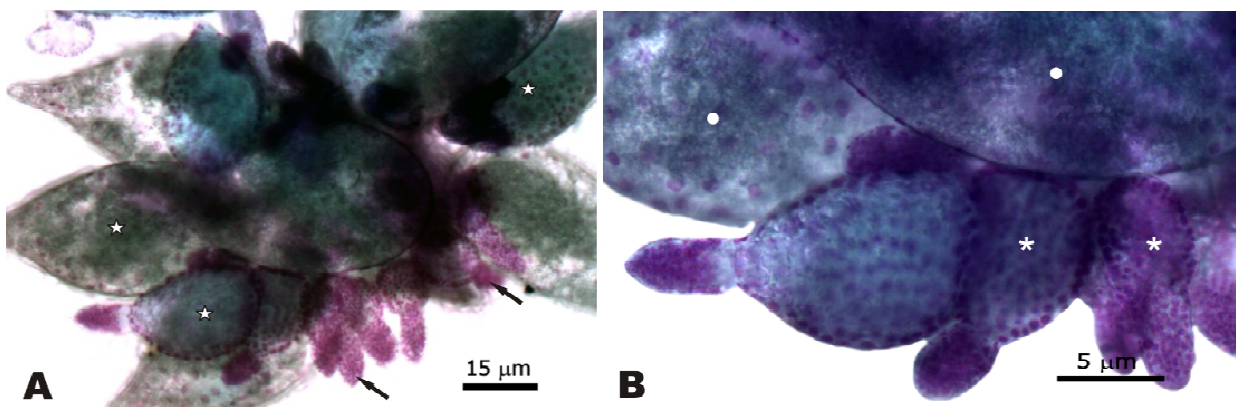


Figura 8 - Fotomicrografias de ovários de *D. citri*. A, maturação metacrônica dos ovaríolos, sendo ovaríolos vitelogênicos (★) localizados na margem do ovário, e ovaríolos pré-vitelogênicos dispostos (→); B, detalhe de ovaríolos pré-vitelogênicos (*) e vista parcial de ovaríolos vitelogênicos (•)

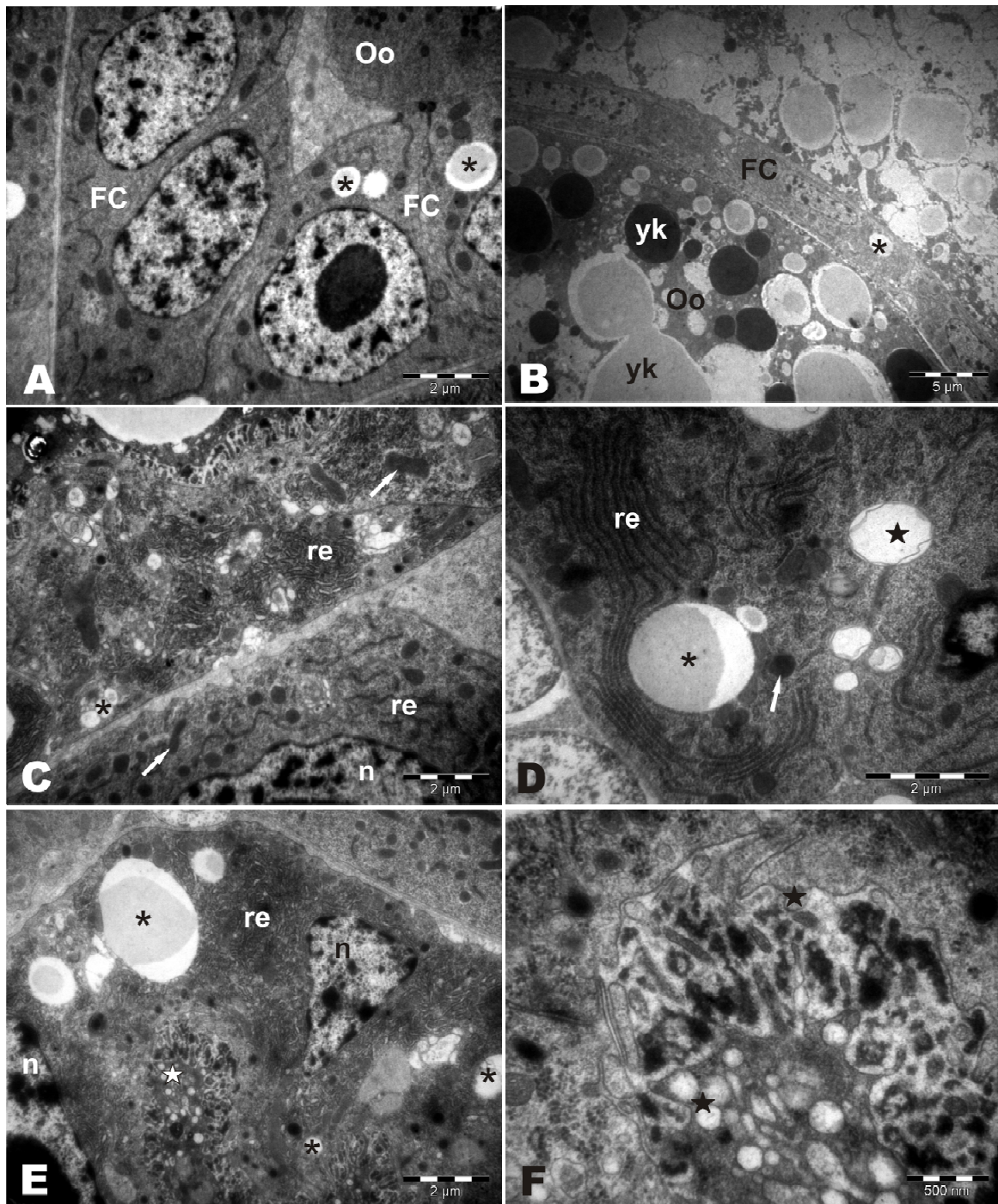


Figura 9 - Eletromicrografias de ovaríolos de *D. citri*. Aspectos ultraestruturais de células foliculares (FC), nos estágios, A, pré-vitelogênico e, B, vitelogênico, da oogênese, apresentando tráfego de vesículas (*) provenientes da hemolinfa, para formar o vitelo (yk) no oócito (Oo). C, vista parcial do citoplasma de células foliculares do estágio prévitelogênico (abaixo) e vitelogênico (acima), evidenciando as diferenças em relação à quantidade de retículo endoplasmático (re) e mitocôndrias (→); D, detalhe de retículo endoplasmático rugoso (re), mitocôndria (→) e transporte de vesículas transcelular (*) e paracelular (★); E-F, E-F, vista parcial de vitelário mostrando células foliculares em atividade intensa, com destaque para retículo endoplasmático (re), núcleo (n), vesículas em trânsito (*) e zona de secreção com intensa formação de vesículas (★).

Contudo, nos momentos seguintes à formação do sincício, observa-se o aumento significativo dos nucléolos, agora localizados na região central do núcleo, e no número de mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Figura 10). Na seqüência, torna-se evidente o número de vesículas na região central da câmara trófica, as quais aumentam em número, tamanho e diversidade de conteúdo, sugerindo síntese intensa de elementos basófilos, tais como proteínas e RNA. As vesículas resultantes de secreção e ou atividade pinocítica através das células de revestimento do trofário, podem sofrer fusão, tornando-se relativamente volumosas. Além disso, estruturas multivesiculares de arranjos variáveis, contendo concreções concêntricas de caráter elétron-denso e material membranoso, foram observadas no sincício (Figura 10).

Os componentes citoplasmáticos produzidos no trofário são transferidos para o oócito pré-vitelogênico através de um prolongamento citoplasmático denominado cordão trófico. Este, mantém-se em comunicação com o trofário e o oócito, que se desloca posteriormente no vitelário, aumentando de volume em consequência da retenção de componentes euplásmicos oriundos do trofário. O cordão trófico possui tamanho reduzido devido à proximidade do oócito ao centro trófico. Além disso, apresenta feixes paralelos de microfilamentos provenientes do sincício, que atingem a região de contato com o citoplasma do oócito (Figura 11).

Posicionados na base da câmara trófica, os oócitos são células grandes, de formato arredondado irregular e núcleo volumoso. Entre as cerca de 10 células existentes em cada ovaríolo, apenas uma entrará no ciclo oogênico, por ciclo, passando pelas etapas de pré-vitelogênese, vitelogênese e coriogênese, antes de completar seu desenvolvimento. Ocasionalmente, enquanto o oócito corionado ainda encontra-se no vitelário, pode ser observado o oócito subsequente em desenvolvimento pré-vitelogênico na região anterior ao oócito maduro, não ocorrendo dois oócitos em estágios de desenvolvimento similares. O oócito que deixa o estado de dormência e passa à etapa pré-vitelogênica, é inicialmente identificado pelo seu afastamento em direção posterior e pela formação incipiente do cordão trófico (Figura 11). No decorrer da pré-vitelogênese, o oócito incorpora componentes citoplasmáticos produzidos no trofário sincicial, tais como organelas, proteínas e RNA, sendo conspícuas as modificações decorrentes nesse processo. Grande quantidade de ribossomos, mitocôndrias e complexo de Golgi são incorporadas ao citoplasma do oócito, resultando no crescimento do mesmo. Concomitantemente, as células foliculares alteram sua arquitetura, passando de colunares a cubóides na metade da etapa pré-

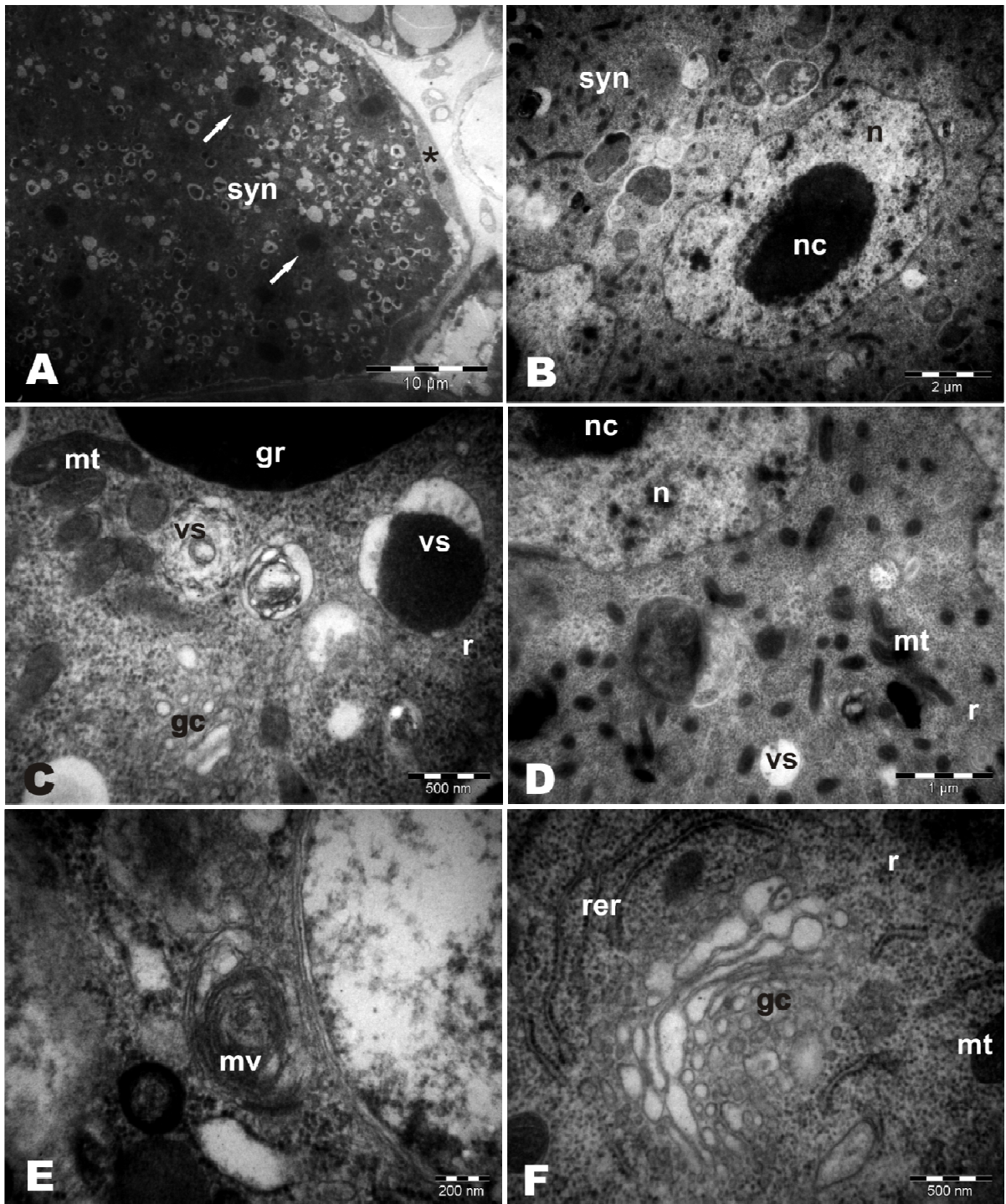


Figura 10 - Eletromicrografias de ovariols de *D. citri*. Ultraestrutura do trofário. A, vista geral do trofário sincicial (syn) contendo núcleos dos trofócitos (→), revestido por células epiteliais (*) (= “inner sheath cells”); B,C e D, vista parcial do sincício (syn), destacando núcleo (n) e nucléolo (nc) volumosos, ribossomos (r), complexo de Golgi (gc), mitocôndrias (mt), vesículas (vs) e grânulos (gr) eletron-densos; E, estruturas multivesiculares (mv) e; F, detalhe de mitocôndrias (mt), ribossomos (r) e complexo de Golgi (gc)

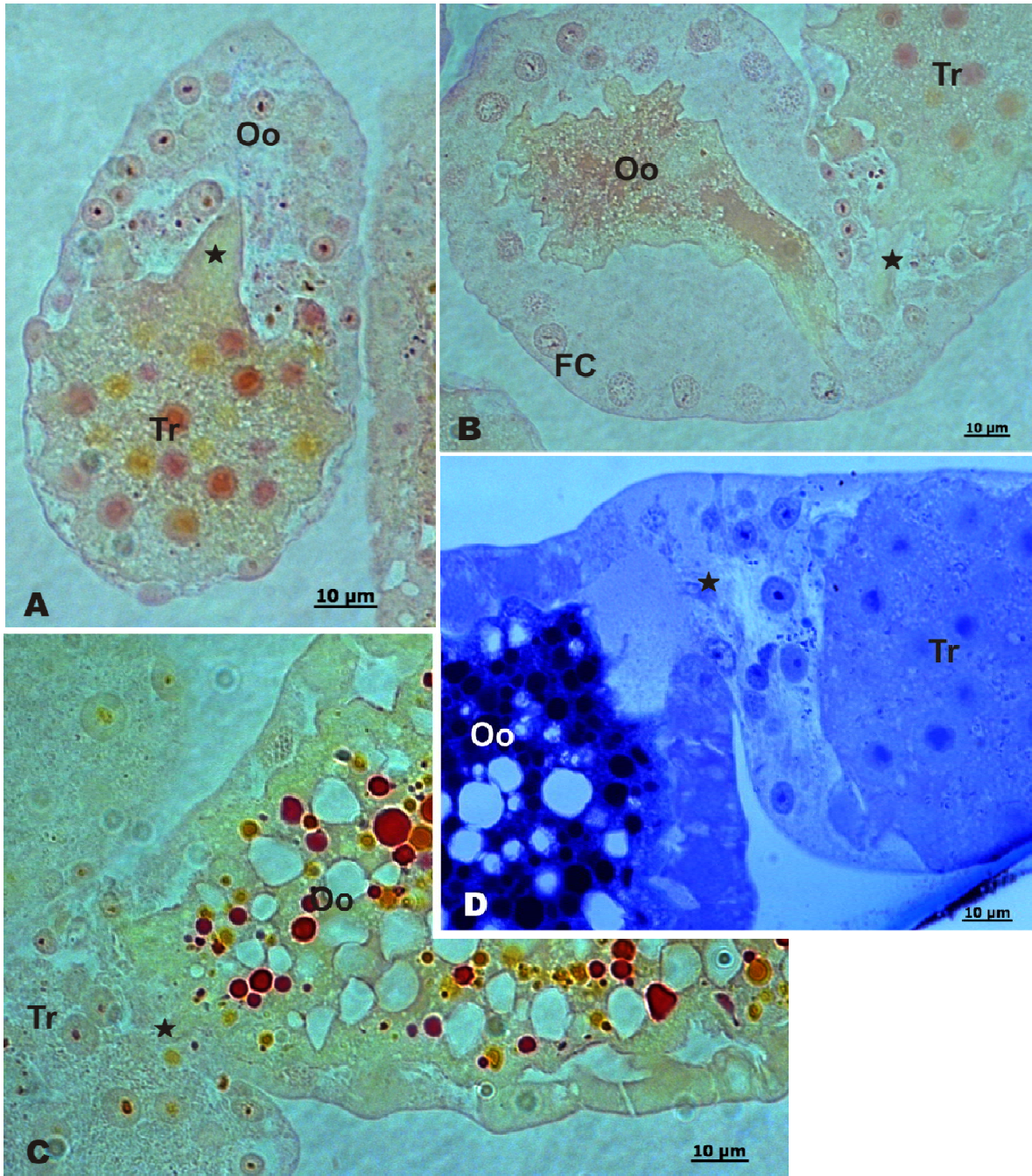


Figura 11 - Fotomicrografias de ovaríolos de *D. citri* em diferentes estágios de maturação. A-B, ovaríolos pré-vitelogênicos e C-D, ovaríolos vitelogênicos, evidenciando o cordão trófico (★) localizado na zona de constrição entre trofário (Tr) e oócito(Oo), o qual apresenta epitélio de revestimento constituído de células foliculares (FC)

vitelogenica. Nesse período, aumenta o número de vesículas carregadas de material protéico e RNA que se distribuem por todo o citoplasma do oócito, principalmente na região central. A vesícula germinal (= núcleo da célula oocítica) encontra-se no pólo anterior da célula na etapa inicial de pré-vitelogênese, migrando em direção ao pólo posterior durante a vitelogênese. Em torno da metade da etapa de pré-vitelogênese, as células foliculares do vitelário possuem núcleo e nucléolo volumosos, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso em grande quantidade, apresentando atividade secretora moderada, caracterizada por inúmeras vesículas no espaço compreendido entre a membrana plasmática e o citoplasma do oócito. O início da vitelogênese é marcado pelo surgimento de esferas protéicas no oócito, consequência do tráfego de vesículas, ainda incipiente, através das células foliculares no vitelário. Esse processo é intensificado nos momentos seguintes, quando a quantidade de vesículas transportando lipídeos e proteínas aumenta consideravelmente, perdurando até o início da coriogênese (Figura 12). Em consequência da participação ativa no transporte, secreção e possível transformação de substâncias, principalmente proteínas e lipídeos provenientes da hemolinfa, as células foliculares demonstram acentuado aumento em seu metabolismo, caracterizado pelo preenchimento do citoplasma por organelas relacionadas a esses mecanismos, tais como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias, além da formação de vilosidades na face interna (= voltada para o oócito) da membrana plasmática, provavelmente visando otimizar o processo de secreção. Acúmulos de grânulos de glicogênio foram detectados na interface de secreção célula folicular – oócito, sugerindo que tais elementos sejam assim acrescidos ao oócito (Figura 9). Ao final da vitelogênese, o oócito atinge seu volume máximo, provocando alterações de formato nas células foliculares durante esse processo, as quais se tornaram alongadas e delgadas. Mesmo durante o período de deposição da membrana vitelínica, foram observadas vesículas em trânsito no citoplasma das células foliculares. Durante a coriogênese são depositadas substâncias de caráter elétron-denso/lucente ou grânulos basófilos, observadas por microscopia eletrônica ou microscopia de luz, respectivamente (Figura 12). Ao final da deposição do córion, as células do pedicelo que estavam arranjadas de forma compacta, bloqueando a comunicação do ovariolo com o bulbo apical do oviduto lateral, deslocam-se lateralmente, formando um canal. Conforme o oócito desloca-se posteriormente no ovariolo e, por consequência, através do pedicelo, este se dilata, permitindo a entrada do oócito no oviduto lateral (Figura 13).

2.4.2.2 Estruturas anexas do aparelho reprodutor de *D. citri*

Os ovidutos laterais possuem uma região dilatada em sua extremidade anterior denominada bulbo apical ou cálice (Figura 14), região na qual estão situados os ovariólos. A partir do bulbo apical, os dutos laterais partem em direção a terminália, unindo-se medianamente para formar o oviduto comum. Os ovidutos laterais e o comum são formados por células epiteliais colunares, cujo núcleo localiza-se na região oposta ao lúmen do duto. Estas células possuem uma espessa camada de microfilamentos que reveste a face celular voltada à hemocele, sendo a superfície interna, no lúmen, coberta por uma íntima delgada (Figura 14). Quando da passagem do oócito, o epitélio do oviduto se distende e suas células mudam temporariamente de formato, tornando-se distendidas. O oviduto comum, a partir de sua porção apical (= anterior), dirige-se à região distal do abdome, abrindo-se no gonópore. Ao longo de sua extensão, recebe um par de glândulas acessórias, uma espermateca e uma glândula coletérica, relacionadas ao processo de transporte, fertilização e oviposição (Figura 15).

Um par de glândulas acessórias liga-se ao terço anterior do oviduto comum em lados opostos. Essas glândulas possuem aspecto alongado, sendo formadas por células secretoras volumosas, cujos núcleos dispõem de forma intercalada ao longo da extensão distal-proximal. O núcleo coloca-se na base da célula e possui nucléolo conspícuo. O citoplasma é repleto de mitocôndrias, principalmente na região distal da célula, a qual possui longas microvilosidades. Além disso, o retículo endoplasmático rugoso estende-se por todo o citoplasma, partindo da

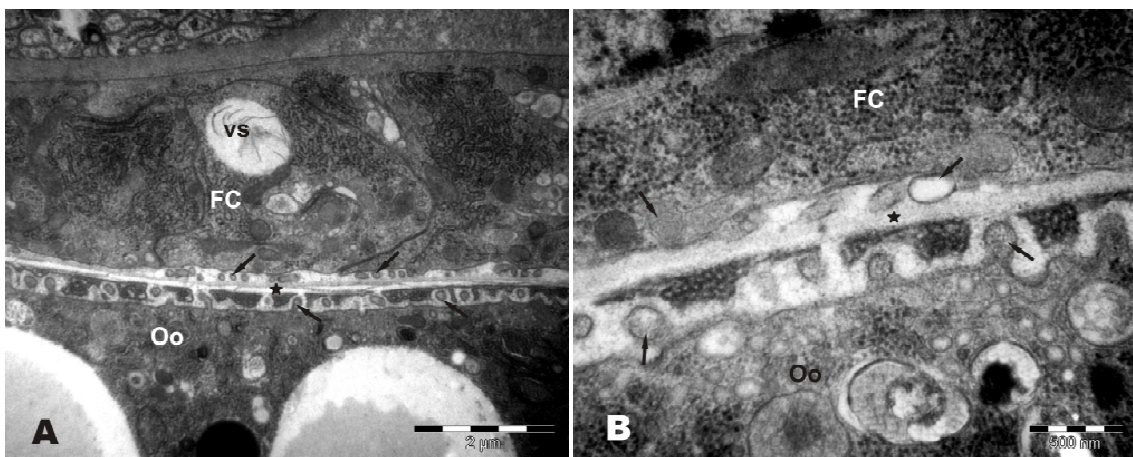


Figura 12 - Eletromicrografias de ovariólos de *D. citri*. A-B, interface entre oócito (Oo) e células foliculares (FC), observar a interface de deposição do córion (★) e vesículas provenientes das células foliculares e do oócito (→), destaque ainda, para tráfego de vesículas (vs) nas células foliculares mesmo durante essa etapa da oogênese

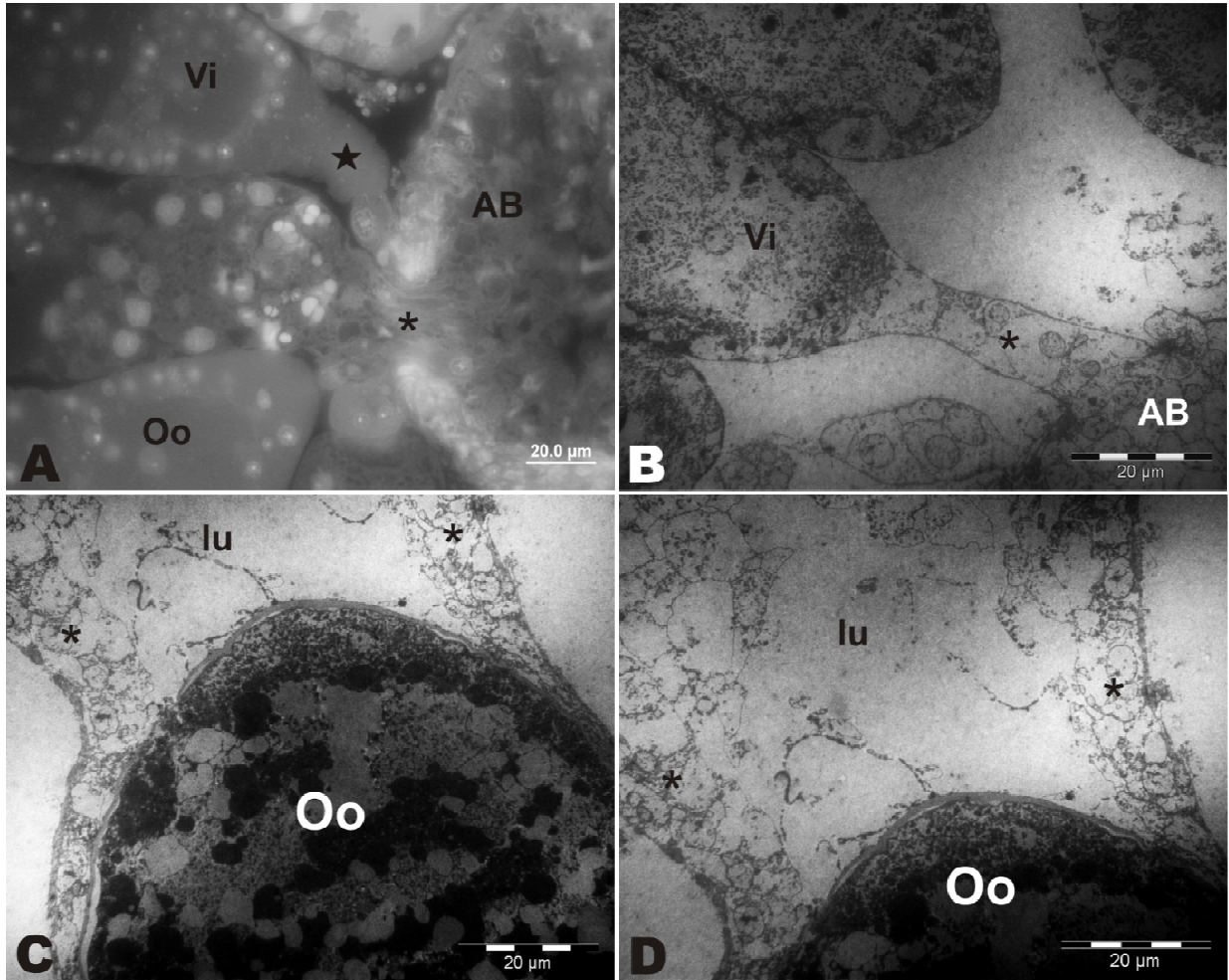


Figura 13 - Micrografias de ovaríolos de *D. citri*, mostrando aspectos estruturais do pedicelo. A, fotomicrografia ilustrando a comunicação (*) entre a região proximal do pedicelo (★) de ovaríolos pré-vitelogênicos (Vi) e o bulbo apical (AB) do oviduto lateral. B, Eletromicrografia de pedicelo (*) enfatizando a arranjo celular observado em ovaríolos (Vi) antes do completo desenvolvimento do oócito (Oo), quando C-D, este desloca-se posteriormente através do lúmen (lu), devido ao afastamento das células que o constituem (*)

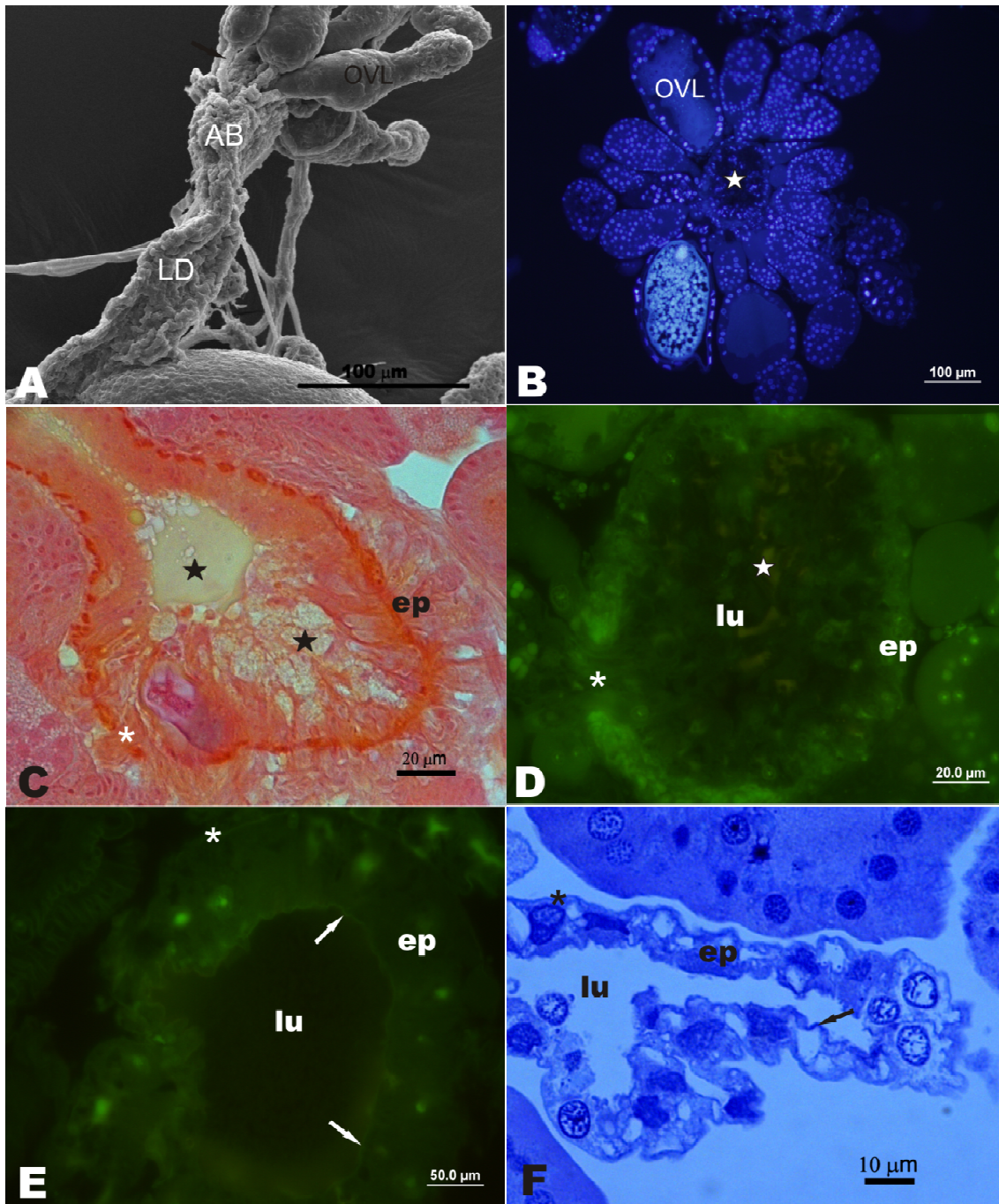


Figura 14 - Micrografias de ovaríolos de *D. citri*, e aspectos estruturais de ovidutos. A, eletromicrografia de oviduto lateral (LD), destacando a região do bulbo apical (AB) no qual estão inseridos os ovaríolos (OVL) através de sua porção basal, o pedicelo (→). B, fotomicrografia de corte de ovário em sua região basal, mostrando os ovaríolos (OVL) com desenvolvimento metacrônico (detalhes no texto) ao redor do bulbo apical (AB) localizado centralmente. C-D, fotomicrografia do bulbo apical mostrando a presença de secreção (★) no lúmen (lu) e a abertura no epitélio (ep) como ponto de comunicação com o pedicelo do ovaríolo; E-F, corte transversal do oviduto comum, mostrando epitélio de formato cubóide (ep) revestido externamente por lâmina basal (*), com o lúmen (lu) revestido por delgada íntima cuticular (→).

região basal da célula, formando alças e canais intra-celulares, os quais, freqüentemente, atingem a região dos microvilos. Músculos e nervos acessam a glândula, tendo sido observados feixes de axônios e miofibrilas nas regiões inter- e intracelulares. A glândula acessória é revestida externamente por uma túnica espessa, composta de material fibrilar (Figura 16). Na região proximal da glândula, porém antes do local de contato com o oviduto comum, ocorre uma área dilatada, de coloração amarelo-alaranjado. Essa dilatação possui aspecto sacciforme e envolve toda a circunferência da glândula (Figura 16).

A espermateca caracteriza-se como uma estrutura sacciforme, de aspecto arredondado ou riniforme, formada por epitélio secretor uniestratificado (Figura 17). As células secretoras são revestidas externamente por uma lâmina basal, através da qual passam feixes de fibras musculares e axônios. Possuem núcleo com nucléolo desenvolvido e o citoplasma com elevada densidade de mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. O retículo endoplasmático é mais freqüente na região basal das células, próximo à túnica de revestimento (= lâmina basal). A partir dessa região e em direção ao lúmen, ocorrem vesículas de tamanhos variados, mas normalmente volumosas e de conteúdo elétron-lucente. A face celular voltada ao lúmen da glândula possui microvilosidades arranjadas de forma compacta e com dobramentos. Muitas mitocôndrias estão distribuídas ao longo das microvilosidades, onde as vesículas, agora de tamanho reduzido, se fundem (Figura 18). O conteúdo secretado no lúmen possui características protéicas em função de aspectos histoquímicos observados preliminarmente. A espermateca (= *receptaculum seminis*) está localizada próxima aos ovários, normalmente do lado esquerdo do abdome, convergindo através de seu duto e confluindo na porção mediana do

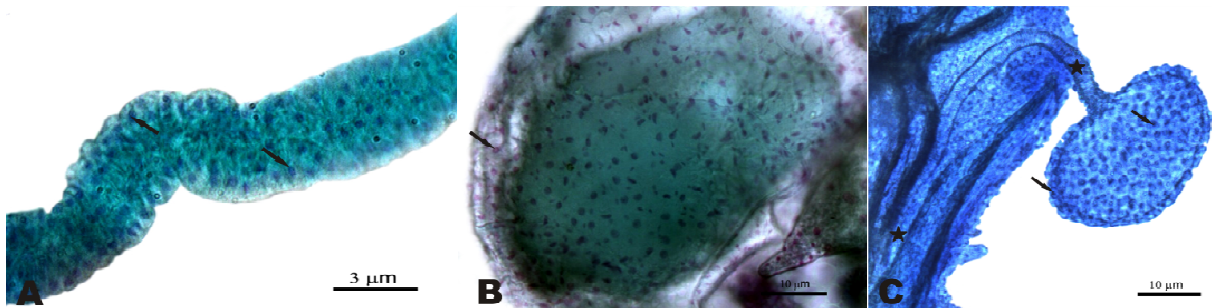


Figura 15 - Fotomicrografias de estruturas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri*. A, glândula acessória de aspecto tubular, formada por epitélio secretor uniestratificado (→); B, espermateca de formato sacciforme constituída de epitélio secretor (→) ; C, glândula coletérica de formato sacciforme, formada por epitélio secretor simples (→), possui longo duto formado por epitélio simples e anéis esclerotizados (★), cujo formato assemelha-se à traquéias

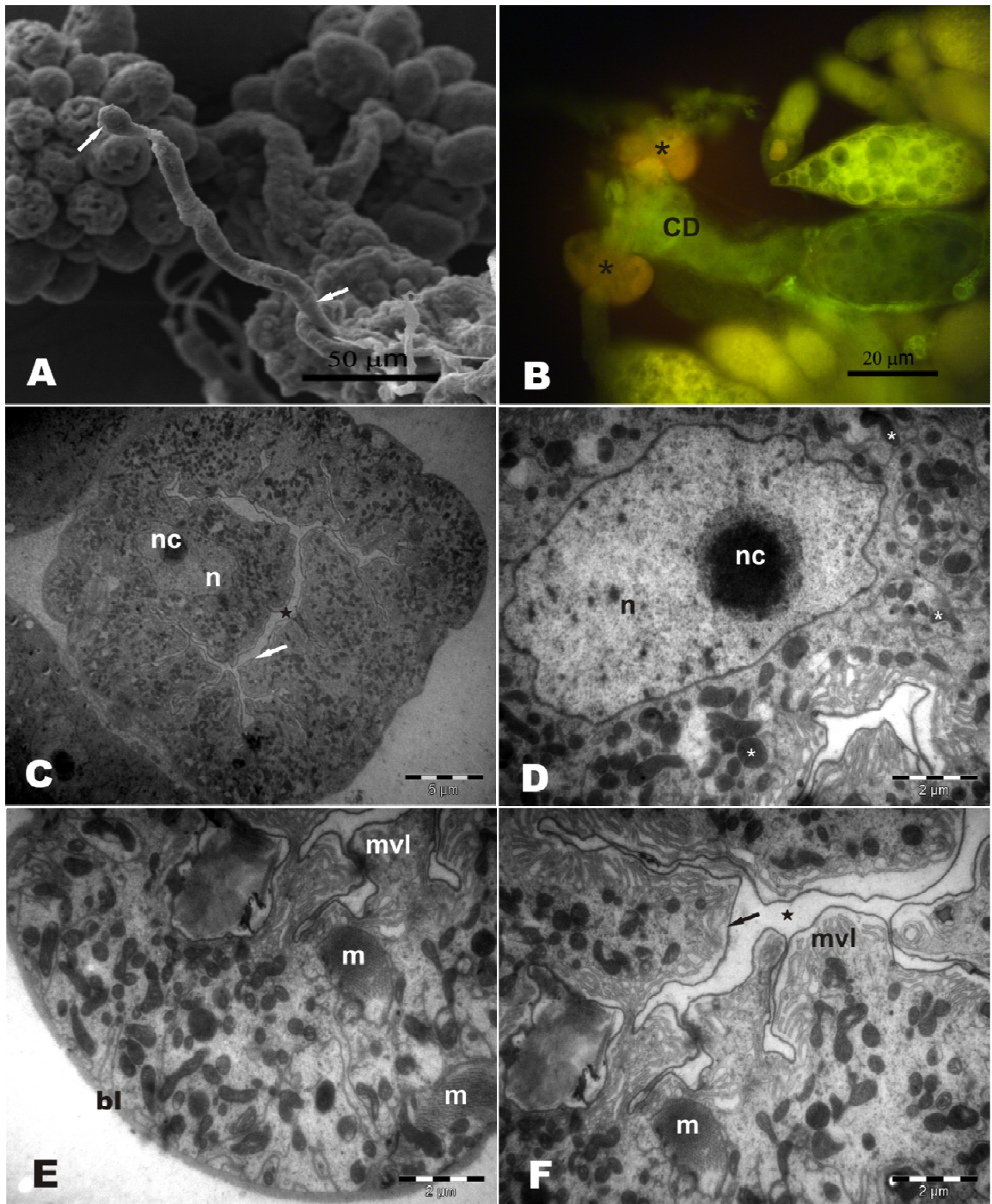


Figura 16 - Micrografias de estruturas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri*. A, morfologia externa de glândula acessória ilustrando o aspecto tubular (→); B, região proximal da glândula acessória mostrando uma região sacciforme de coloração amarelo-escuro (*), antes do ponto de confluência com o oviduto comum (CD); C, corte transversal de glândula acessória, mostrnado núcleo (n) com nucléolo (nc) conspícuo, lúmen (★) revestido por íntima cuticular (→), e, D, detalhe do núcleo (n), nucléolo (nc) e mitocôndrias circundantes; E-F, ultraestrutura de célula secretora mostrando a lâmina basal (bl) na face externa da célula, microvilosidades na região apical (mvl), próximas ao lúmen (lu), e feixes de miofibrilas (m). A, C-F, microscopia eletrônica de transmissão; B, microscopia de fluorescência convencional

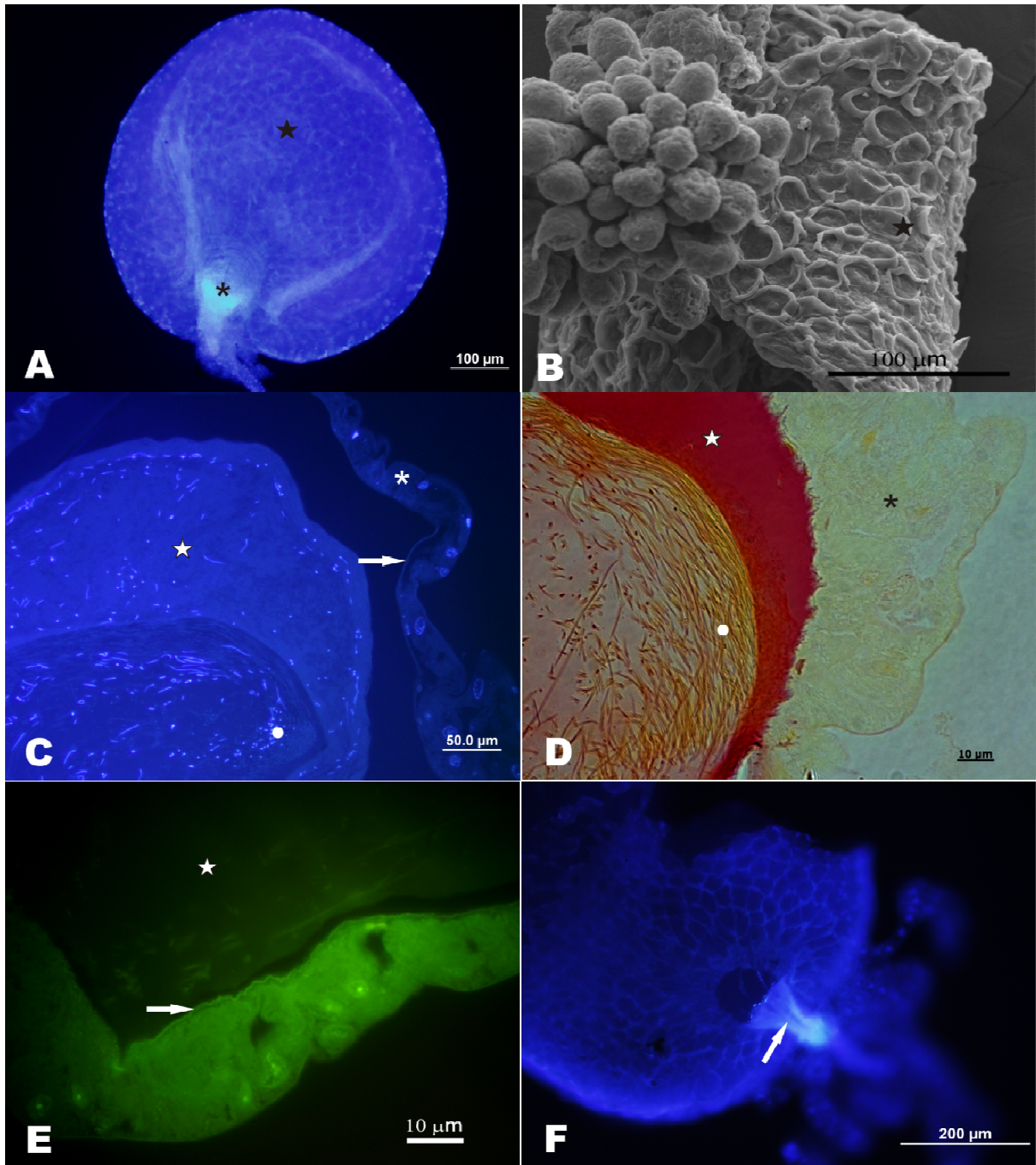


Figura 17 - Micrografias de estruturas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri*. A-B, morfologia externa da espermateca (★) e região proximal do ducto (*); C, D-E, corte transversal da espermateca, mostrando epitélio secretor (*), secreção acumulada (★) na periferia do lúmen contendo espermatozóides (•); F, detalhe da região proximal do ducto da espermateca (rompida) (→)

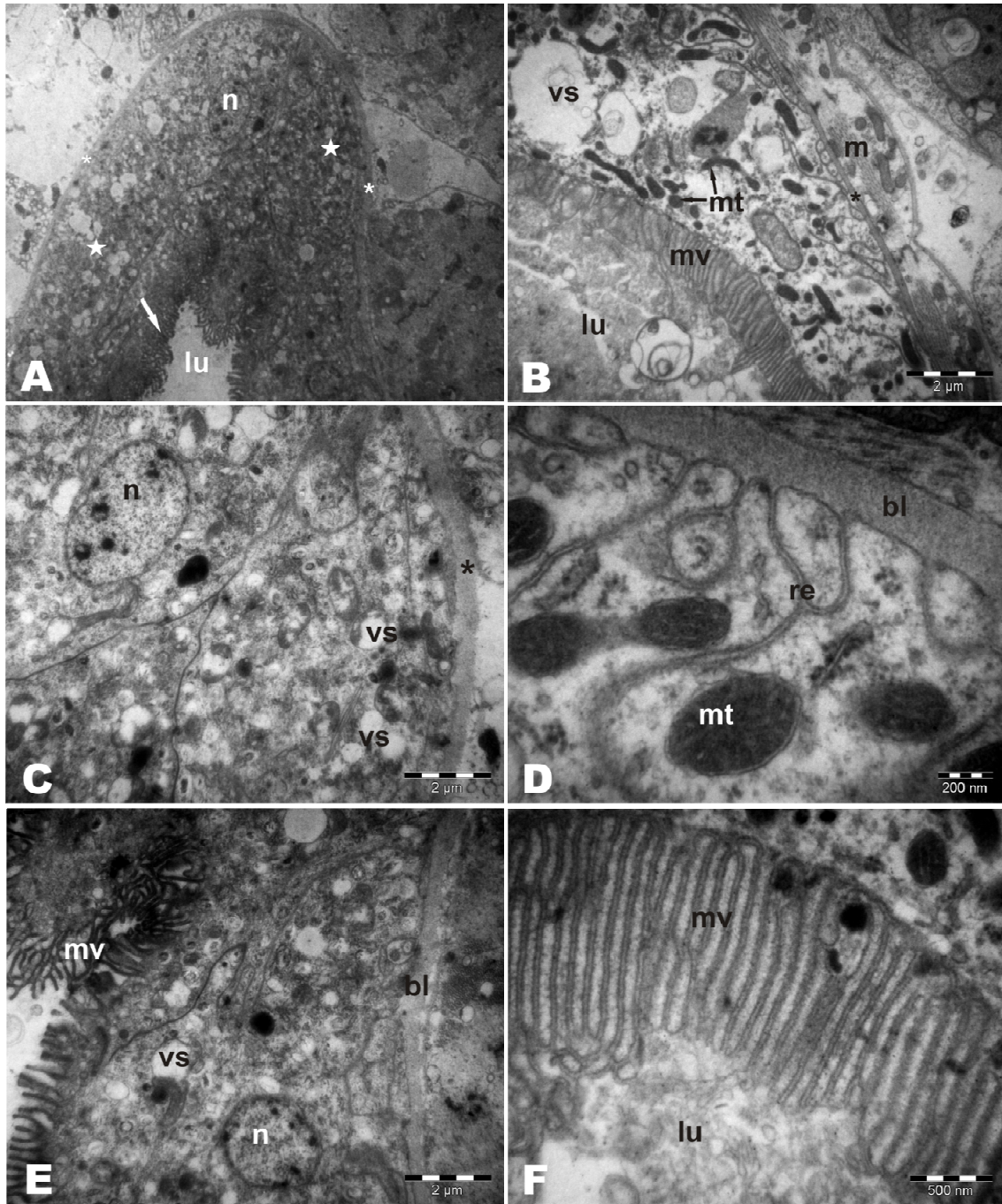


Figura 18 - Eletromicrografias de estruturas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri*. Ultraestrutura da espermateca. A, vista parcial da espermateca, em corte transversal, mostrando a lâmina basal (*) que reveste as células secretoras (★) com núcleo basal e microvilosidades na região apical, em contato com o lúmen (lu); B, detalhe de citoplasma da célula secretora, contendo feixes de miofibrilas (m) anexas à lâmina basal (*) externamente, e presença de mitocôndrias densas (mt), vesículas (vs) e microvilosidades (mv) no limite com o lúmen (lu); C-F, vista parcial da célula, mostrando núcleo (n), lâmina basal (*, bl), retículo endoplasmático (re), vesículas de secreção (vs), mitocôndrias densas (mt), microvilosidades e aspecto do lúmen (lu)

oviduto comum. O duto da espermateca constitui-se de epitélio simples e lúmen revestido por íntima delgada, possuindo um alargamento na área de abertura na espermateca (= parte proximal), região densamente revestida por material fibroso. A glândula coletérica, semelhante à espermateca quanto à forma, situa-se lateralmente na porção média do oviduto comum, na base da terminália. O lúmen da glândula comunica-se com a vagina através de um longo duto, constituído por anéis cuticulares inseridos em um epitélio simples (Figura 19). As células do epitélio uniestratificado que a constitui possuem núcleo situado na região próxima à lâmina basal que as revestem. São densamente povoadas por retículo endoplasmático rugoso, ribossomos, mitocôndrias e complexo de Golgi, principalmente na região médio-apical, onde é verificada uma vesícula que acumula temporariamente produtos de secreção. O duto da espermateca constitui-se de epitélio simples e lúmen revestido por íntima delgada, possuindo um alargamento na área de abertura na espermateca (= parte proximal), região densamente revestida por material fibroso. A glândula coletérica, semelhante à espermateca quanto à forma, situa-se lateralmente na porção média do oviduto comum, na base da terminália. O lúmen da glândula comunica-se com a vagina através de um longo duto, constituído por anéis cuticulares inseridos em um epitélio simples (Figura 19). As células do epitélio uniestratificado que a constitui possuem núcleo situado na região próxima à lâmina basal que as revestem. São densamente povoadas por retículo endoplasmático rugoso, ribossomos, mitocôndrias e complexo de Golgi, principalmente na região médio-apical, onde é verificada uma vesícula que acumula temporariamente produtos de secreção (Figura 20).

2.4.3 Desenvolvimento ovariano e análise da influência da cópula na maturação dos ovários de *D. citri*

Foram observadas diferenças relevantes quanto à maturação dos ovários de fêmeas virgens e copuladas. Fêmeas virgens mantiveram o aspecto imaturo dos ovários, enquanto fêmeas acasaladas, caracterizadas pelo aumento no volume e turgidez da espermateca devido à transferência de esperma, apresentaram o rápido desenvolvimento e maturação de seus ovários. Em algumas das fêmeas copuladas foi possível observar a partir do segundo dia após a cópula, ovários de aspecto pós-vitelogênico e espermatecas vazias, porém dilatadas. Entretanto, essa

condição tornou-se mais freqüente após o quarto dia pós- cópula, estendendo-se até o oitavo dia (= último dia analisado). Salvo as características fisiológicas intrínsecas de cada indivíduo,

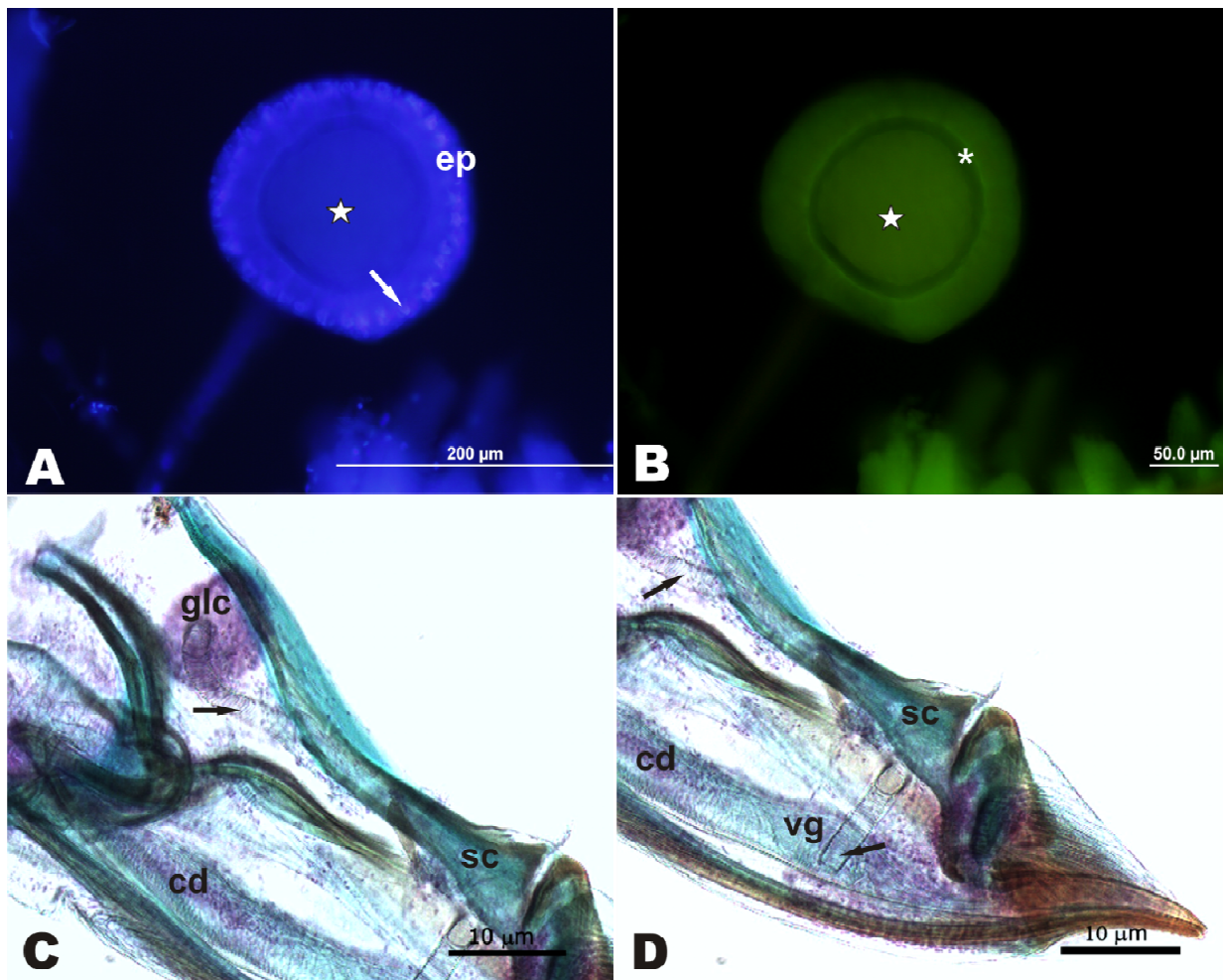


Figura 19 - Fotomicrografias de estruturas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri*. Glândula coelenterica. A-B, evidenciando o epitélio secretor uniestratificado (→, ep) circundando o lúmen (★) revestido por íntima cuticular (lu); C-D, glândula coelenterica (glc) inserida entre os escleritos da terminália (sc), e o trajeto do duto anelar (→), o qual une-se à vagina (vg), uma porção distendida no ápice do oviduto comum (cd)

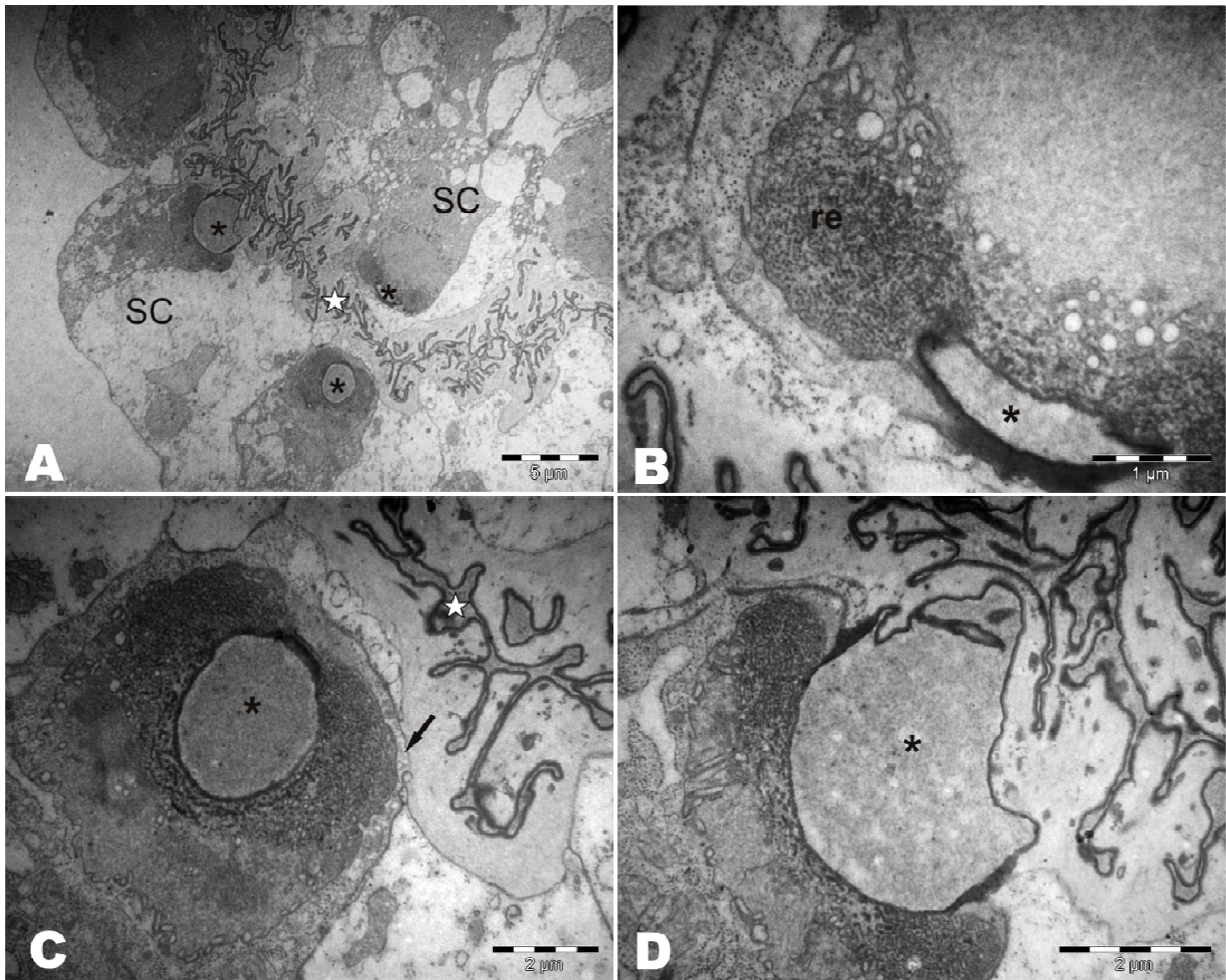


Figura 20 - Eletromicrografias de estruturas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri*. Glândula coelétrica. A, corte tangencial do epitélio secretor (sc), ao redor de canal (★) no qual são é lançado o conteúdo das vesículas de secreção (*); B, C, detalhe de célula secretora, ilustrando a presença abundante de retículo endoplasmático rugoso (re) e diferentes etapas de preenchimento de vesícula de secreção (*); D, vesícula de secreção (*) descarregando seu conteúdo no canal coletor

relacionadas ao desenvolvimento dos ovários, em geral, apenas as fêmeas copuladas apresentaram maturação dos ovariolos (Tabela 1). O aspecto dos ovários após a oviposição, observados no período analisado (2, 4, 6 e 8 dias pós-cópula) assemelha-se, em termos gerais, àqueles sabidamente pré-vitelogênicos, mas que podem ser diferenciados destes últimos por apresentarem câmara trófica maior que a observada em ovariolos virgens. Além disso, apresentam região basal conspícua, correspondente ao vitelário e pedicelo, onde houvera o último oócito em crescimento. As características observadas são indicativas de que todo o conteúdo da espermateca fora utilizado na inseminação dos ovos produzidos, sugerindo a ocorrência de poliandria nesse inseto, sendo assim, necessárias novas cópulas para que a fêmea possa iniciar novos ciclos de maturação de oócitos.

Figura 1 - Maturação do ovário de *Diaphorina citri* em condições controladas ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR, fotofase 14 h) ao longo do seu desenvolvimento reprodutivo e o efeito da cópula na maturação dos ovários, baseando-se em aspectos

Influência da cópula na maturação do ovário de *Diaphorina citri*

Fase de desenvolvimento	Período de avaliação (dias) após emergência / cópula											
	1º dia pós-emergência		10º / 0		12º / 2º		14º / 4º		16º / 6º		18º / 8º	
	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário
Emergência	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1ª fase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2ª fase	-	-	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2

Observações para: *Espermateca*: (0) vazia-virgem, (1) cheia, (2) vazia-pós-oviposição; *Ovários*: (0) imaturo ou pré-vitelogênico, (1) vitelogênico e/ou vitelo-ovulatório, (2) pós-oviposição (ovários vazios).

2.5 Discussão

2.5.1 Morfologia geral do aparelho reprodutor de *D. citri*

D. citri, a exemplo dos demais representantes da ordem Hemiptera, possui ovário do tipo meroístico telotrófico, que se assemelha ao de outros psilídeos, como *Camarotoscena speciosa* (Psyllidae) (WITLACZIL, 1885; FEWS, 2004) e *Psylla alni* (Psyllidae) (BUNING, 1994), apresentando características que se assemelham aos demais membros da subordem Sternorrhyncha (OSETO; HELMS, 1971; COUCHMAN; KING, 1979; SZKLARZEWICZ, 1997; SZKLARZEWICZ et al., 2008). O arranjo *in toto* dos ovários maduros de adultos de *D. citri* assemelha-se ao descrito para alguns Aphidimorpha e Aleyrodidomorpha (BUNING, 1985; SZKLARZEWICZ, 1997; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001), com ovariólos livres de filamento terminal suspensor. Os ovários diminutos observados em fêmeas virgens aumentam expressivamente de tamanho, preenchendo e expandindo o abdome em fêmeas grávidas, a exemplo de outras espécies sinovigênicas (BARKER, 1989; JANHKE; REDAELLI; DIEFENBACH, 2006). A presença de estruturas anexas ao aparelho reprodutor feminino, apesar de relativamente comum, é variável quanto ao tipo e localização (LIMA, 1940; GILLOT, 2005). Em *D. citri*, um par de glândulas acessórias e uma espermateca estão distribuídas ao longo do oviduto comum, sendo que a vagina ainda recebe uma glândula coletérica. Já nas espécies *Dalbulus maidis* e *Graminella nigrifons* (Hemiptera: Cicadellidae), estas estruturas são descritas em regiões diferentes do oviduto e vagina (TSAI; PERRIER, 1996), sendo observada apenas a espermateca em *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae), a qual apresenta um divertículo glandular anexo (BARKER, 1989).

2.5.2 Análise estrutural do aparelho reprodutor de *D. citri*

2.5.2.1 Estrutura dos ovários

O número de ovariólos parece ser muito diverso em Sternorrhyncha, variando de 5 a 11 em afídeos (COUCHMAN; KING, 1979; LEATHER; WELLINGS, 1981) e de 5 a 15 em aleirodídeos (BUNING, 1994; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001), chegando a cerca de 50 ovariólos em *D. citri*. O desenvolvimento dos ovariólos é metacrônico, mantendo-se um

gradiente de maturação da margem para o centro do ovário, de modo que os ovariólos dispostos na margem do ovário, se desenvolvem antes dos demais. Características similares de desenvolvimento polarizado e assíncrono de ovariólos foram descritos para outros insetos, como afídeos e aleirodídeos (COUCHMAN; KING, 1979; LEATHER; WELLINGS, 1981; BUNING, 1985; BROUGH; DIXON, 1989; GHANIM et al., 2001), *Sialis flavilatera* (Megaloptera: Sialidae) (BÜNING, 1979) e alguns representantes de Diptera e Psocoptera (BÜNING, 1994).

Estruturalmente, os ovariólos de *D. citri* são muito semelhantes àqueles de afídeos e aleirodídeos (BÜNING, 1985; GHANIM et al., 2001), apresentando filamento apical rudimentar, o qual não possui função de suporte, função assegurada por outros tecidos, como tecido adiposo e traquéias. O arranjo das células germinativas (cistócitos) em roseta durante a formação da câmara terminal mostra ser uma característica relativamente comum em psilídeos, afídeos e aleirodídeos (WITLACZIL, 1885; KING; BUNING, 1985; BROUGH; DIXON, 1989; BUNING, 1994; GHANIM et al., 2001), além de alguns coccídeos (SZLARZEWICZ, 1997).

A organização das células germinativas (cistócitos) em roseta se deve à formação de pontes citoplasmáticas entre células-irmãs (= divisão incompleta de cistoblastos) decorrentes de citocinese incompleta, fato comumente verificado em ovariólos telotróficos (COUCHMAN; KING, 1979; STYS; BILINSKI, 1990; BUNING, 1994; SZKLARZEWICZ et al., 2007). O cordão trófico observado na região de constrição entre a câmara trófica e o oócito pré-vitelogênico surge em resposta ao início da vitelogênese. Segundo Beyrich e Gottanka (1992) apud Buning (1994), os cordões tróficos em psilídeos não são preenchidos por microtúbulos, o que implica na inexistência de um sistema de transporte de substâncias para o oócito, baseado nessas estruturas. Nesse contexto, o cordão trófico em *D. citri* possui organização incomum, pois assemelha-se ao descrito em *Brevicoryne brassicae* (COUCHMAN; KING, 1979) devido à presença de feixes de microfilamentos no interior das pontes citoplasmáticas, em comunicação com o arcabouço sincicial no trofário. Entretanto, assim como em outras espécies, não é descartada a existência de outros mecanismos de transporte, como, por exemplo, aqueles baseados em gradientes iônicos e de pressão osmótica (HUEBNER; DIEHL-JONES, 1993; COLE; WOODRUFF, 1997, 2000; TELFER; WOODRUFF, 2002). O cordão trófico de *D. citri* assemelha-se em forma e tamanho aos de aleirodídeos (0,5 µm) (BUNING, 1994) e afídeos (1,0 µm) (COUCHMAN; KING, 1979).

A possível participação do filamento terminal na formação da *tunica propria* é discutida (KING, 1970; GREGÓRIO et al., 1990), sendo que Buning (1985) relata a ocorrência de um septo entre as células basais do filamento terminal e o revestimento da câmara trófica. Porém, tal estrutura não foi observada em ovariolos de *D. citri*, corroborando o observado em outras espécies (JEDRZEJOWSKA; KUBRAKIEWICZ, 2004; SZKLARZEWICZ et al., 2007, 2008).

As características ultraestruturais do epitélio uniestratificado que reveste a câmara terminal (= câmara trófica) de *D. citri* são similares às aquelas observadas em *Megoura viciae* (Hemiptera: Aphididae) (BROUGH; DIXON, 1989) e *Adelges laricis* (Hemiptera: Adelgidae) (SZKLARZEWICZ; WNEK; BILINSKI, 2000). Essas células são revestidas externamente por uma *tunica própria* delgada, na qual estão inseridas traqueíolas, importantes ao fornecimento de oxigênio e suporte (WINNICK; HOLWELL; HERBERSTEIN, 2009). Contudo, o aspecto sincicial do trofário de *D. citri* difere do observado em afídeos e heterópteros (BUNING, 1985; BROUGH; DIXON, 1989; KUGLER et al., 2006), já que nos ovariolos de *D. citri* não ocorre uma região diferenciada estruturalmente do restante do trofário. O aspecto celular dos trofócitos apresenta-se variável entre os hemípteros, havendo descrições de trofócitos similares em tamanho e teor citoplasmático em afídeos (COUCHMAN; KING, 1979; BUNING, 1985; BROUGH; DIXON, 1989), trofócitos elípticos e arredondados em *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) (CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2006), organizados ao redor de um centro trófico sincicial anuclear em heterópteros (LALITHA; SHYAMASUNDARI; RAO, 1997; KUGLER et al., 2006) ou ainda, em Dermaptera, a presença de apenas uma célula trófica por folículo ovariano (TWORZYDLO; BILINSKI, 2008). Segundo Buning (1985), a similaridade do tamanho nuclear sugere poliploidismo semelhante entre as células do trofário. Em *D. citri*, os núcleos do trofário sincicial apresentam tamanhos similares e nucléolos volumosos, cuja atividade é evidenciada pela presença de aglomerados elétron-densos na vizinhança dos poros nucleares e na interface com o citoplasma do sincício. Esse material, descrito por alguns autores como “nuage”, assemelha-se em eletrondensidade àqueles encontrados nos nucléolos, tendo sido relatado em outros hemípteros como indicativo da transferência núcleo-citoplasmática de substâncias (DAVENPORT, 1976; COUCHMAN; KING, 1979; LUTZ; HUEBNER, 1980; HUEBNER; DIEHL-JONES, 1993). A atividade de síntese desenvolvida no trofário se caracteriza pela presença de diversas estruturas a ela relacionada, bem como acúmulo de vesículas de conteúdo supostamente protéico, comumente associadas a complexos de Golgi e

mitocôndrias, sinalizando seu provável sítio de origem. Esse cenário é similar ao descrito por Couchman e King (1979) para *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae), ressaltando a importância do trofário na captação seletiva de substâncias presentes na hemolinfa e síntese de morfógenos. Além disso, em *D. citri*, devido a presença de estruturas multivesiculares semelhantes à citolisomas dispersas pelo sincício, sugere-se, preliminarmente, que o trofário atue na transformação de substâncias e na reabsorção de organelas, fato verificado principalmente a partir da pré-vitelogênese, quando há aumento na concentração de vacúolos e de pequenas vesículas no sincício. Contudo, não foram encontradas menções na literatura sobre essa possível função, sendo necessários mais estudos a fim de elucidá-la.

Em *D. citri*, a localização basal dos oócitos primários na câmara trófica segue o padrão comum descrito para ovários telotróficos (BONHAG, 1958; STYS; BILINSKI, 1990; BUNING, 1994; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2006; SZKLARZEWICZ et al., 2007, 2008), sendo que apenas um oócito se desenvolvendo por ciclo, estratégia reprodutiva presente em *Megoura viciae* (Hemiptera: Aphididae) (BROUGH; DIXON, 1989) e *Adelges laricis* (Hemiptera: Adelgidae) (SZKLARZEWICZ; WNEK; BILINSKI, 2000), possivelmente devido a limitações de espaço ou nutricionais, visto que outros insetos detêm a capacidade de produzir vários ovos por ciclo (BUNING, 1994; LALITHA; SHYAMASUNDARI; RAO, 1997; KLUGER et al., 2006; SZKLARZEWICZ et al., 2007, 2008; WINNICK; HOLWELL; HERBERSTEIN, 2009).

A principal fonte de fornecimento de substâncias incorporadas pelo oócito durante o processo pré-vitelogênico é o trofário. Nessa etapa, o oócito acumula componentes citoplasmáticos diversos, tais como RNA, proteínas, mitocôndrias, ribossomos e demais organelas (BONHAG, 1958; DAVENPORT, 1976; BUNING, 1994), fato confirmado em *D. citri*, pela aumento celular considerável e acúmulo de estruturas citoplasmáticas sem precedentes, como ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e principalmente mitocôndrias, de aspecto idêntico àquelas presentes no sincício do trofário.

As células foliculares presentes ao redor dos oócitos em crescimento nos ovaríolos telotróficos (BONHAG, 1958, BUNING, 1998) em *D. citri* possuem formato colunar até meados da etapa pré-vitelogênica, enquanto ainda apresentam atividade secretora incipiente. Além da função de revestimento, as células foliculares apresentam importante papel durante a vitelogênese, podendo atuar ativamente na síntese, captação e incorporação de macromoléculas

no oócito (KING, 1970; KING; BUNING, 1985; RAIKHEL; DHADIALLA, 1992; HUEBNER; ANDERSON, 1972; PATRÍCIO; CRUZ-LANDIM, 2001; SANTOS, 2001). Nesse período, são observados eventos seqüenciais que caracterizam o crescimento do oócito, tais como o acúmulo de componentes celulares, provenientes do trofário, e vitelo, por meio de síntese ou transporte de substâncias oriundas da hemolinfa, através das células foliculares, cujo processo, salvo as peculiaridades pertinentes ao tipo de ovário, são comumente descritos para outras espécies de insetos (BONHAG, 1958; BRUNT, 1971; KING; BUNING, 1985; BUNING, 1994; SZKLARZEWICZ, WNEK; BILINSKI, 2000; SANTOS, 2001; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS, 2007).

Mesmo após a formação do córion, ocorre o trânsito de vesículas pinocíticas através das células foliculares, condição essa descrita por Santos (2001) em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), sendo relatado o transporte de material exógeno para o oócito via transporte paracelular, mesmo após a deposição da membrana vitelínica, com evidente atividade pinocítica.

2.5.2.2 Estruturas anexas do aparelho reprodutor de *D. citri*

As glândulas acessórias do aparelho reprodutor em insetos estão associadas à secreção de substâncias que participam dos mecanismos de fertilização e oviposição. Podem ocorrer como estruturas anexas ou áreas especializadas do trato reprodutivo (WHEELER, 2003). Do ponto de vista histo-morfológico as glândulas acessórias do aparelho reprodutor de *D. citri* assemelham-se àquelas observadas em outras espécies, nas quais o epitélio secretor simples formado por células colunares ou cuboidais apresenta, em sua porção apical, uma íntima cuticular revestindo o lúmen irregular (WINTERTON et al., 1999; De SANTIS et al., 2008; WINNICK; HOLWELL; HERBERSTEIN, 2009), diferindo quanto a presença de células basais secretoras da íntima (TIRONE; AVANCINI, 1997). As características ultraestruturais e citoquímicas dessas células são indicativas de alta atividade sintética, sendo que, segundo Conti e Bin (2000) e De Santis et al. (2008), tais compostos são ricos em gliconjugados e proteínas que formam uma substância viscoelástica, servindo para fixar os ovos ao substrato. Além disso, as secreções dessas glândulas podem conter cairomônios, os quais atuam como atraentes para inimigos naturais (SALERNO et al., 2002; FIABOE et al., 2003; ROUAULT; BATTISTI; ROQUES, 2006), sendo esses

componentes detectados sobre ovos de heterópteros (BIN; VINSON; STRAND, 1993) e coleópteros (TAEHYUN; MYUNGJIN, 2003).

A espermateca (= *receptaculum seminis*), presente na maioria dos insetos, é uma estrutura sacciforme de formato variado entre as espécies, na qual os espermatozoides são depositados e mantidos após a cópula (KLOWDEN, 2003; GILLOT, 2005; GOTOH et al., 2008). Em *D. citri*, a espermateca possui formato arredondado e tamanho reduzido em fêmeas virgens; porém, há um aumento de volume em fêmeas inseminadas, quando assume formato riniforme. Barker (1989) relata configuração semelhante em *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae), e Winnick, Holwell e Herberstein (2009) destacam o aumento de volume desse órgão decorrente da inseminação em *Ciulfina klassi* (Mantodea: Liturgusidae). O oposto foi verificado por Gotoh et al. (2008) em três subfamílias de Vespidae, nas quais não há diferença significativa de volume na espermateca entre fêmeas acasaladas e virgens.

Tipicamente, os insetos possuem apenas uma espermateca; no entanto, alguns dípteros possuem três, enquanto certos coleópteros podem apresentar duas espermatecas, contendo uma glândula espermatecal anexa (DIEFENBACH; REDAELLI; GASSEN, 1998; HOSKEN; WARD, 2000; KLOWDER, 2003), ou serem desprovidos de espermateca (JAHNKE; REDAELLI; DIEFENBACH, 2006). *D. citri* apresenta espermateca com estrutura característica entre os insetos, com uma lâmina basal de revestimento externo, seguida por um epitélio simples de função secretora, o qual possui microvilosidades no ápice celular em contato com uma íntima delgada que reveste o lúmen. O ducto espermatecal assemelha-se ao de outros insetos quanto à presença de um epitélio simples de revestimento e lúmen delgado revestido por íntima cuticular (SIVA-JOTHY, 1987; WINTERTON et al., 1999; WINNICK; HOLWELL; HERBERSTEIN, 2009). A função secretora do epitélio da espermateca caracteriza-se pela presença de diversas organelas relacionadas a essa função, tais como, mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e vacúolos em quantidade relativamente alta, corroborando ao descrito em *C. klassi* (WINTERTON et al., 1999; WINNICK; HOLWELL; HERBERSTEIN, 2009). Os espermatozoides transferidos à espermateca concentram-se junto à periferia, área de maior deposição do material secretado, sugerindo função nutritiva, a qual é citada por Tombes e Roppel (1972) em *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) e Winterton et al. (1999) em dípteros terevídios. O ducto da espermateca (= *ductus receptaculi*) de *D. citri* apresenta estrutura semelhante à descrita em *Teleogryllus comodus* (Orthoptera: Gryllidae) por Sturm (2008), sendo

constituída por uma área densa na região proximal, junto à espermateca, e revestido por um epitélio simples, com lúmen tubular delgado, e por íntima cuticular.

2.5.2.3 Desenvolvimento ovariano e análise da influência da cópula na maturação dos ovários de *D. citri*

Insetos apresentam diferentes estratégias reprodutivas dependendo das decisões de alocação e utilização de nutrientes adquiridos nas fases imatura e adulta (ALCOCK; GWYNNE, 1991; HUFFAKER; GUTIERREZ, 1999). Assim, podem decidir por investir os recursos nutricionais adquiridos na fase imatura para o desenvolvimento do soma e de reservas nutritivas, exigindo a aquisição de nutrientes na fase adulta para a sustentação das atividades reprodutivas. Por outro lado, há espécies de insetos que priorizam a rápida reprodução, utilizando nutrientes da fase imatura para o desenvolvimento de seu aparelho reprodutor, dando origem a adultos aptos a se reproduzirem logo após a emergência (JERVIS; FERNS, 2005). A estratégia reprodutiva adotada por insetos tem sido avaliada pelo seu índice de ovigenia (IO), que relaciona o potencial reprodutivo inicial do indivíduo (dado pelo número de ovos maduros no ovário) ao seu potencial observado (número total de ovos depositados). Dessa forma, insetos que apresentam potencial reprodutivo inicial semelhante ao observado ($IO = 1$) são classificados como pró-ovigênicos, enquanto aqueles que IO é próximo a zero, ou seja, o potencial observado é muito superior ao potencial reprodutivo inicial, são classificados como sinovigênicos, indicando haver o desenvolvimento de ovos ao longo do processo reprodutivo do inseto (ADAMS, 2000; JERVIS; FERNS, 2005).

O desenvolvimento de ovos após a emergência pode ser decorrente da utilização de reservas nutritivas adquiridas na fase imatura, as quais encontram-se armazenadas no tecido adiposo, mas principalmente de nutrientes adquiridos via alimentação. Outra fonte comum de nutrientes utilizada por fêmeas sinovigênicas é o fluido seminal produzido pelo macho. Dessa forma, além do papel de estimulação mecânica e hormonal que a cópula pode apresentar, a transferência dos fluídos da vesícula seminal do macho no processo de cópula pode representar uma fonte essencial de nutrientes para a sustentação das atividades metabólicas básicas da fêmea, assim como para o desenvolvimento de seu aparelho reprodutor e sustentação do desenvolvimento embrionário da progênie a ser produzida (WHEELER, 1996;).

A importância do papel da cópula e, conseqüentemente, da transferência de fluídos seminais para a sustentação do processo reprodutivo de fêmeas pode ser visualizado em espécies poliândricas ou que necessitam da realização de múltiplas cópulas para a maximização de sua reprodução (FOX, 1993; WHEELER, 1996).

A condição imatura do ovário de *Diaphorina citri* pós-emergência e o desenvolvimento do ovário apenas em fêmeas copuladas indicam a importância da cópula no processo reprodutivo desse inseto. Os resultados obtidos quanto ao processo de desenvolvimento de ovos, em que foi observada a completa utilização do conteúdo da espermateca (fluídos seminais + esperma) ao final do desenvolvimento e deposição de um ciclo oogônico, aliado à ausência de um segundo ciclo até o término dos experimentos, indicam que fêmeas de *D. citri* são poliândricas. Assim, fêmeas parecem necessitar de estímulos físicos (distensão da espermateca) e/ou químicos (moléculas sinalizadoras, nutrientes) produzidos pela cópula, para o desenvolvimento de novos ciclos oogênicos. Porém, a natureza dos fatores envolvidos nessa estimulação ainda necessita de investigação detalhada.

2.6 Conclusões

A organização estrutural dos ovaríolos de *Diaphorina citri* é semelhante à de outros Sternorrhyncha, principalmente Aleyrodidae, com os quais possuem proximidade filogenética;

O ovário de *D. citri* é do tipo meroístico telotrófico, com cerca de 50 ovaríolos;

O cordão trófico do ovário de *D. citri* não apresenta microtúbulos, utilizando de estratégia de transporte de nutrientes distinta daquela reconhecida para a maioria dos insetos;

Os ovaríolos de *D. citri* apresentam filamento apical rudimentar;

O desenvolvimento de ovos ocorre em ciclos, ocorrendo a maturação de apenas um oócito por ovaríolo;

A maturação do ovário de *D. citri* é dependente de estímulos derivados da cópula;

D. citri requer a realização de múltiplas cópulas para o desenvolvimento de novos ciclos oogênicos

Referências

- ADAMS, T.S. Effect of diet and mating status on ovarian development in a predaceous stink bug *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, n. 3, p. 529-535, 2000.
- ALCOCK, J.; GWYNNE, D.T. Evolution of insect mating systems: the impact of individual selectionist thinking. In: BAILEY, W.J.; RIDSDILL-SMITH, J. (Ed.). **Reproductive behavior of insects**. London: Chapman & Hall, 1991. p. 11-36.
- ATELLA, G.C.; GONDIM, K.C.; MACHADO, E.A.; MEDEIROS, M.N.; SILVA-NETO, M.A.C.; MASUDA, H. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 405-430, 2005.
- BARKER, G.M. Functional anatomy of the reproductive system of *Listronotus bonariensis* (Kuschel). **New Zealand Entomologist**, Auckland, v. 12, p.34-42, 1989.
- BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G.; RODRIGUES, C.J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri: Ed. Manole, 2003. 331 p.
- BERRY, S.J. Maternal direction of oogenesis and early embryogenesis in insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 27, p. 205-227, 1982.
- BONHAG, P.F. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 3, p. 137-160, 1958.
- BROUGH, C.N.; DIXON, A.F.G. Follicular sheath (ovarian sheath) structure in virginoparae of the vetch aphid, *Megoura viciae* Buckton (Homoptera: Aphididae). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 18, p. 217-226, 1989.
- BRUNT, A.M. The histology of the first batch of eggs and their associated tissues in the ovariole of *Dysdercus fasciatus* Signoret (Heteroptera: Pyrrhocoridae) as seen with the light microscope. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 134, p. 105-130, 1971.
- BUNING, J. The telotrophic-meroistic ovary of Megaloptera. I. The ontogenetic development. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 162, p. 37-66, 1979.
- _____. Morphology, ultrastructure, and germ cell cluster formation in ovarioles of aphids. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 186, p. 209-221, 1985.

_____. Germ cell cluster formation in insect ovaries. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 22, p. 237-253, 1993.

_____. The ovary of Ectognatha, the Insecta s.str. In: BÜNING, J. (Ed.). **The insect ovary: ultrastructure, previtellogenic growth and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 281-299.

_____. The ovariole: structure, type, and phylogeny. In: HARRISON, F.W.; LOCKE, M. (Ed.). **Microscopic anatomy of invertebrates**. New York: Wiley-Liss, 1998. v. 11C, Insecta, p. 898-931.

_____. Ovariole structure supports sistergroup relationship of Neuropterida and Coleoptera. **Arthropods Systematics & Phylogeny**, Dresden, v. 64, n. 2, p. 115-126, 2006.

_____. The telotrophic ovary known from Neuropterida exists also in the myxophagan beetle *Hydroscapha natans*. **Development Genes and Evolution**, Heidelberg, v. 215, p. 597-607, 2005.

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Ultrastructural study of the ovary of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera). **Micron**, Amsterdam, v. 37, p. 633-639, 2006.

_____. Female reproductive system of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Auchenorrhyncha): vitellogenesis dynamics and protein quantification. **Micron**, Amsterdam, v. 38, p. 65-73, 2007.

CARAYON, J. Nombre et disposition des ovarioles dans les ovaries des hémiptères – hétéroptères. **Muséum National d'Histoire Naturelle**, Paris, v. 22, p. 470-475, 1950.

CAVE, M.D. Absence of ribosomal DNA amplification in the meroistic (telotrophic) ovary of the large milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Hemiptera: Lygaeidae). **Journal of Cell Biology**, New York, v. 66, p. 461-469, 1975.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 749 p.

COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. **Drosophila ringer's solution**. 2007. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/full/2007/7/pdb.rec10919>>. Acesso em: 15 jun. 2007.

COLE, R.W.; WOODRUFF, R.I. Charge dependent distribution of endogenous proteins within vitellogenic ovarian follicles of *Actias luna*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, n. 3, p. 275-287, 1997.

_____. Vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila* exhibit a charge-dependent distribution of endogenous soluble proteins. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 46, p. 1239-1248, 2000.

COUCHMAN, J.R.; KING, P.E. Germarial structure and oogenesis in *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphidae). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 1-10, 1979.

DAVENPORT, R. Transport of ribosomal RNA into the oocytes of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 22, p. 925-926, 1976.

De SANTIS, F.; CONTI, E.; ROMANI, R.; SALERNO, G.; PARILLO, F.; BIN, F. Colleterial glands of *Sesamia nonagrioides* as a source of the host-recognition kairomone for the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 33, p. 7-16, 2008.

DIEFENBACH, L.M.G.; REDAELLI, L.R.; GASSEN, D.N.; Characterization of the internal reproductive organs and their state as diapauses indicator in *Phytalus sanctipauli* Blanchard, 1850 (Coleoptera, Scarabaeidae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 58, n. 3, p. 541-546, 1998.

DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; OGORZALEK, A. F-actin, β -tubulin, aldolase, and fructose-1,6-bisphosphatase in heteropteran ovarioles – I. Immunocytochemical investigations of whole-mounted ovarioles. **Cell & Tissue Research**, Berlin, v. 321, p. 311-321, 2005.

FAUNA EUROPAEA WEB SERVICE **Fauna Europaea** version 1.1. 2004. Disponível em: <<http://www.faunaeur.org>>. Acesso em: 12 nov. 2008.

FIABOE, M.K.; CHABI-OLAYE, A.; GOUNOU, S.; SMITH, H.; BORGEMEISTER, C.; SCHULTHEIS, F. *Sesamia calamistis* calling behavior and its role in host finding of egg parasitoids *Telenomus busseolae*, *Telenomus isis* and *Lathromeris ovicida*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 4, p. 921-930, 2003.

FOX, C.W. The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Oecologia**, Berlin, v. 96, p. 139-146, 1993.

GHANIN, M.; ROSELL, R.C.; CAMPBELL, L.R.; CZOSNEK, H.; BROWN, J.K.; ULLMAN, D.E. Digestive, salivary, and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) B Type. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 248, p. 22-40, 2001.

GILLOT, C. **Entomology**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2005. 835 p.

GOTOH, A.; BILLEN, J.; HASHIM, R.; ITO, F. Comparison of spermatheca morphology between reproductive and non-reproductive females in social wasps. **Arthropod Structure & Development**, Amsterdam, v. 37, p. 199-209, 2008.

GREGÓRIO, E.A.; SECCO, V.N.D.P.; TOLEDO, L.A.; LELLO, E. Ultrastructure of the ovary of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). II. Origin of the *tunica propria* in ovarioles. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 315-320, 1990.

HOSKEN, D.G.; WARD, P.I. Copula in yellow dung flies (*Scathophaga stercoraria*): investigating competition models by histological observations. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 46, p. 1355-1363, 2000.

HUEBNER, E. The ultrastructure and development of the telotrophic ovary. In: KING, R.C.; AKAI, H. (Ed.). **Insect ultrastructure**. New York: Plenum Press, 1984. v. 2, p. 3-48.

HUEBNER, E.; ANDERSON, E. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus* II. Oocyte differentiation. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 137, p. 385-416, 1972.

HUEBNER, E., DIEHL-JONES, W. Nurse cell-oocyte interaction in the telotrophic ovary. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 22, p. 369-387, 1993.

HUFFAKER, C.B.; GUTIERREZ, A.P. **Ecological entomology**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1999. 756 p.

HUGHES, M., BERRY, S.J. The synthesis and secretion of ribosomes by nurse cells of *Anthereae polyphemus*. **Developmental Biology**, New York, v. 23, p. 651-664, 1970.

HUMMEL, N.A.; ZALOM, F.G.; C.Y.S. Anatomy and histology of reproductive organs of female *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae: Proconiini), with special emphasis on characterization of vitellogenic oocytes. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 99, n. 5, p. 920-932, 2006.

JAHNKE, S.M.; REDAELLI, L.R.; DIEFENBACH, L.M.G. Internal reproductive organs of *Cosmoclopius nigroannulatus* (Hemiptera: Reduviidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 2A, p. 509-512, 2006.

JEDRZEJOWSKA, I.; KUBRAKIEWICZ, J. Ovariole development in telotrophic ovaries of snake flies (Raphidioptera). **Folia Biologica**, Praha, v. 52, n. 3-4, p. 175-184, 2004.

- JERVIS, M.A.; FERNS, P.N. The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. **Oikos**, Copenhagen, v. 107, p. 449-460, 2005.
- KAULENAS, M.S. **Insect accessory reproductive structures**. Function structure and development. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 224 p.
- KING, R.C. **Ovarian development in *Drosophila melanogaster***. New York: Academic Press, 1970. 227 p.
- KING, R.C; BUNING, J. The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology: embryogenesis and reproduction**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 1, p. 37-82.
- KLOWDEN, D.E. Spermatheca. In: RESH, V.H.; CARDÉ, R.T. (Ed.). **Encyclopedia of insects**. Palo Alto: Academic Press, 2003. p. 1058-1059.
- KLUGER, J.; RÜBSAM, R.; TRAUNER, J.; BÜNING, J. The larval development of the telotrophic meroistic ovary in the bug *Dysdercus intermedius* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). **Arthropod Structure & Development**, Amsterdam, v. 35, p. 33-110, 2006.
- KSIAZKIEWICZ, M. Ultrastructure of the trophic chamber and nutritive cord of *Aspidiotus hederæ* (Homoptera, Coccoidea). **Cell & Tissue Research**, Berlin, v. 213, p. 149-157, 1980.
- LALITHA, T.G.; SHYAMASUNDARI; RAO, K.H. Morphology and histology of the female reproductive system of *Abedus ovatus* Stal (Belostomatidae: Hemiptera: Insecta). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p. 129-135, 1997.
- LANE, J.D.; STEBBINGS, H. Phosphorylation of microtubule-associated proteins from the ovaries of hemipteran insects by MPF kinase: possible roles in the regulation of microtubules during oogenesis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 39, p. 81-90, 1998.
- LEATHER, S.R.; WELLINGS, P.W. Ovariolo numbers and fecundity in aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 30, p. 128-133, 1981.
- LUTZ, D.A.; HUEBNER, E. Development and cellular differentiation in and insect telotrophic ovary (*Rhodnius prolixus*). **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 12, n. 4, p. 773-794, 1980.
- MARTÍNEZ, I.M. Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa**, n. 30, p. 187-195, 2002. Disponible

em: <<http://entomologia.rediris.es/aracnet/9/metodologias/tecnicas/index.htm>>. Acesso em: 21 nov 2008.

MUNZ, A.; DITTMAN, F. Voltage gradients and microtubules both involved in intercellular protein and mitochondria transport in telotrophic ovariole of *Dysdercus intermedius*. **Roux's Archives of Developmental Biology**, Berlin, v. 196, p. 391-396, 1987.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diphorina citri* (Hemiptera, Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 131, n. 9-10, p. 709-715, 2007.

OSETO, C.Y.; HELMS, L.T.J. Embryonic and postparturient reproductive system development in *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Homoptera: Aphididae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 64, p. 603-608, 1971.

PAPAJ, D.R. Ovarian dynamics and host use. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 45, p. 423-448, 2000.

PATRÍCIO, K.; CRUZ-LANDIM, C. Tipos de ovários presentes nos insetos. Características morfológicas e ultra-estruturais: uma revisão. **Naturalia**, São Paulo, v. 26, p. 53-68, 2001.

RAIKHEL, A.S.; DHADIALLA, T.S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 217-251, 1992.

ROUALT, G.; BATTISTI, A.; ROQUES, A. Oviposition sites of the cypress seed bug *Orsillus maculatus* and response of the egg parasitoid *Telenomus* gr. *floridanus*. **BioControl**, Dordrecht, v. 52, p. 9-24, 2007.

SALERNO, G.; CONTI, E.; COLAZZA, S.; PERI, E.; BIN, F. Volatile chemicals released by pentatomid bugs having a kairomonal effect on *Trissolcus basalus*: their role on host specificity and prospects for IPM. **IOBC WPRS Bulletin**, Zurich, v. 25, p. 1-8, 2002.

SANTOS, D.C. **Vitelogênese e coriogênese em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae)**: estudo morfológico e citoquímico. 2001. 151 p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2001.

SANTOS, D.C.; GREGÓRIO, E.A. Deposition of the eggshell layers in the Sugar Cane Borer (Lepidoptera: Pyralidae): ultrastructural aspects. **Acta Microscopica**, Caracas, v. 12, n. 1, p. 37-41, 2003

SIMICZYJEW, B. Germ cell cluster differentiation in polytrophic ovarioles of hanging-flies (Mecoptera: Bittacidae). **Zoologica Poloniae**, Lemberg, v. 48, p. 71-79, 2003.

SIVA-JOTHY, M.T. The structure and function of the female sperm-storage organs in libellulid dragonflies. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 33, n. 8, p. 559-567, 1987.

STURM, R. Morphology and histology of the *ductus receptaculi* and accessory glands in the reproductive tract of the female cricket, *Teleogryllus comodus*. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 8, n. 35, p. 1-12, 2008. Disponível em: <<http://www.insectscience.org/8.35>>. Acesso em: 10 out. 2007.

STYS, P.; BILINSKI, S. Ovariole types and the phylogeny of hexapods. **Biological Reviews**, London, v. 65, n. 4, p. 401-429, 1990.

SZKLARZEWICZ, T.; WNEK, A.; BILÍNSKI, S.M. Structure of ovarioles in *Adelges laricis*, a representative of the primitive aphid family Adelgidae. **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 81, p. 307-313, 2000.

SZKLARZEWICZ, T.; JANKOWSKA, W.; LUKASIEWICZ, K.; SZYMANSKA, B. Structure of the ovaries and oogenesis in *Cixius nervosus* (Cixiidae), *Javesella pellucida* and *Conomelus anceps* (Delphacidae) (Insecta, Hemiptera, Fulgoromorpha). **Arthropod Structure & Development**, Amsterdam, v. 36, p. 199-207, 2007.

SZKLARZEWICZ, T.; JANKOWSKA, W.; WIECZOREK, K.; WEGIEREK, P. Structure of the ovaries of the primitive aphids *Phylloxera coccinea* and *Phylloxera glabra* (Hemiptera, Aphidinea: Phylloxeridae). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 89, p. 1-9, 2008.

TELFER, W.H.; WOODRUFF, R.I. Ion physiology of vitellogenic follicles. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 48, p. 915-923, 2002.

TOMBES, A.S.; ROPPEL, R.M. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil, *Sitophilus granaries* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 141-152, 1972.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Concord, v. 93, n.6, p. 1721-1725, 2000.

TSAI, J.H.; PERRIER, J.L. Morphology of the digestive and reproductive systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifons* (Homoptera: Cicadellidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 79, n. 4, p. 563-578, 1996.

TWORZYDLO, W.; BILINSKI, S.M. Structure of ovaries and oogenesis in dermapterans. I. Origin and functioning of the ovarian follicles. **Arthropod Structure & Development**, Amsterdam, v. 37, p. 310-320, 2008.

WENNINGER, E.J.; HALL, D.G. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.90, n. 4, p. 715-722, 2007.

WHEELER, D. The role of nourishment in oogenesis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 41, p. 407-431, 1996.

WHEELER, D.E. Accessory glands. In: RESH, V.H.; CARDÉ, R.T. (Ed.). **Encyclopedia of insects**. Palo Alto: Academic Press, 2003. p. 1-3.

WINNICK, C.G.; HOLWELL, G.I.; HERBERSTEIN, M.E. Internal reproductive anatomy of the praying mantid *Ciulfina klassi* (Mantodea: Liturgusidae). **Arthropod Structure & Development**, Amsterdam, v. 38, p. 60-69, 2009.

WINTERTON, S.L.; MERRIT, D.J.; O'TOOLE, A.; YEATES, D.K.; IRWIN, M.E. Morphology and histology of the spermathecal sac, a novel structure in the female reproductive system of Therevidae (Diptera: Asiloidea). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, Amsterdam, v. 28, p. 273-279, 1999.

WITLACZIL, E. Die anatomie der psylliden. **Zeitschrift Wissenschaftliche Zoologie**, Berlin, v. 42, p. 569-638, 1885.

WOODRUFF, R.; ANDERSON, K. Nutritive cord connection and dye-coupling of the follicular epithelium to the growing oocytes in the telotrophic ovarioles in *Oncopeltus fasciatus*, the milkweed bug. **Roux's Archives of Developmental Biology**, Berlin, v. 193, p. 158-163, 1984.

3 TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DE ENDOSSIMBIONTES EM *Diaphorina citri* KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Resumo

Diaphorina citri, a exemplo de outros psílídeos, possuem microrganismos endossimbiontes contidos em um órgão especializado, denominado bacterioma. Os simbiontes estão distribuídos em duas regiões distintas dessa estrutura. Os bacteriócitos, abrigam, principalmente, bactérias pleomórficas, denominadas simbionte primário, e revestem uma região sincicial, na qual estão contidas bactérias pleomórficas providas de parede celular, tripla membrana e caracterizadas pela presença de inclusões espiraladas, além de outros tipos de bactéria de ocorrência sistêmica e intermitente, de formato cocóide ou baciliforme. Durante o período de maturação dos oócitos, a partir da pré-vitelogênese avançada, bacteriócitos migram para os ovariolos, formando falhas no revestimento do bacterioma, permitindo a saída de simbiontes do sincício. De modo semelhante à migração de aleirodídeos, o bacteriócito intacto, invade o oócito, movimentando-se entre as células foliculares. O bacteriócito migrante possui tanto bactérias que normalmente estão alojadas nesta célula, quanto as bactérias de formato cocóide ou baciliforme. Após a invasão do oócito, as bactérias migram para o pólo posterior do oócito, formando um aglomerado de formato arredondado (= “symbion ball”).

Palavras-chave: Psílídeo dos citros; Microrganismos endossimbiontes; Ovário; Transmissão transovariana; Ultraestrutura

Abstract

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), as well as other psyllids, harbor prokaryotic microorganisms in a specialized organ named bacteriome. The pleomorphic primary symbionts reside within bacteriocytes, which are specialized cells that ensheath a central syncytium, in which large, electron lucent cells with long, spiral-shaped filamentous structures of high electron density within the cytoplasm are seen. Coccoid or rod-shaped bacteria were also seen in both syncytium and bacteriocytes, but in much smaller abundance. During the oogenesis process, half way after pre-vitellogenesis, bacteriocytes will detach from the bacteriome and move to the ovary, invading the oocyte by passing through the follicular epithelium. As the bacteriocytes leave the bacteriome, small gaps are left behind on the bacteriome coating, allowing the escape of the bacteria contained in the syncytium. The migrating bacteriocyte contains the main bacteriocyte resident bacteria and the less common coccoid or rod-shaped bacteria which may also be found associated with the bacteriome. The syncytium symbiont will migrate freely in the hemolymph, and gains access to the developing oocyte through the follicular epithelium.

After oocyte invasion by the bacteriocyte and by the freely migrating bacteria, all symbionts aggregate at the posterior pole close to the pedicel in a ball-like symbiont structure.

Keywords: Citrus psyllid; Endosymbiotic microorganisms; Ovary; Transovarial transmission; Ultrastructure

3.1 Introdução

Associações de simbiose entre insetos e microrganismos são amplamente difundidas, havendo estimativas de sua ocorrência em cerca de 15-20% das espécies estudadas (BUCHNER, 1965; BAUMANN, 2005). Coevolutivamente, as interações de simbiose, cuja ocorrência data entre 280 e 20 milhões de anos, promoveram o desenvolvimento de mecanismos fisiológicos específicos e fundamentais ao sucesso ecológico dos parceiros (MORAN; TRAN; GERARDO, 2005; OVERMANN, 2006). Dessa forma, a aquisição de novas habilidades propiciou a ocupação de nichos restritivos, como ocorre entre os insetos sugadores de seiva do floema, dieta nutricionalmente deficiente em compostos nitrogenados (DOUGLAS, 1998; SANDSTROM; MORAN, 1999; BAUMANN, 2005).

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), a exemplo de outros insetos sugadores de seiva da subordem Sternorrhyncha, mantém associações de simbiose obrigatórias com microrganismos procariotos que se alojam em estruturas celulares específicas, bacteriócitos ou micetócitos, contidas no interior do hospedeiro, em estruturas denominadas bacterioma ou micetoma (DOUGLAS, 1998; FUKATSU; NIKOH, 1998; BAUMANN, 2005; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006). De modo geral, o bacterioma consiste de uma estrutura complexa formada por três tipos celulares: *tecido sincicial*, que compreende uma área multinucleada central, circundada por *bacteriócitos* uninucleares arredondados, e um envelope de *células achatadas* envolvendo todo o órgão. O citoplasma dos bacteriócitos contém bactérias pleomórficas Gram-negativas, denominadas endossimbionte primário, o qual é transmitido verticalmente à progênie (THAO et al., 2000; BAUMANN, 2005). No sincício do bacterioma ocorrem bactérias morfologicamente distintas, inicialmente denominados de endossimbiontes secundários, também transmitidos verticalmente, mas que também apresentam função essencial ao desenvolvimento do hospedeiro, complementando as atividades das bactérias associadas aos bacteriócitos (FUKATSU; NIKOH, 1998; SUBANDIYAH et al., 2000;

BAUMANN, 2005). No entanto, apesar do crescente volume de trabalhos investigando a associação inseto-simbionte, são poucos os estudos voltados aos mecanismos de transmissão de endossimbiontes do bacterioma aos tecidos reprodutivos (ZELAZOWSKA; BILÍNSKI, 1999; SACCHI et al., 2000; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006). Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar os aspectos relacionados à distribuição e transmissão vertical de endossimbiontes de *D. citri*.

3.2 Revisão Bibliográfica

3.2.1 Interações endossimbiontes - sugadores de seiva

Associações entre insetos e bactérias intracelulares são muito comuns na natureza, sendo estimado que cerca de 15-20% de todas as espécies de insetos possuem endossimbiontes (DOUGLAS, 1998; BAUMANN, 2005; OVERMANN, 2006). A presença de microrganismos simbiotes em insetos foi descrita pela primeira vez por Blockman (1887), mas a maioria dos simbiotes associados a insetos não pode ser cultivada em meio artificial em virtude do alto grau de especialização adquirido com o ambiente intracelular (BAUMANN; MORAN, 1997; DOUGLAS, 1998; PONTES; DALE, 2006). Dois tipos distintos de endossimbiontes podem ser encontrados em insetos: (1) *primários* - vivem associados a estruturas especiais na hemocele do hospedeiro, os bacteriócitos ou micetócitos, e são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro; (2) *secundários ou facultativos* – podem se alojar na maioria dos tecidos do hospedeiro, sendo sua relação com o mesmo nem sempre é bem definida, como por exemplo, *Wolbachia*, comum aos artrópodes (AKHTAR; van EMDEN, 1994; WERREN, 1997; BAUMANN, 2005; GOTTLIEB et al., 2006; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006).

Os simbiotes primários são comumente associados a insetos de hábito alimentar especializado, restrito a uma fonte nutricional única, normalmente deficiente em nutrientes essenciais, e acabam suprindo os seus hospedeiros justamente com os nutrientes carentes em sua dieta natural (DOUGLAS, 1998; SANDSTROM; MORAN, 1999; THAO et al., 2000; ZCHORIFEIN; BROWN, 2002; MORAN; TRAN; GERARDO, 2005; GOTTLIEB et al., 2006). Endossimbiontes têm ampla ocorrência entre os hemípteros membros da subordem Sternorrhyncha, tais como, Aphidoidea, Aleyrodoidea, Coccoidea e Psylloidea, os quais se

alimentam predominantemente de seiva elaborada (THAO et al., 2000; BAUMANN, 2005). Estudos histológicos indicaram a ocorrência desses simbioses em células especializadas, os bacteriócitos, os quais formam agregados (= bacterioma) na hemocele do inseto (MORAN; TELANG, 1998; BAUMANN, 2005; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006). Nos psilídeos, o tipo mais comum de bacterioma descrito consiste de uma grande estrutura amarelada, bilobada, constituída internamente de um sincício multinucleado circundado por bacteriócitos uninucleares arredondados, envoltos por grande quantidade de células alongadas (FUKATSU; NIKOH, 1998; BAUMANN, 2005). O citoplasma dos bacteriócitos é repleto do simbionte primário *Carsonella ruddii*, enquanto o citoplasma sincicial é preenchido pelo, vulgarmente denominado, simbionte do sincício (WAKU; ENDO, 1987; FUKATSU; NIKOH, 1998; SPAULDING; von DOHLEN, 1998).

Os simbioses primários melhor estudados atualmente são: (1) *Buchnera aphidicola*, endossimbionte de afídeos; (2) *Wigglesworthia glossinidia*, encontrada em moscas tsé-tsé e (3) *Blattobacterium cuenoti* habitantes de baratas e cupins (MORAN; BAUMANN, 1994; MORAN; TELANG, 1998; BAUMANN, 2005). Porém, o sequenciamento do genoma de *Carsonella ruddii* (NAKABACHI et al., 2006; TAMAMES et al., 2007) abriu novas perspectivas para a realização de estudos da interação hospedeiro-simbionte e sua exploração para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de insetos-praga. Diversos mecanismos foram desenvolvidos para assegurar a transmissão de endossimbioses do bacterioma materno para a progênie. Na maioria das espécies, os simbioses são transmitidos verticalmente, por via transovariana, infectando células germinativas imaturas, como oogônia ou oócitos pré-vitelogênicos, invadindo oócitos em estágio avançado de maturação, e nas formas partenogênicas, como afídeos, infectando o ovo durante a embriogênese (AL-KHALIFA, 1984; GUTZEIT; ZISSLER; PERONDINI, 1985; SACCHI et al., 1985; ZELAZOWSKA; BILÍNSKI, 1999).

Em ninfas de Anoplura, os bacteriócitos se distribuem entre as células epiteliais do intestino médio e na base dos ovaríolos, em contato com os ovidutos laterais (ZELAZOWSKA; BILÍNSKI, 1999), sendo transferidos para os oócitos durante a oogênese (EBERLE; MCLEAN, 1983; ZELAZOWSKA; BILÍNSKI, 1999; SACCHI et al., 2000). Entre Sternorrhyncha, os aleirodídeos apresentam uma forma distinta de transmissão de endossimbioses, caracterizada pela migração de bacteriócitos repletos de simbionte para os ovários, que invadem os oócitos em desenvolvimento (SKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001). Em outros membros de Sternorrhyncha, os

simbiontes migram do bacteriócito e adentram as células germinativas. No caso de afídeos sexuados, por exemplo, acredita-se que o simbionte primário *Buchnera aphidicola* invada os ovos pouco antes da oviposição através dos cordões tróficos (BAUMANN, 2005).

Populações naturais de *D. citri* podem estar associadas a até cinco simbiontes distintos, incluindo o simbionte primário, uma γ -proteobactéria contida no bacteriócito, a qual é transmitida verticalmente para a progênie (SUBANDAIYAH et al., 2000, SALVADOR; CÔNSOLI, submetido). No entanto, nada consta na literatura sobre o mecanismo utilizado para a transmissão transovariana de simbiontes de *D. citri*, principalmente sob o ponto de vista ultraestrutural.

3.3 Material e Métodos

Os espécimes de *Diaphorina citri* empregados nos experimentos foram provenientes de população mantida em condições controladas ($28\pm 2^\circ\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR, fotofase 14 h), utilizando-se mudas de murta, *Murraya paniculata*, como substrato de criação (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007). Ninfas de 5º instar e fêmeas adultas foram amostradas em diferentes estágios do desenvolvimento para a obtenção do aparelho reprodutor e/ou bacterioma, os quais foram processados de acordo com as análises morfo-estruturais subsequentes.

3.3.1 Obtenção de ovários

Ninfas de penúltimo (= quarto instar) e último instar, e fêmeas de *D. citri* recém-emergidas e nas fases de pré-vitelogênese e vitelogênese, determinadas em testes preliminares, foram dissecadas em solução de Ringer tamponada para insetos [$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, KCl 182mM, NaCl 46mM, Tris base 10mM, HCl 1N para ajustar pH 7,2] (CSH PROTOCOLS, 2007), sob microscópio estereoscópico Motic SMZ-168. Logo após a dissecação, os ovários foram imediatamente transferidos para solução fixadora condizente ao tratamento subsequente.

3.3.2 Preparação de ovários para análise em montagem total

Ovários de *D. citri*, previamente fixados em solução AFATD (75 ml etanol 96%, 10 ml formaldeído 40%, 5 ml ácido acético, 10 ml dimetilsulfóxido, 1g ácido tricloroacético) por 2 h à

temperatura ambiente, foram hidratados em série decrescente de etanol (96%, 80%, 70%, 50% e 30% - 5 min cada) e água destilada (5 min), sendo, posteriormente, hidrolisados em ácido clorídrico normal (5 min) (8,33 ml de HCl para 100 ml de H₂O). Após a hidrólise, os ovários foram tratados com reativo de Schiff (30 min), lavados em água destilada (5 min) e corados em verde luz (1 min) (MARTÍNEZ, 2002). Em seguida, o material foi lavado em água destilada (5 min), álcool absoluto (2x por 10 min) e diafanizados em xilol (2x por 10 min) para montagem em lâmina e lamínula em Entelan[®] (Merck). As análises morfológicas e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axiostar plus, equipado com câmera de captura de imagens Moticam 2000 e software Image Advanced 3.2 (Motic Co.).

3.3.3 Preparação de ovários para análise histológica

Logo após a dissecação, os ovários foram mergulhados em solução fixadora PFA-TBS (paraformaldeído 5%, Tween20 1%, em tampão fosfato 0,1%, pH 7,2) ou Karnovski (glutaraldeído 3%, paraformaldeído 3%, em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl₂), por 24 h. Após a fixação, foram lavados no mesmo tampão (3x - 10 min) e desidratados em concentrações crescentes de etanol (1x - 30%, 50%, 70% e 90%, 3x - 100% - 10 min/cada). Na sequência, o material foi infiltrado em solução de historresina-etanol absoluto (1:1) por 24 h, seguido por historresina pura por 24 h a 4°C. Logo após, os ovários foram transferidos para formas específicas, contendo solução de inclusão (Leica Historesin[®]), permitindo-se a polimerização da historresina a temperatura ambiente, por 48 h.

Cortes semi-finos (1-4 µm) foram obtidos em ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT e corados em solução aquosa de azul de toluidina (azul de toluidina 1%, borato de sódio 1% p/v) ou Azan Heidenhain-Mallory (azul de anilina 0,5%, laranja G 1%, fucsina ácida 3%, ácido fosfotúngstico 1%, p/v) (BEHMER et al., 2003) por 1 min. Após a coloração, os cortes foram rapidamente lavados em água destilada a fim de se retirar o excesso de corante, para posterior secagem a 60°C por 20 min, antes da montagem de lamínula em Entelan[®] (Merck). A análise e registro fotográfico do material processado foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 equipado com câmera de captura de imagens AxioCam MRc (Carl Zeiss).

3.3.4 Microscopia de fluorescência

Após a dissecação o material foi transferido para solução fixadora PFA-TBS (paraformaldeído 5%, tween20 1%, em tampão fosfato 0,1%, pH 7,2) por 24 h. Em seguida, foi lavado no mesmo tampão (3x - 10 min) e desidratado em série crescente de etanol (1x - 30%, 50%, 70% e 90%, e 3x 100% - 10 min/cada). Os ovários foram infiltrados em solução de historresina-etanol absoluto (1:1) (24 h) seguido por historresina pura (24 h). Após a infiltração, o material foi transferido para formas de formato cônico contendo solução de inclusão (Leica Historesin[®]) para polimerização, durante 48 h, em temperatura ambiente.

Os cortes semi-finos (1 μ m) obtidos em ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT foram submetidos a tratamento com 1,5 μ g de diamidino-2-fenilindol em meio de montagem Vectashield[®] (DAPI, Sigma Chemical Co.), durante 15 min, para detecção de DNA, e rodamina conjugada à faloidina (Sigma Chemical Co.), por 15 min, para a evidenciação de filamentos de actina. Após a coloração, o material foi coberto com lamínula e observado sob microscópio de fluorescência Olympus BX51 equipado com câmera Olympus DP 71 para captura de imagens.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura

Os ovários e bacteriomas foram dissecados em solução fisiológica (Ringer) e imediatamente transferidos para tubos tipo eppendorf[®] contendo solução fixadora (3% glutaraldeído + 3% paraformaldeído em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl₂), sendo fixados por 24 horas à 4°C. Em seguida, os ovários foram lavados em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2 + 5 mM CaCl₂ (3x10'), pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão (60') e desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 100%), antes de secagem em ponto crítico (CPD-030 Balzers, BAL-TEC), montagem em "stubbs" e metalização com ouro (SCD-050 Sputter Coater, BAL-TEC). A análise e registro fotográfico foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO 435 VP (Carl Zeiss[®]).

3.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a fixação prévia de ovários e bacterioma em solução Karnovski (glutaraldeído 3%, paraformaldeído 3%, em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl₂), por 24 h, seguiu-se à lavagem do material no mesmo tampão (3x - 10 min), e pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato 50 mM (60 min). Em seguida, o material foi contrastado *in bloc* com acetato de uranila 0,5 %, por 12 h, e desidratado em concentrações crescentes de acetona (1x - 30%, 50%, 70% e 90%, e 3x - 100%, 10 min/cada). Logo após, procedeu-se à infiltração dos ovários em resina:acetona (1:1) (EMBed 812, Electron Microscopy Science) (24 h) e resina pura (24 h), antes da transferência do material para formas adequadas para a polimerização em estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes ultra-finos (50-70 nm) obtidos com ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT, foram coletados sobre grades de cobre e contrastados em solução de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 1%, para posterior análise e captura de imagens ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900.

3.4 Resultados

3.4.1 Estrutura do bacterioma

Ninfas e adultos apresentam a parte mediano-dorsal do abdome ocupada pelo bacterioma, uma estrutura de coloração alaranjada, formato semelhante a “U”, ligada a diversos ramos traqueolares e circundada por tecido adiposo. O bacterioma coloca-se em íntimo contato com ovariolos a partir do final do último instar ninfal (quinto instar), quando estes estão em desenvolvimento. Apesar do íntimo contato entre bacterioma e ovários, não foram encontradas evidências de migração de bactérias nesse cenário, antes do período de maturação dos ovariolos. Estruturalmente, o bacterioma consiste de um epitélio formado por bacteriócitos, os quais são volumosos e revestem o citoplasma sincicial, localizado centralmente (Figura 1). Os bacteriócitos possuem núcleo volumoso, de cromatina esparsa, sendo o citoplasma repleto do simbionte primário, além de organelas, sendo as mais frequentes, mitocôndrias e complexo de Golgi. A região sincicial é preenchida por outro tipo de bactéria, o simbionte do sincício, contendo ainda,

núcleos celulares dispersos e organelas de aspecto semelhante às verificadas nos bacteriócitos (Figura 2).

As bactérias predominantes no citoplasma dos bacteriócitos são pleomórficas, possuem citoplasma eletrondenso circundado por membrana e dois pontos de inclusões eletrondensas, geralmente dispostos em áreas opostas no citoplasma. Apesar disso, bactérias distintas, de tamanho menor que aquelas pleomórficas, estrutura semelhante a rickétsias e formato variado, mas predominantemente cocóide ou baciliforme, também foram observadas no citoplasma de alguns bacteriócitos, principalmente, nas células em migração para os ovários. As bactérias do sincício, caracterizam-se pela presença de parede celular conspícua, revestimento por membrana tripla, cromatina filamentosa dispersa e estruturas eletrondensas de configuração espiraladas, dispersas em número variado no citoplasma bacteriano (Figura 2).

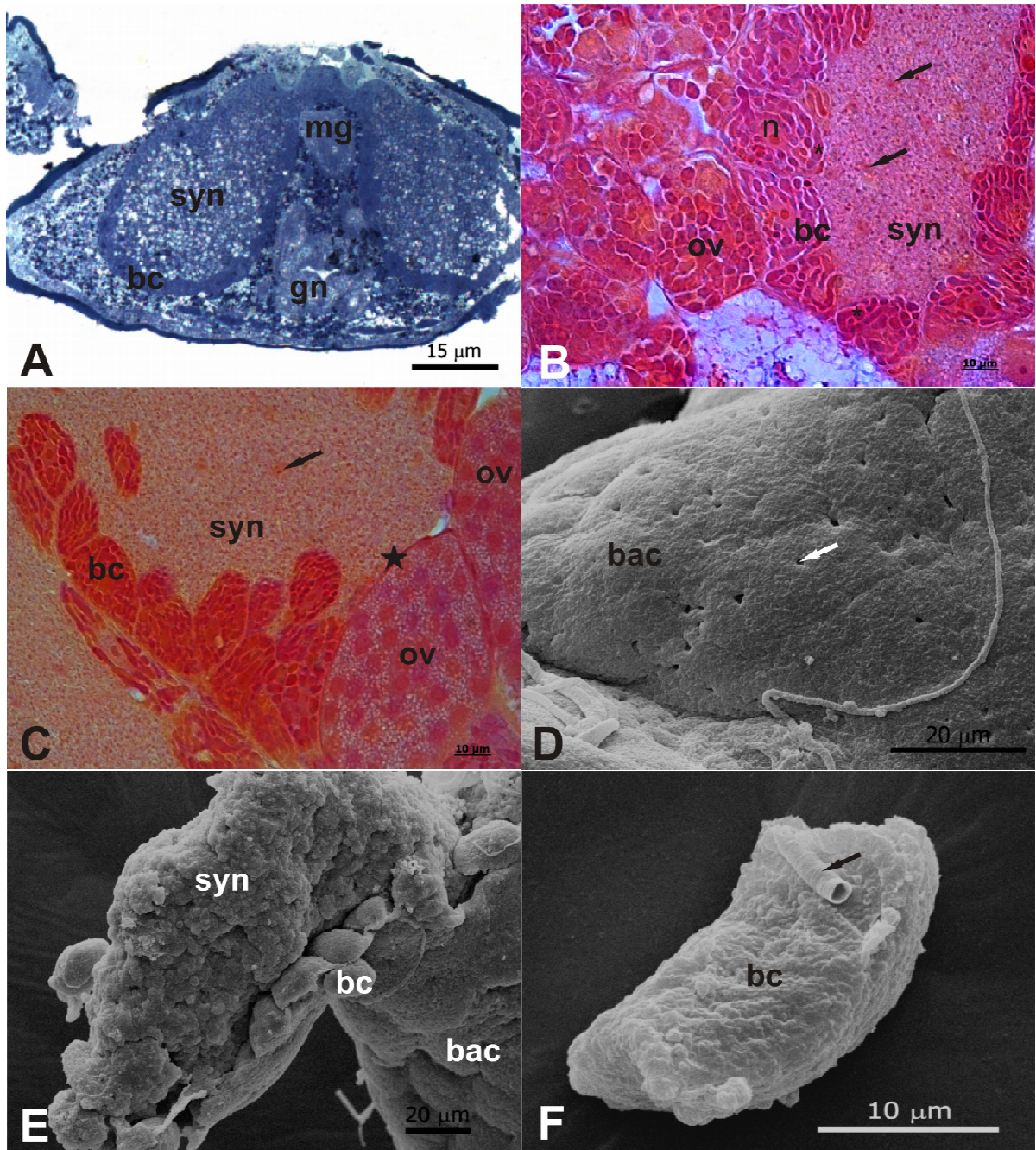


Figura 1 - Bacterioma de *D. citri*. A, corte transversal de abdome de ninfa, mostrando bacteriócitos (bc) revestindo o sincício (syn), e o posicionamento do bacterioma bilobado, acima do intestino (mg) e genitália em formação (gn); B-C, bacterioma e ovaríolos de ninfa de quinto instar e adultos, respectivamente, destacando bacteriócitos (bc) em íntimo contato (★) com ovaríolos (ov), núcleos de bacteriócito (n) e sincício (→); D, superfície de bacterioma (bac), evidenciando a presença de poros entre os bacteriócitos (→); E, bacterioma (bac) com o revestimento de bacteriócitos (bc) parcialmente retirado, destacando aspecto do sincício (syn); F, detalhe de bacteriócito (bc), contendo um ramo traqueal aderido (→)

3.4.2 Migração de endossimbiontes do bacterioma para oócitos em processo de maturação

Durante o período de maturação dos oócitos (ver ítem 2.4.1, Figura 1), o epitélio de revestimento do bacterioma, constituído por bacteriócitos, parece sofrer alterações caracterizadas pela formação de zonas de desagregação da camada de bacteriócitos, com o conseqüente desprendimento de células intactas ou a formação de espaços intercelulares. Devido ao desprendimento de bacteriócitos nessas áreas, formam-se falhas ou buracos no epitélio revestidor, permitindo a saída de bactérias do sincício, as quais presumivelmente são dispersas na hemocele, possivelmente, migrando para os ovariolos (Figura 3). Ovariolos primários, isto é, aqueles que não possuem oócitos em processo de maturação, não possuem microrganismos. Entretanto, ovariolos pré-vitelogênicos e principalmente aqueles vitelogênicos, apresentam bactérias semelhantes a rickétsias dispersas no sincício do trofário e no citoplasma do oócito. Tais bactérias foram detectadas no interior de células de revestimento do trofário, na ausência de bacteriócitos, indicando uma presumível rota de entrada nesta região do ovariolo (Figura 4). Entretanto, não foram observadas bactérias no cordão trófico, uma via de comunicação entre o trofário e oócito. Apesar da entrada de bactérias isoladamente no ovariolo, o sucesso da movimentação de simbiontes primários do bacterioma ao ovário ocorre pela migração de bacteriócitos. Os bacteriócitos se desprendem do bacterioma e chegam aos ovariolos repletos de bactérias de características morfológicas variadas, como bactérias pleomórficas, bactérias semelhantes a rickétsias, de formato cocóide ou bacilar, e ainda agrupamentos, contendo formas distintas. Os agrupamentos bacterianos contêm bactérias com de aspecto baciliforme reto ou curvado, apresentam parede celular, membrana tripla e citoplasma filamentososo disperso, e ainda, estruturas semelhantes a bactérias, de caráter eletrondenso e membrana dupla, em associação a bactérias baciliformes, formando pequenos grupos (Figura 5). Os bacteriócitos migram para a região basal do ovariolo, apresentando formato ovóide ou oblongo quando aderidos às células foliculares. Durante o período de migração, o bacteriócito move-se entre as células foliculares adjacentes, deslocando-as temporariamente, até adentrar o citoplasma do oócito (Figura 6).

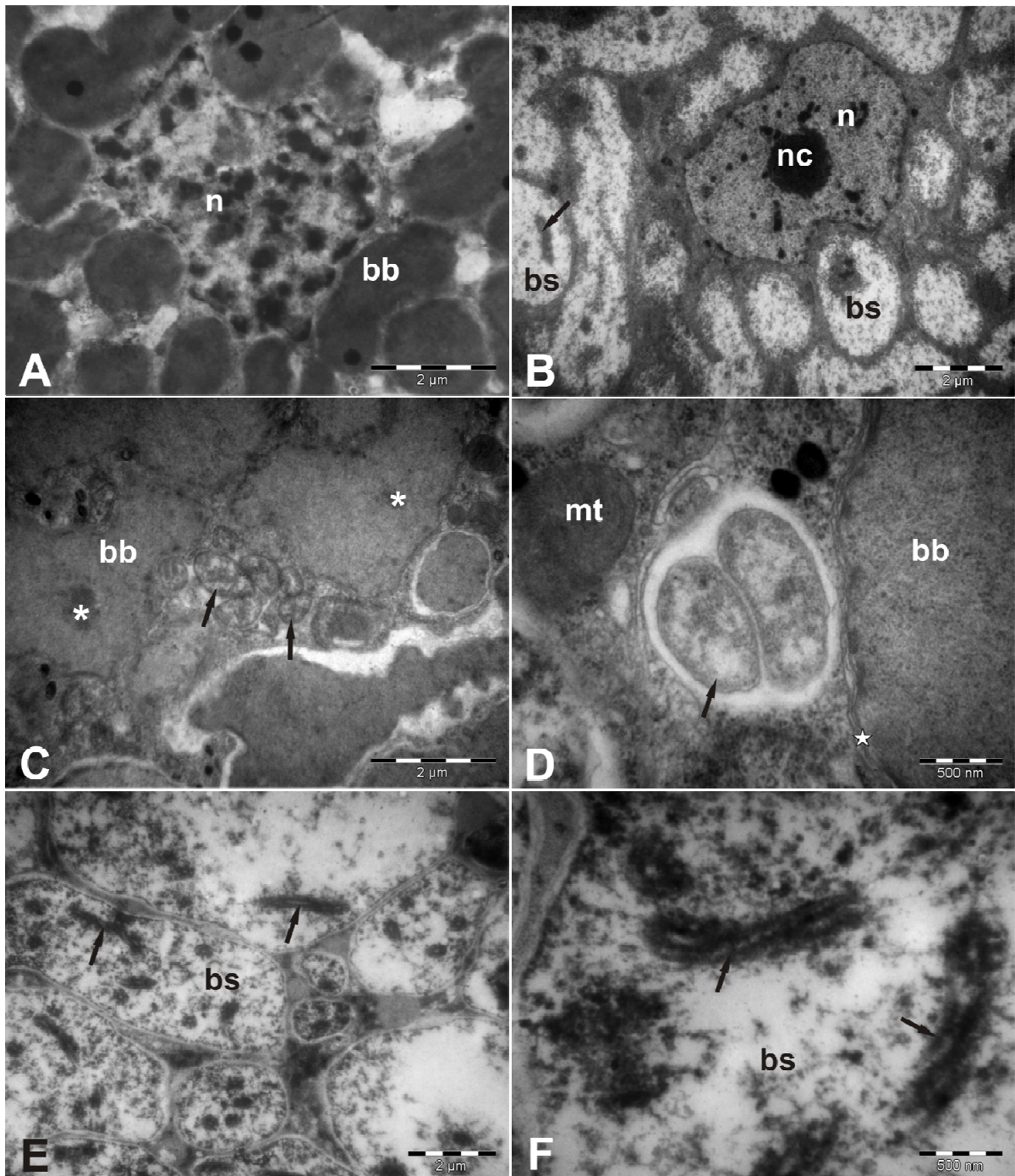


Figura 2 - Ultraestrutura de bacterioma de *D. citri*. A, vista parcial de bacteriócito, ilustrando núcleo (n) e citoplasma repleto de bactérias (bb); B, núcleo do sincício (n) com nucleólo conspícuo (nc) circundado por bactérias (bs); detalhe bactérias pelomórficas (bb), predominantes no bacteriócito, contendo inclusões citoplasmáticas (*), e bactérias semelhantes à rickettsias, observadas em menor número (→); D, detalhe bactérias (→) observadas entre os simbiossitos do bacteriócito (bb), próximas à mitocôndria (mt); E-F, bactérias do sincício (bs), com destaque para inclusões em formato de espiral (→)

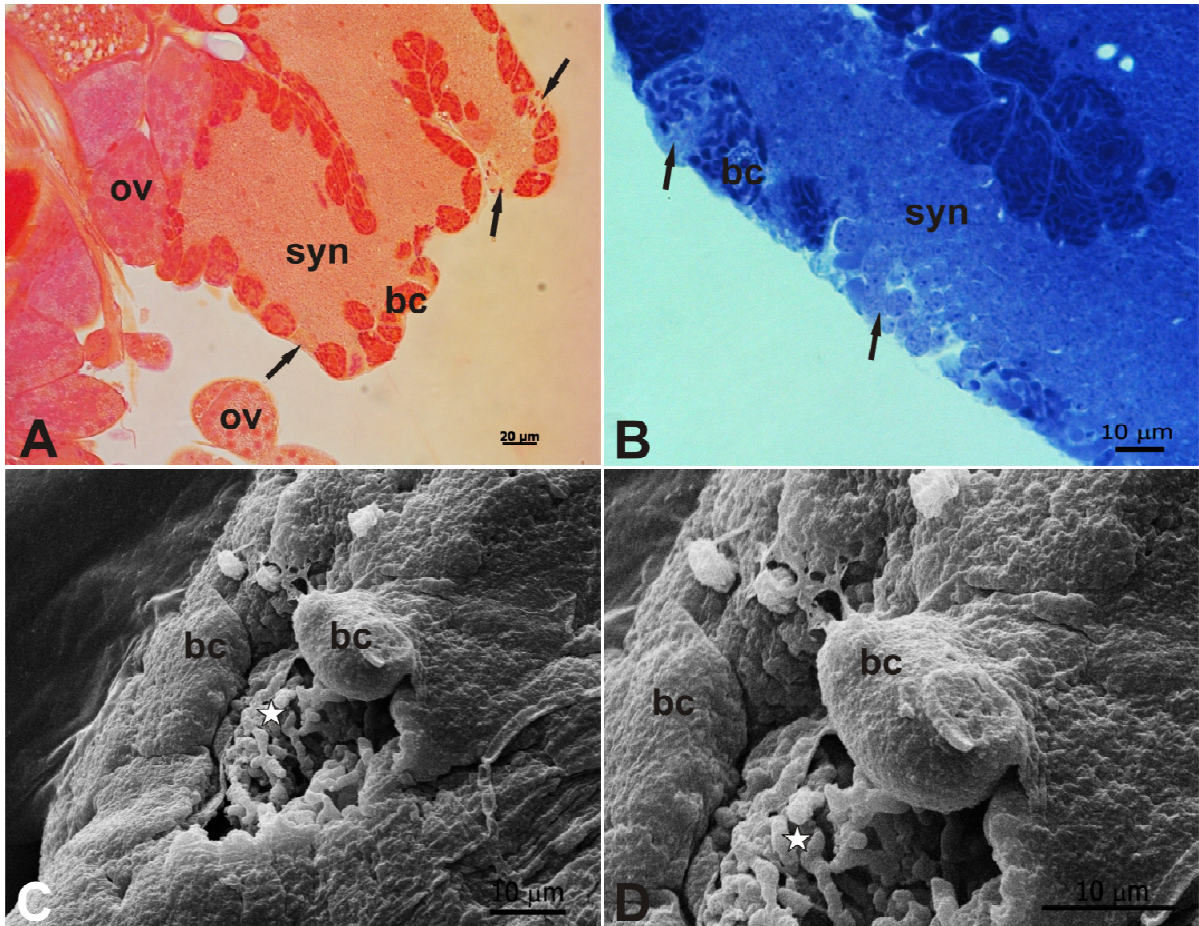


Figura 3 - Estrutura de bacterioma de *D. citri*. A-B, alterações observadas nos bacteriócitos (bc) produzindo falhas no revestimento (→) do bacterioma, permitindo, presumivelmente, a saída de bactérias, sincício (syn) e ovariolos (ov) em contato com o bacterioma; C-D, vist parcial de bacterioma, evidenciando falha no revestimento (★) decorrente da saída de bacteriócitos (bc)

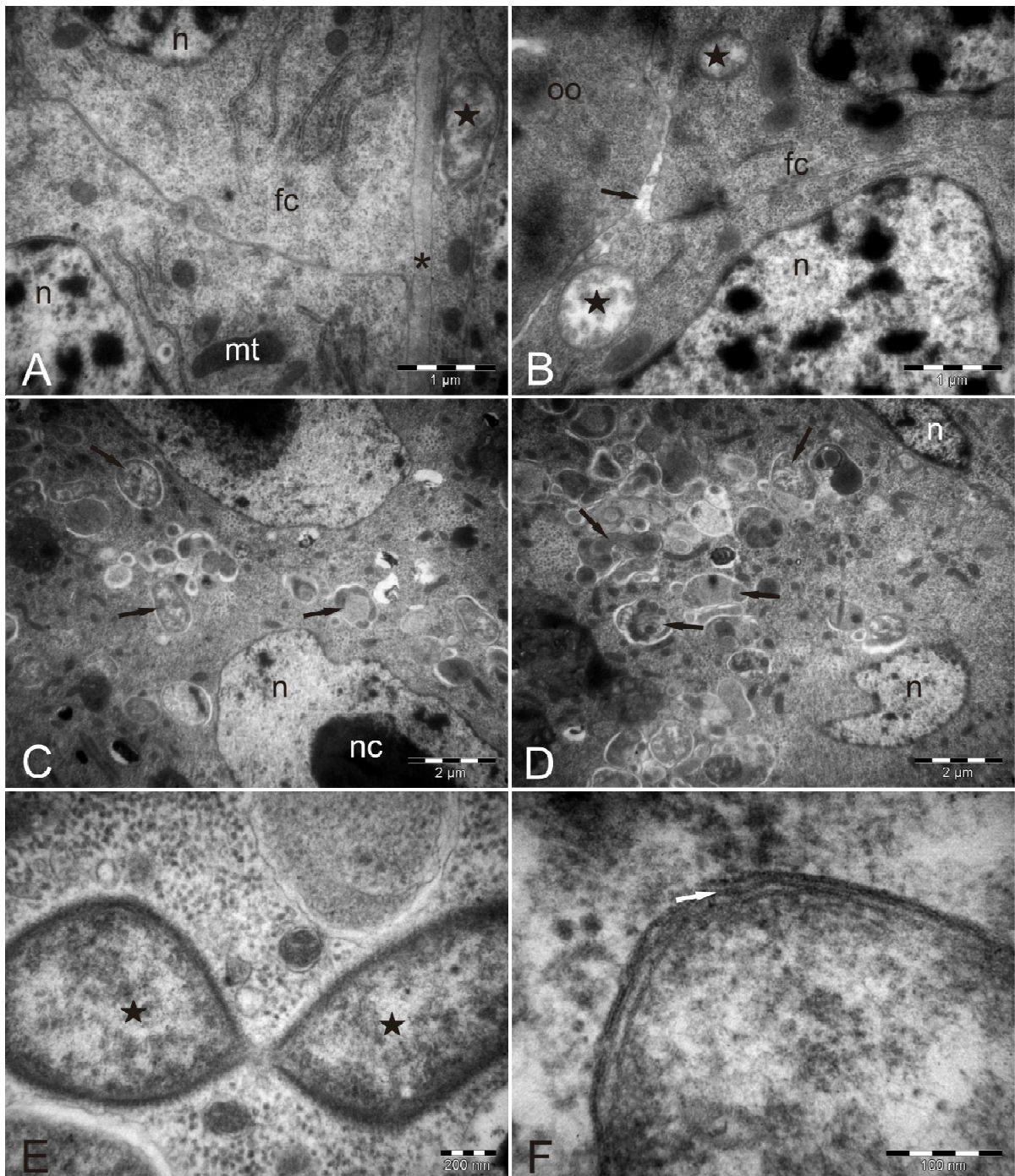


Figura 4 - Migração de simbioss em ovaríolos de *D. citri*. A-B, células foliculares (fc) revestindo oócito pré-vitelogênico (oo), apresentando núcleo (n) característico, mitoncôndria (mt) e bactérias migrando em direção ao oócito (★); C-D, trofário sincicial, mostrando núcleos (n) com nucléolos conspícuos (nc) e presença de bactérias (→) decorrentes de invasão de bacteriócito (não mostrado); E, detalhe de divisão de bactérias por fissão binária, e; F, vista parcial de bactéria, com destaque para aspecto trilaminar de membranas circundantes (→)

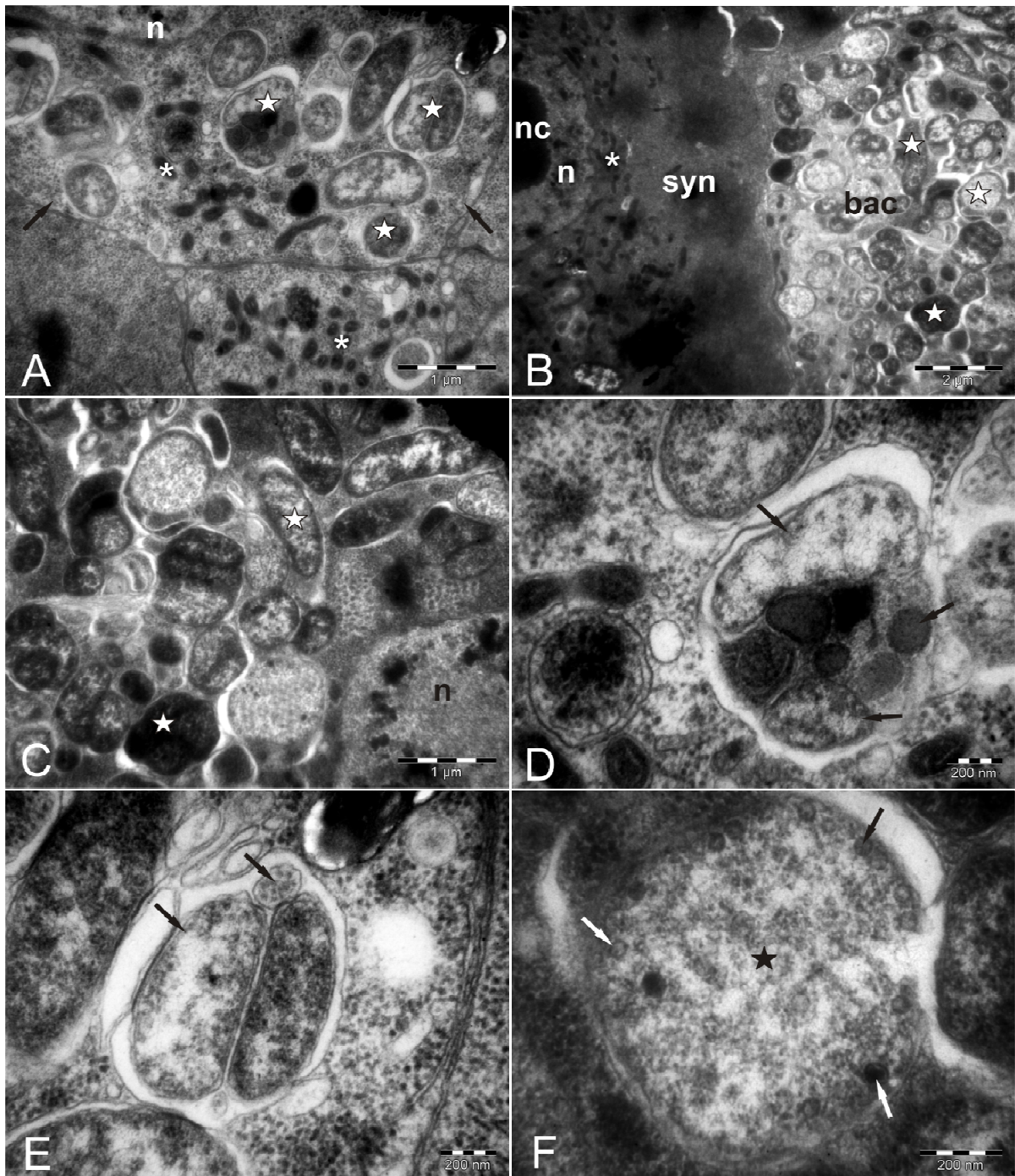


Figura 5 - Ultraestrutura de ovaríolo de *D. citri*. A, vista parcial de bacteriócito inserido entre as células de revestimento do trofário (→), evidenciando núcleo (n), mitocôndrias (*), bactérias (★); B, vista parcial de bacteriócito (bac) repleto de bactérias (★), posicionado na interface entre as células de revestimento (não mostradas) e o sincício (syn) de aspecto denso e contendo núcleo (n) com nucléolo volumoso (nc) e mitocôndrias (*); C-E, citoplasma de bacteriócito contido no trofário, mostrando núcleo do bacteriócito (n) e tipos de bactérias (★), com agrupamentos característicos (→); F, bactéria (★) contendo inclusões semelhantes a fagos (→)

A partir da penetração do bacteriócito pelo epitélio folicular, inicia-se a liberação de bactérias, as quais podem infectar células foliculares anexas ao bacteriócito, antes de atingirem o citoplasma do oócito. No trajeto percorrido pelas bactérias, ocorre um maior número de mitocôndrias, que nas áreas imediatas. A migração das bactérias, agora no citoplasma do oócito, é caracterizada pela ocorrência de agrupamentos de formato arredondado, os quais, freqüentemente, têm início com bactérias de morfologia semelhante; contudo, outros tipos podem aderir no decorrer do percurso. Os simbiontes migram para a região basal do oócito, próxima ao pedicelo do ovaríolo, formando uma massa bacteriana arredondada que possui um halo citoplasmático na periferia, separando a massa circular de simbiontes do restante do vitelo (Figura 7 e 8). O bacteriócito, agora vazio, permanece no oócito, sendo, presumivelmente, reabsorvido.

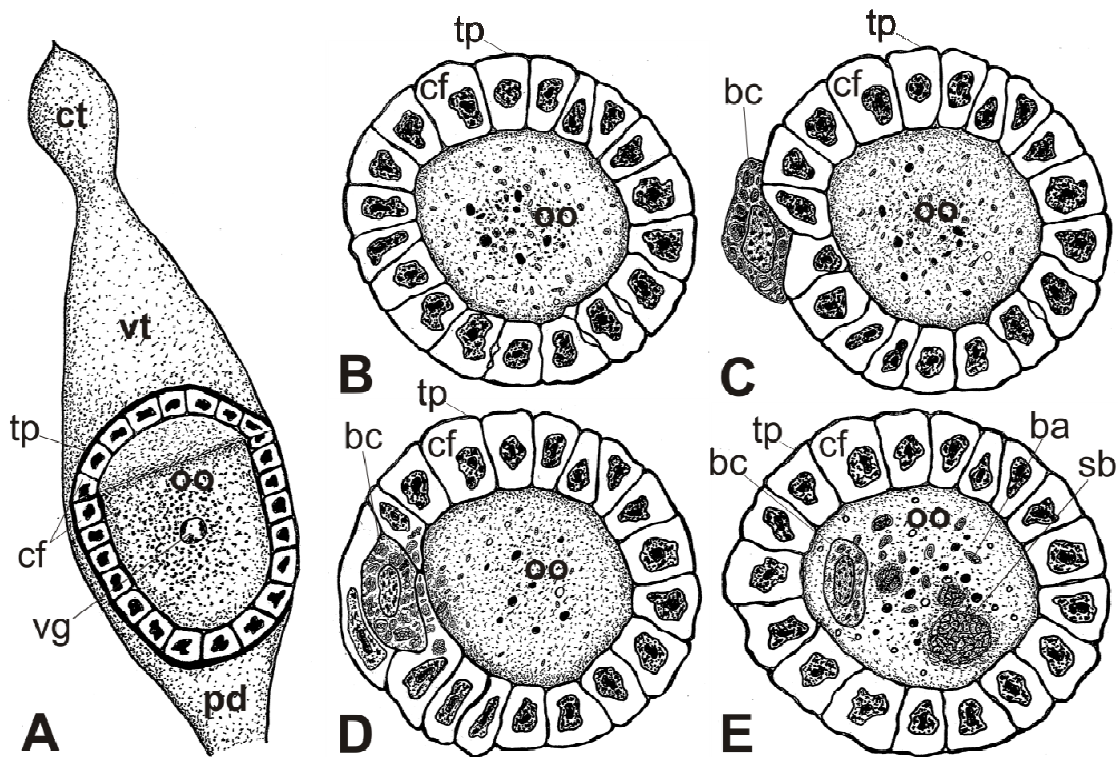


Figura 6 - Diagrama esquemático de ovaríolo de *D. citri* e a migração de bacteriócito para o oócito. A, ovaríolo ilustrando a câmara trófica (ct), vitelário (vt), em corte, destacando a *tunica propria* (tp), foliculares (cf), oócito (oo), vesícula germinal (vg), e pedicelo (pd) na base do ovaríolo. B-E, sequência de migração do bacteriócito (bc), através do epitélio folicular (fc), para o interior do oócito (oo), e a liberação de bactérias (ba), formando um aglomerado de simbiontes (sb) na região próxima ao pedicelo (pd)

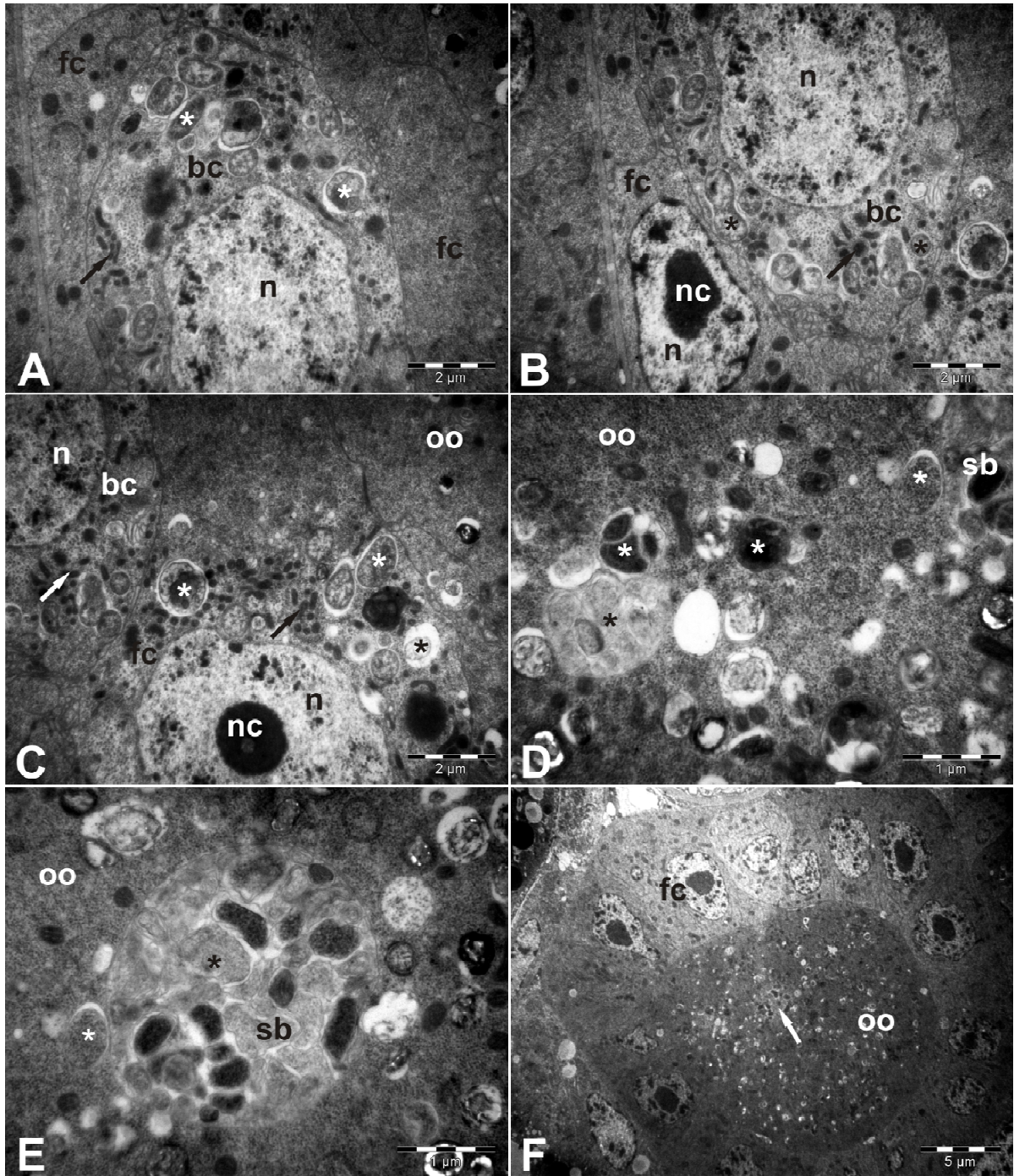


Figura 7 - Migração de bacteriócito para o oócito em ovaríolo vitelogênico de *D. citri*. A-B, bacteriócito (bc) invadindo epitélio folicular (fc) contendo muitas bactérias (*) e mitocôndrias (→); B-C, as quais são liberadas junto com as bactérias (*) que invadem o citoplasma das células foliculares (fc), de núcleo (n) e nucléolo (nc) volumosos, circunvizinhas antes de migrarem para região posterior do oócito (oo), E-F, formando um aglomerado de simbioses (sb, →)

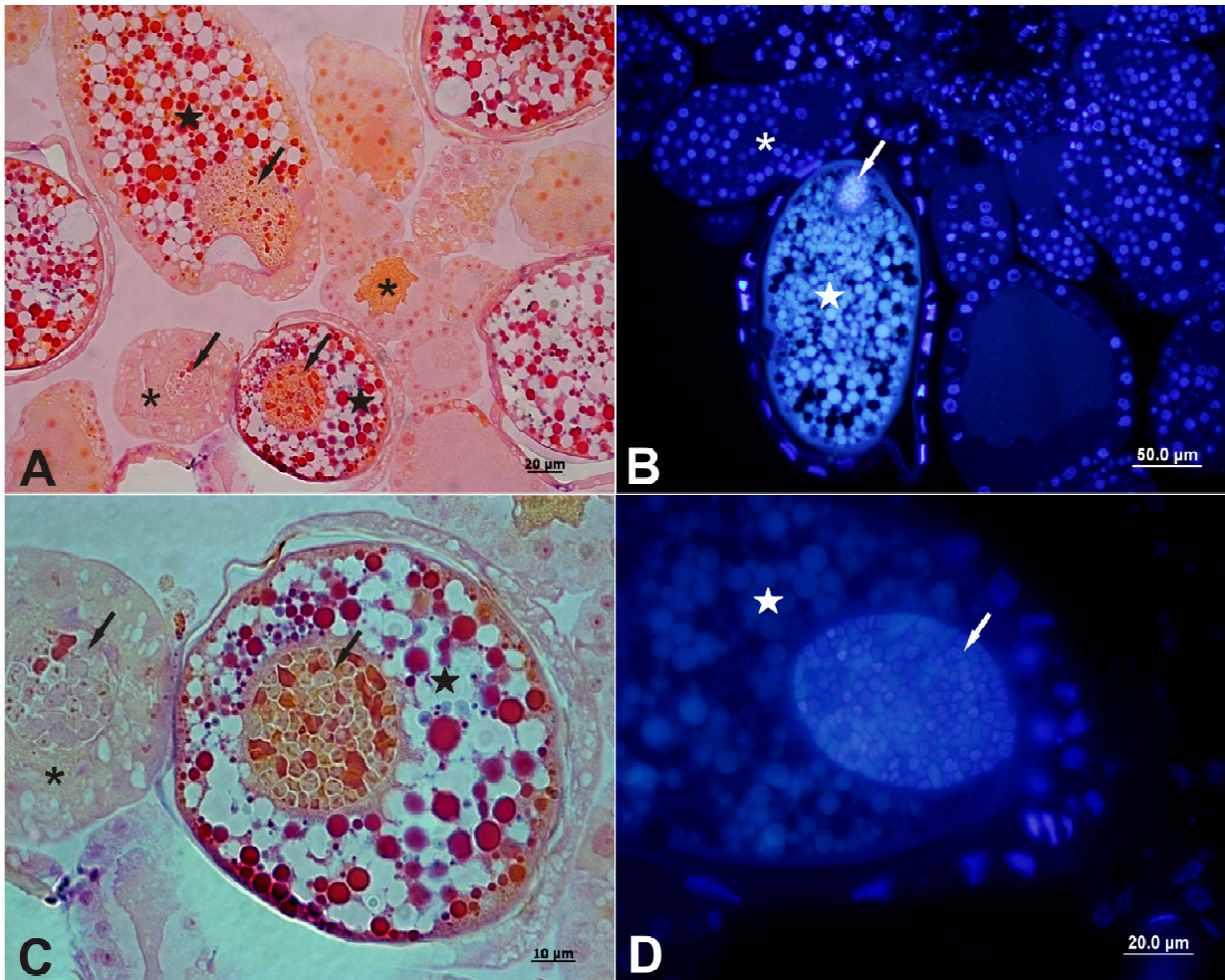


Figura 8 – Ovários de *D. citri*, contendo ovaríolos em diferentes etapas oogênicas. A-D, ovaríolos pré-vitelogênicos (*) e vitelogênicos (★) apresentando agrupamentos de microrganismos endossimbiontes, notar o arranjo circular (= “symbiont ball”) (→) e disposição do mesmo no polo posterior do oócito A-C, microscopia de luz, coloração Azan Heidenhain; B-D, microscopia de fluorescência, coloração DAPI.

3.5 Discussão

As interações inseto-simbionte são muito diversas, variando quanto ao tipo do próprio microrganismo, graus de codependência, localização, funções e distribuição no hospedeiro (RICHARDS; BROOKS, 1958; BUCHNER, 1965; MIRA; MORAN, 2002; BAUMANN, 2005). Vários grupos de insetos que exploram dieta nutricionalmente limitada ou deficiente, possuem microrganismos simbiotes que os suprem com os nutrientes deficientes em seu alimento natural, tais como aminoácidos e vitaminas. Esses simbiotes podem se alojarem em células especializadas que assumem distribuição particular nos diferentes grupos de insetos, podendo ocorrer junto ao epitélio intestinal (ZELAZOWSKA; BILINSKI, 1999; SAUER et al., 2002), aos ovaríolos (GOTTLIEB et al., 2006), dispersas no tecido adiposo (SACCHI et al., 2008) ou, mais frequentemente, agrupadas formando uma estrutura especializada, o bacterioma ou micetoma, o qual pode sofrer alterações ao longo da vida do hospedeiro (BUCHNER, 1965; CHEUNG; PURCELL, 1999; BAUMANN, 2005).

A arquitetura do bacterioma de *D. citri* é similar à estrutura geral descrita para outros psilídeos (FUKATSU; NIKOH, 1998; BAUMANN, 2005), exceto pela ausência de epitélio revestindo os bacteriócitos, função essa exercida pelos próprios bacteriócitos, que circundam o sincício. As bactérias presentes nos bacteriócitos de *D. citri* diferem morfológicamente daquelas localizadas no sincício do bacterioma, corroborando com o observado por Fukatsu e Nikoh (1998) e Subandaiyah et al. (2000). A ultraestrutura dos microrganismos presentes no bacterioma de *D. citri*, de forma geral, são semelhantes àqueles descritos para outros Sternorrhyncha (BAUMANN, 2005), como homópteros (GRIFFITHS; BECK, 1973; COSTA ET AL. 1995; BAUMANN, 2005).

A migração de simbiotes para os tecidos reprodutivos é fato comum no processo de transmissão transovariana, podendo ser induzida, segundo Eberle e McLean (1982) por fatores diversos, tais como hormônios ou outras substâncias decorrentes de condições fisiológicas específicas do ciclo de vida do hospedeiro, como nos períodos que antecedem a muda, em algumas espécies de insetos. As alterações morfológicas observadas no bacterioma de *D. citri* após o início do período de maturação dos ovaríolos sugerem uma provável presença de fatores indutores de resposta nos bacteriócitos. Eberle e McLean (1982) relataram a ocorrência de contrações peristálticas no bacterioma de *Pediculus humanus* (Ordem: Família), como um dos fatores iniciadores da liberação e migração de simbiotes do bacterioma. Fibras musculares

estriadas estão associadas ao bacterioma de *D. citri*, sugerindo uma possível facilitação, em função de contrações, do desprendimento de bacteriócitos e a liberação de bactérias através das falhas produzidas no revestimento do sincício, quando da saída dos bacteriócitos.

De modo geral, a migração de simbioses da hemocele para o oócito é realizada por microrganismos individualmente, após saírem de bacteriócitos (CHEUNG; PURCELL, 1999; ZELAZOWSKA; BILINSKI, 1999; FUKATSU; NIKOH, 2000; SACCHI et al., 2000, 2008) ou através do carreamento de microrganismos no interior de bacteriócitos até o oócito (COSTA; TOSCANO; HENNEBERRY, 1996; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001). Em *D. citri*, entretanto, as duas formas estão presentes, já que, embora em menor número, haja a invasão do trofário e vitelário por bactérias cocóides ou baciliformes, mesmo na ausência de bacteriócito no ovaríolo. Contudo, a principal via de infecção de oócitos em *D. citri* é através da migração de bacteriócitos intactos. Esse mecanismo ocorre de forma semelhante ao descrito em aleirodídeos, considerados por apresentar um mecanismo, até então, único em Sternorrhyncha para transmissão de simbioses (COSTA; TOSCANO; HENNEBERRY, 1996; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001, BAUMANN, 2005). Nesse processo, o bacteriócito migrante de *D. citri* possui aspecto ovalado, o núcleo apresenta cromatina dispersa e nucléolo inconspícuo. Além disso, o conteúdo bacteriano no citoplasma de bacteriócitos aderidos ao ovaríolo difere daquele observado nestas células quando no bacterioma, anteriormente à maturação dos ovaríolos. O bacteriócito verificado junto ao ovaríolo apresenta maior variabilidade de formas e agrupamentos de bactérias de formatos distintos, sugerindo alguma forma de reorganização desse conteúdo nos períodos que antecedem à migração. Em *D. citri*, somente oócitos em maturação a partir da etapa pré-vitelogênica são infectados pelos microrganismos simbioses, diferindo de *Scaphoideus titanus* (Ordem: Família), no qual microrganismos infectam oogônias nas fases imaturas do inseto (SACCHI et al., 2008), e da infecção tardia em oócitos coriogênicos de *Palaeococcus fuscipennis* (Ordem: Família) (SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006). Os bacteriócitos intactos, ao atingirem o ovaríolo de *D. citri*, aderem-se à *tunica propria*, normalmente na região látero-proximal, e deslocam, temporariamente, as células foliculares adjacentes, penetrando no oócito, de modo similar ao descrito por (COSTA; TOSCANO; HENNEBERRY, 1996; SZKLARZEWICZ; MOSKAL, 2001), em discordância aos demais Sternorrhyncha (FUKATSU; NIKOH, 2000; BAUMANN, 2005) e outros grupos em que ocorre a liberação de microrganismos antes da invasão do oócito (BUCHNER, 1965; ZELAZOWSKA; BILINSKI, 1999; SACCHI et

al., 2000; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006). Durante a fase de migração, ocasionalmente, bacteriócitos podem invadir a câmara trófica. Nesse caso, o motivo é desconhecido, já que não foram detectados microrganismos na região do cordão trófico, via provável de passagem para o oócito. Os fatores iniciadores, estimulantes e/ou direcionadores da migração de bacteriócitos aos ovariolos ainda são desconhecidos, sendo sugerida a ocorrência de gradientes químicos produzidos na região dos ovariolos, ou ainda, devido a possível fluxo de hemolinfa para a região das gônadas (EBERLE; McLEAN, 1982; SZKLARZEWICZ; KEDRA; NIZNIK, 2006).

3.6 Conclusões

Em *Diaphorina citri*, a migração de simbioses está relacionada ao início do ciclo oogênico, ocorrendo a invasão do oócito nas etapas de pré-vitelogênese e vitelogênese;

Bactérias podem invadir o ovariolo (vitelário e trofário) individualmente ou por meio do bacteriócito;

O bacteriócito é o principal veículo de migração de microrganismos simbioses em *D. citri*, e esse mecanismo é semelhante ao apresentado por aleirodídeos

No vitelário, a entrada de bacteriócito no oócito, através das células foliculares, ocorre pela região latero-basal, próxima ao pedicelo;

Ao final da vitelogênese os oócitos apresentam um agrupamento de bactérias (= “symbiont ball”) na região posterior, próxima ao pedicelo.

Referências

AKHTAR, S., van EMDEN, H.F. Ultrastructure of the symbionts and mycetocytes of bird cherry aphid (*Rhopalosiphum padi*). **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 26, p. 513-522, 1994.

AL-KHALIFA, M.S. The transovarial transmission of symbionts in the grain weevil, *Sitophilus granaries*. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, v. 44, p. 106-108, 1984.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.

- BAUMANN, P.; MORAN, N.A. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 72, p. 39-48, 1997.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G.; RODRIGUES, C.J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri: Ed. Manole, 2003. 331 p.
- BLOCHMANN, F. Bakterinähnliche Körperchen in den Geweben und Eiern. **Biologie Zentralbl**, Berlin, v. 7, p. 606-608, 1887.
- BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. John Wiley, New York, 909 p., 1965.
- CHEUNG, W.W.; PURCELL, A. Invasion of bacterioids and BEV bacterium into oocytes of the leafhopper *Euscelidius variegatus* Kirschbaum (Homoptera: Cicadellidae): and electron microscopic study. **Zoological Studies**, Tokyo, v. 38, n. 1, p. 69-75, 1999.
- COLD SPRINGER HARBOR PROTOCOLS. **Drosophila ringer's solution**. 2007. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/full/2007/7/pdb.rec10919>>. Acesso em: 21 nov. 2008.
- COSTA, H.S.; TOSCANO, N.C.; HENNEBERRY, T.J. Mycetocyte inclusion in the oocytes of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 89, n. 5, p. 694-699, 1996.
- COSTA, H.S.; WESTCOT, D.M.; ULLMAN, D.E.; ROSELL, R.; BROWN, J.K.; JOHNSON, M.W. Morphological variation in *Bemisia* endosymbionts. **Protoplasma**, Leipzig, v. 189, p. 194-202, 1995.
- DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect-microbial symbiosis: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 17-37, 1998.
- EBERLE, M.W.; McLEAN, D.L. Initiation and orientation of the symbiote migration in the human body louse *Pediculus humanus* L. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 28, n. 5, p. 417-422, 1982.
- FUKATSU, T.; NIKOH, N. Two intracellular symbiotic bacteria from the mulberry psyllid *Anomonoura mori* (Insecta, Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3599-3606, 1998.
- _____. Endosymbiotic microbiota of the bamboo pseudococcid *Antonina crawii* (Insecta, Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 2, p. 643-650, 2000.
- GOTTLIEB, Y.; GHANIM, M.; CHIEL, E.; GERLING, D.; PORTNOY, V.; STEINBERG, S.; TZURI, G.; HOROWITZ, A.R.; BELAUSOV, E.; MOZES-DAUBE, N.; KONTSEDALOW, S.; GERSHON, M.; GAL, S.; KATZIR, N.; ZCHORI-FEIN, E. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3646-3652, 2006.

GRIFFITHS, G.W.; BECK, S.D. Ultrastructure of the pea aphid mycetocytes: evidence for symbiote secretion. **Cell & Tissue Research**, Berlin, v. 159, p. 351-367, 1975.

GUTZEIT, H.O.; ZISSLER, D.; PERONDINI, A.L.P. Intracellular translocation of symbiotic bacteroids during de late oogenesis and early embryogenesis of *Bradysia tritici* (syn. *Sciara ocellaris*) (Diptera: Sciaridae). **Differentiation**, London, v. 29, p. 223-229, 1985.

MARTÍNEZ, I.M. Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa**, n. 30, p. 187-195, 2002. Disponível em: <<http://entomologia.rediris.es/aracnet/9/metodologias/tecnicas/index.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2008.

McFALL-NAGAI, M.J. Unseen forces: the influence of bacteria on animal development. **Developmental Biology**, New York, v. 242, p. 1-14, 2002.

MIRA, A.; MORAN, N.A. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 137-143, 2002.

MORAN, N., BAUMANN, P. Phylogenetics of inherited microorganisms of arthropods. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 9, p.15-20, 1994.

MORAN, N.A.; TELANG, A. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. **Bioscience**, Washington, v. 48, p. 295-304, 1998.

MORAN, N.; TRAN, P.; GERARDO, N.M. Symbiosis an insect diversification: and ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial Phylum Bacteroidetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8802-8810, 2005.

MORAN, N.A.; PLAGUE, G.R.; SANDSTROM, J.P.; WILCOX, J.L. A genomic perspective on nutrient provisioning by symbionts of insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, p. 14543-14548, 2003.

NAKABACHI, A.; YAMASHITA, A.; TOH, H.; ISHIKAWA, H.; DUNBAR, H.E.; MORAN, N.A.; HATTORI, M. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. **Science**, Washington, v. 314, n. 5797, p. 267, 2006.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.A.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem.; Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 131, p. 709-715, 2007

OVERMANN, J. **Molecular basis of symbiosis**. Berlin: Springer, 2006. 310 p.

PONTES, M.H.; DALE, C. Culture and manipulation of insect facultative symbionts. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 9, p. 406-412, 2006.

RICHARDS, A.G.; BROOKS, M.A. Internal symbiosis in insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 3, p. 37-55, 1958.

- SACCHI, L.; GRIGOLO, A.; LAUDANI, U.; RICEVUTI, G.; DAELESSI, F. Behavior of symbionts during oogenesis and early stages of development in the german cochroach, *Blattella germanica* (Blattodea). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 46, p. 139-152, 1985.
- SACCHI, L.; NALEPA, C.A.; LENZ, M.; BANDI, C.; CORONA, S.; GRIGOLO, A.; BIGLIARDI, E. Transovarial transmission of symbiotic bacteria in *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Mastotermitidae): Ultrastructural aspects and phylogenetic implications. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, n. 6, p. 1308-1313, 2000.
- SACCHI, L.; GENCHI, M.; CLEMENTI, E.; BIGLIARDI, E.; AVANZATI, A.M.; PAJORO, M.; NEGRI, I.; MARZORATI, M.; GONELLA, E.; ALMA, A.; DAFFONCHIO, D.; BANDI, C. Multiple symbiosis in the leafhopper *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae): Details of transovarial transmission of *Cardinium* sp. And yeast-like endosymbionts. **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 40, p. 231-242, 2008.
- SANDSTRÖM, J.; MORAN, N. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 91, p. 203-210, 1999.
- SAUER, C.; DUDACZEK, D.; HOLDOBLER, B.; GROSS, R. Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus* Blochmania floridanus" adults and larvae of the Carpenter ant *Camponotus floridanus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4187-4193, 2002.
- SPAULDING, A.W.; von DOHLEN, C.D. Phylogenetic characterization and molecular evolution of bacterial endosymbionts in psyllids (Hemiptera: Sternorrhyncha). **Molecular Biology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, p. 1506-1513, 1998.
- SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Sciences**, Tokyo, v. 17, p. 983-989, 2000.
- SZKLARZEWICZ, T., MOSKAL, A. Ultrastructure, distribution, and transmission of endosymbionts in the whitefly *Aleurochiton aceris* Modeer (Insecta, Hemiptera, Aleyrodinea). **Protoplasma**, Leipzig, v. 218, p. 45-53, 2001.
- SZKLARZEWICZ, T., KEDRA, K., NIZNIK, S. Ultrastructure and transovarial transmission of endosymbiotic microorganisms in *Palaeococcus fuscipennis* (Burmeister) (Insect, Hemiptera, Coccinea: Monophlebidae). **Folia Biologica**, Kraków, v. 54, p. 69-74, 2006.
- TAMAMES, J.; GIL, R.; LATORRE, A.; PERETÓ, J.; SILVA, F.J.; MOYA, A. The frontier between cell and organelle: genome analysis of *Candidatus* Carsonella ruddii. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 181, p. 1-7, 2007.
- THAO, M.L.; MORAN, N.A.; ABBOT, P.; BRENNAN, E.B.; BURCKHARDT, D.H.; BAUMANN, P. Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2898-2905, 2000.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Concord, v. 93, n.6, p. 1721-1725, 2000.

WAKU, Y.; ENDO, Y. Ultrastructure and life cycle of the symbionts in a homopteran insect, *Anomoneura mori* Schwartz (Psyllidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 22, p. 630-637, 1987.

WERREN, J.H. Biology of Wolbachia. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 42, p. 587-609, 1997.

ZCHORI-FEIN, E.; BROWN, J.K. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 95, n. 6, p. 711-718, 2002.

ZELAZOWSKA, M.; BILINSKI, S.M. Distribution and transmission of endosymbiotic microorganisms in the oocytes of the pig louse, *Haematopinus suis* (L.) (Insecta: Phthraptera). **Protoplasma**, Leipzig, v. 209, p. 207-213, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)