

JULIANA KAFKA BILHA

MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS DE *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae), DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Maringá, 2008.

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA KAFKA BILHA

MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS DE *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera:  
Crambidae), DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO.

Professor Doutor Hélio Conte

Orientador

Professora Doutora Rose Meire Costa Brancalhão

Co-Orientadora

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B595m	<p>Bilha, Juliana Kafka</p> <p>Morfologia dos testículos de <i>Diatraea saccharalis</i> F. (Lepidoptera: Crambidae), durante o desenvolvimento pós-embrionário / Juliana Kafka Bilha. -- Maringá : [s.n.], 2008.</p> <p>36 f. : figs.</p> <p>Orientador: Profº Drº Hélio Conte. Co-orientadora: Profª Drª Rose Meire Costa Brancalhão. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2008.</p> <p>1. <i>Diatraea saccharalis</i> F. - Testículo - Anatomia 2. <i>Diatraea saccharalis</i> F. - Testículo - Histologia. 3. <i>Diatraea saccharalis</i> F. - Desenvolvimento pós-embrionário. 4. Testículo - Lepidóptera. 5. Broca-da-cana-de-açúcar. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. II. Título.</p> <p>CDD 21.ed. 595.78</p>
-------	--

## BIOGRAFIA

Juliana Kafka Bilha nasceu em Catanduvas/PR em 10/01/1982. Possui Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Extensão Santa Helena, onde realizou estágio e pesquisas com citopatologia do Bicho-da-Seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). É pós-graduanda do Programa de Mestrado em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá, onde realizou pesquisas sobre a morfologia dos testículos da Broca da Cana-de-Açúcar *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae).

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças sempre, principalmente nos momentos em que eu quis desistir de tudo e voltar para casa. Sem essa força eu não teria chegado até aqui.

À Universidade Estadual de Maringá, à Universidade Estadual do Oeste do Paraná e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pelo fornecimento da bolsa de estudos;

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular;

Ao Professor Doutor Hélio Conte, pela orientação e auxílio na realização e elaboração de todo o trabalho;

À Professora Doutora Rose Meire Costa Brancalhão pela ajuda e orientação na parte prática e teórica do experimento;

Ao Professor Doutor Celso Nakamura pela utilização do Microscópio Eletrônica de Varredura;

Aos amigos Jocicléia, Carla, Dani, Fernando (Trecó), Tati, Antonio, Amanda, Mic e Milene;

Aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio de sempre em todos os meus sonhos e projetos;

Ao meu noivo, Sandonaid, por me ajudar a ser uma pessoa mais otimista e a acreditar mais em mim mesma!

### Canção Mínima

No mistério do sem-fim  
equilibra-se um planeta

E, no planeta, um jardim,  
e, no jardim, um canteiro;  
no canteiro uma violeta,  
e, sobre ela, o dia inteiro,

entre o planeta e o sem-fim  
a asa de uma borboleta

Cecília Meireles

## APRESENTAÇÃO

Em consonância com a resolução n.07/2007 - CPBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá, esta dissertação de Mestrado é composta por um artigo científico, redigido de acordo com as normas exigidas pela revista científica que será publicado, assim sendo:

Diferenciações anatômicas e histológicas dos testículos de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae), durante o desenvolvimento pós-embrionário.

J.K. Bilha<sup>1</sup>, R.M.C. Brancalhão<sup>2</sup> e H. Conte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil; <sup>2</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

Este artigo será submetido à apreciação do corpo Editorial da Revista *Arthropod Structure & Development* (ISSN 1467-8039) (F1: 2,033) (Qualis.A).

Nesta dissertação são relatadas, durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae), as diferenciações anatômicas quanto à localização, tamanho, formato e coloração dos testículos e as diferenciações histológicas dos epitélios de revestimento com relação ao formato das células, a presença de grânulos no citoplasma e o formato dos núcleos. Estas observações feitas através de Microscopia de Luz e Eletrônica de Varredura são descritas pela primeira vez.

## RESUMO GERAL

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é um inseto holometábolo de grande importância econômica. As larvas se alimentam do colmo de gramíneas como arroz, milho e, principalmente, cana-de-açúcar, causando sérios prejuízos à indústria sucroalcooleira. O ciclo de vida do inseto dura cerca de 58 a 70 dias. E, após a cópula a fêmea deposita seus ovos, cerca de 500, nas folhas da cana-de-açúcar e as larvas que eclodem dos ovos alimentam-se inicialmente destas folhas e, a seguir, penetram no caule através da gema e passam a se alimentar do colmo. À medida que se alimentam, as larvas vão formando galerias longitudinais ou transversais, que podem causar o tombamento das plantas novas ou a diminuição da concentração de sacarose em plantas mais velhas. Após cerca de 40 dias se alimentando, as larvas fazem um casulo com pedaços de folhas dentro de uma das galerias formadas e transformam-se em pupas. Este estágio que dura cerca de 14 dias é quando o inseto passa pela metamorfose completa originando os insetos adultos que são chamados de mariposas. A função dos adultos é apenas reprodutiva e após a cópula os insetos morrem. Informações a respeito da morfologia e da fisiologia destes insetos são de extrema importância para entender mecanismos que visem o controle desta praga e também para estudos comparativos entre as espécies de Lepidoptera. Para tanto, este estudo enfatizou os testículos de *Diatraea saccharalis*. Desta forma, os testículos de Lepidoptera no estágio larval são estruturas pares localizadas próximas ao vaso central no quinto segmento abdominal. Em algumas espécies eles permanecem separados no estágio adulto, entretanto, em outras sofrem fusão durante o final do estágio larval ou início do estágio pupal, dando origem a uma estrutura única. Vários são os estudos morfológicos neste órgão, com destaque para a espermatogênese, a ultraestrutura de espermatozoides apirene e eupirene, a detecção de tubulinas e a caracterização de proteínas em espermátides e espermatozoides. No presente estudo, realizamos a descrição anatômica e histológica dos testículos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), nos estágios de larva, pupa e adulto. Na

realização do trabalho, larvas (2º ao 5º instares), pré-pupas, pupas e adultos machos de *D. saccharalis*, fornecidos pelo laboratório do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, foram dissecados pela região ventral, utilizando-se microscópio estereoscópico expondo-se os testículos. Para as descrições anatômicas estes órgãos foram retirados e submetidos à preparação e montagem total, corados com verde-luz e azul de toluidina. Ainda para as descrições anatômicas, os testículos foram fixados em Bouin, desidratados em ponto crítico e metalizados com ouro para observação em microscópio eletrônico de varredura. Nos estudos histológicos em microscopia de luz, os testículos foram fixados em Bouin por 12-24 horas e submetidos às técnicas histológicas de rotina, sendo corados pela Hematoxilina e Eosina (H/E) modificada e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Os resultados mostraram que os testículos de *D. saccharalis*, como na maioria dos Lepidoptera, são órgãos pares que sofrem modificações anatômicas durante o desenvolvimento pós-embriônico, ocorrendo fusão no estágio de pupa, de forma que em adultos é observada a presença de um único testículo. Estes órgãos são envoltos por um epitélio de revestimento externo e um epitélio de revestimento interno, que ao longo do desenvolvimento pós-embriônico sofrem modificações morfológicas. Separando externamente os testículos da hemolinfa e revestindo-os internamente, observa-se a presença de uma membrana basal. Os testículos possuem câmaras denominadas folículos testiculares que são revestidos por projeções do epitélio de revestimento interno. No lúmen dos folículos testiculares são observadas quatro regiões: o germário que contém espermatogônias e uma célula apical; a zona de crescimento que contém cistos de espermatócitos, a zona de maturação que contém cistos de espermátides e a zona de transformação que contém cistos de espermatozóides. Quando comparados com outros Lepidoptera, embora a anatomia e histologia demonstrem algumas semelhanças, concluímos que nos testículos de *D. saccharalis* existem diferenças quanto à localização; tamanho, formato e número de folículos testiculares. Nos epitélios de revestimento também observamos modificações na morfologia das células, dos núcleos e grânulos presentes no citoplasma. Desta forma, trabalhos futuros a respeito da

ultraestrutura dos testículos e da espermatogênese poderão ampliar o entendimento a respeito do sistema reprodutor masculino ao longo do desenvolvimento pós-embriônico de *D. saccharalis*.

## GENERAL ABSTRACT

The drill of the borer sugar of cane, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) is an insect holometabolo of great economic importance. The larvae if feed of rice, maize and, mainly, sugar of cane, causing serious damages to the sugar and alcohol industry. The cycle of life of the insect last about 58 the 70 days. After copula the female deposits its eggs, in leves of the sugar of cane and the larvae that come out of eggs feed themselves initially of these leves and, to follow, they penetrate in caule through the yolk and pass if to feed of colmo. To the measure that if they feed, the larvae go forming longitudinal or transversal galleries, that can cause the falling of the new plants or the reduction of the concentration of sacarose in older plants. After about 40 days if feeding, the larvae make a casulo with leaf inside of one of the formed galleries and changed themselves into pupae. This period last about 14 days is when the insect passes for the complete metamorphosis originating the adult insects that are called moth. The function of the adults is only reproductive and after copula the insects die. Information the morphology and of the physiology of these insects are of extreme importance to understand mechanisms the control of this insect and for comparative studies between the species of Lepidoptera. Thus, this study it emphasized the testes of *Diatraea saccharalis*. Lepidoptera testes during the larval stage are paired structures lying next to the central vase in the 5<sup>th</sup> abdominal segment. In some species they remain separate also during the adult stage. However, in others they fuse at the end of the larvae stage or at the start of the pupae stage. A single structure results in this case. Several morphologic studies exist with special note on spermatogenesis, on ultrastructure of spermatozoa apyrene and eupyrene, on the detection of tubulins and on protein characterization in spermatids and spermatozoa. Anatomical and morphological descriptions of the testes of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in the larva, pupae and adult stages were undertaken. Larvae from the 2<sup>nd</sup> to the 5<sup>th</sup> instar, pre-pupae, pupae and male adults of *Diatraea saccharalis* from the laboratory of the Department of Cell Biology and Genetics of the State University of Maringa, were dissected on the ventral region by stereoscopic microscope and testes exposed. Organs were removed, prepared, completely assembled, stained with green light and blue toluidine for anatomical description. Testes were fixed in Bouin solution, dehydrated at apex and metallized in gold for analysis by scanning electronic microscope. In the case of morphological studies by light microscopy the testes were fixed in Bouin solution for 12-24h and underwent routine histological techniques. They were stained by modified hematoxylin-eosin (H/E) and Periodic Acid-Schiff (PAS). Results show that *D. saccharalis* testes, as in most Lepidoptera, are paired organs that undergo anatomical changes during the postembryonic development. Fusion occurs in the pupae stage and the presence of a single testis is vouchsafed in adults. Organs are surrounded by internal and external epithelium sheat which are morphologically modified during the postembryonic development. Basement membrane may be observed when the testes of the hemolymph are externally separated and internally

coated. Testes are provided with chambers called testicular follicles, which are coated by projections of the internal epithelium sheat. Four regions may be observed in the lumen of the testicular follicles: the germarium with spermatogones and an apical cell; the growth zone with spermatocyte cysts; the maturation zone with spermatid cysts; the transformation zone with spermatozoa cysts. Although their anatomy and morphology seem to be similar when compared to other Lepidoptera, results show that differences, such as site, size, shape, color and number of testicular follicles, exist in the testes of *D. saccharalis*. Changes in cell and nuclei morphology, besides granules in the cytoplasm, have been reported. Future investigations in the ultrastructure of testes and spermatogenesis may deepen knowledge on the male reproduction system during the postembryonic development of *D. saccharalis*.

Diferenciações anatômicas e histológicas dos testículos de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera; Crambidae), durante o desenvolvimento pós-embrionário

J.K. Bilha<sup>1</sup>, R.M.C. Brancalhão<sup>2</sup> e H. Conte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil; <sup>2</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

**Abstract:**

Testes of *Diatraea saccharalis* were subjected to total assembly and processed by scanning electron microscopy for anatomy description, and to histological processing for histological description during postembryonic development. This pair organ suffers fusion during pupae stage (chrysalis), differing from some Lepidoptera species as regards localization, size, form and coloration. The testes are involved by two epithelium sheath that alter their morphology along postembryonic development. One basement membrane separates testes from hemolymph and another separates testes from follicular lumen. The external epithelium sheath is formed by two layers of cells and the quantity of layers differs in some Lepidoptera species. The internal epithelium sheath presents one layer of cells and the follicles are covered by projections of this epithelium. The cytoplasm from the epithelial cells contains glycogen granules, also observed in others Lepidoptera. In the larval stage, four testicular follicles are present, and, in the adult stage, the number is variable. Despite the observed differences, anatomical and histological general patterns are very similar to those described in others

Lepidoptera, and the diverging characteristics may be important for phylogenetics and taxonomics studies in this order.

**Key words:** Male reproductive system, postembryonic, testes, Lepidoptera.

**Resumo:**

Testículos de *Diatraea saccharalis* foram submetidos à montagem total e processados em microscopia eletrônica de varredura para descrição da anatomia e ao processamento histológico para descrição histológica durante o desenvolvimento pós-embrionário. Este órgão par sofre fusão no estágio de pupa, diferindo em algumas espécies de Lepidoptera quanto à localização, tamanho, formato e coloração. Os testículos são envoltos por dois epitélios de revestimento que se modificam morfológicamente ao longo do desenvolvimento pós-embrionário. Uma membrana basal separa os testículos da hemolinfa e outra o separa do lúmen folicular. O epitélio de revestimento externo é formado por duas camadas de células e a quantidade de camadas difere em algumas espécies de Lepidoptera. O epitélio de revestimento interno apresenta uma camada de células e os folículos são revestidos por projeções deste epitélio. O citoplasma das células epiteliais contém grânulos de glicogênio, também observados em outros Lepidoptera. No estágio larval estão presentes quatro folículos testiculares e, no estágio adulto, o número se apresenta variável. Apesar das diferenças observadas, o padrão geral anatômico e histológico é muito semelhante ao descrito em outros Lepidoptera, e as características divergentes podem ser importantes para estudos filogenéticos e taxonômicos nesta ordem.

J.K. Bilha, Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. E-mail: [jukafkabio@hotmail.com](mailto:jukafkabio@hotmail.com)

**Palavras Chave:** Sistema reprodutor masculino, pós-embriônico, testículos, Lepidoptera.

### Introdução

Os testículos em Lepidoptera no estágio larval são estruturas pares localizadas próximas ao vaso central no quinto segmento abdominal (Eaton, 1988). Em algumas espécies eles permanecem separados no estágio adulto (King e Akai, 1982), em outras, entretanto, sofrem fusão como em *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (Meola e Loeb, 1995), *Manduca sexta* (Lepidoptera: Shingidae) (Reinecke *et al.*, 1983) e *Calpodex ethlius* (Lepidoptera: Hesperidae) (Lai-Fook, 1982), e originam uma única estrutura (Phillips, 1970; King e Akai, 1982).

Esta fusão ocorre durante o final do estágio larval e início do estágio pupal, coincidindo com uma elevada produção do hormônio protoracicotrópico (Nijhout e Williams, 1974). A espermatogênese também é estimulada através da secreção dos hormônios ecdisteróides (Wagner *et al.*, 1997; Happ, 1992).

Aspectos morfológicos dos órgãos do sistema reprodutor masculino, em especial os testículos, têm sido amplamente estudados em Lepidoptera. No entanto, a grande maioria dos trabalhos refere-se somente a um dos estágios de desenvolvimento principalmente o adulto, onde todas as fases da espermatogênese são observadas. Estudos mais aprofundados destacam a espermatogênese, em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Polanska *et al.*, 2005) e *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) (Mancini e Dolder, 2004a), a ultraestrutura de espermatozoides apirene e eupirene (Mancini e Dolder,

2001), a detecção de tubulinas (Mancini *et al.*, 2005) e a caracterização de proteínas em espermátides e espermatozóides (Mancini e Dolder, 2004b).

Variações morfológicas nas estruturas reprodutivas em machos de algumas ordens de insetos são tão acentuadas que podem levar a estudos filogenéticos e taxonômicos (Quicke *et al.*, 1992). Portanto, neste trabalho são descritas e ilustradas pela primeira vez as diferenças anatômicas e histológicas observadas durante o desenvolvimento pós-embrionário, nos testículos da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae).

### **Material e Métodos**

O material biológico utilizado foram larvas de 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> instares, pré-pupas, pupas e adultos machos de *D. saccharalis*. Os insetos foram fornecidos pelo laboratório do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, onde são mantidos em sala de criação, à temperatura controlada de 25°C±1°C e umidade de 70±10% em câmara com fotoperíodo de 12 horas, alimentados com dieta artificial (Hensley e Hammond, 1968).

Para os estudos anatômicos, aproximadamente 50 larvas, 50 pré-pupas, 50 pupas e 50 adultos machos, foram anestesiados com vapor de éter, transferidos para placa de Petri, e dissecados pela região ventral em solução salina para insetos (7,5 gr de NaCl; 2,38 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,72 gr de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O destilada em 1.000 mL) em Microscópio Estereoscópico Zeiss. Após a remoção do tecido gorduroso, tubo digestório e liberação das traquéias, os testículos foram identificados, corados sobre o próprio inseto com verde-luz e azul de toluidina, e submetidos à preparação em montagem total sobre lâmina de vidro. (Chen 1984;

Martinez 2002). Em seguida, foram feitas as documentações fotográficas com máquina digital Sony Cyber-Shot.

Em continuidade aos estudos anatômicos aproximadamente 20 testículos de larvas, 20 de pré-pupas, 20 de pupas e 20 testículos de adultos foram preparados para microscopia eletrônica de varredura (Rigoni *et al.*, 2004). Para fixação foi testado o fixador de microscopia de luz Bouin por 24 horas, e a seguir os testículos foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcoois (70% a 100%), e levados ao ponto crítico Baltec CPD/030. Após metalização, com uma camada de 10nm de ouro em pó, os espécimes foram examinados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu SS-550 da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR/Brasil.

Para análises histológicas em microscopia de luz, 80 testículos foram retirados de larvas, pré-pupas, pupas e adultos machos, e fixados em Bouin por 12 horas. Em seguida, os órgãos foram lavados em álcool 70%, desidratados em série crescente de soluções alcoólicas, diafanizados, e incluídos em parafina histológica (Junqueira e Carneiro, 2008). Cortes histológicos seriados de 5  $\mu$ m, longitudinais, foram efetuados em micrótomo Olympus CUT 4055, depositados sobre lâminas de vidro e, após a retirada da parafina e reidratação em álcoois, foram corados com Hematoxilina e Eosina (H/E) modificada (Pearse, 1972) e com Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Junqueira e Carneiro, 2008). O laminário foi analisado em microscópio de luz Olympus CBA e fotomicrografado com máquina digital Sony Cyber-Shot.

## Resultados

### 1. Anatomia

As análises anatômicas em preparado total e microscopia eletrônica de varredura mostram que durante o desenvolvimento pós-embrionário de *D. saccharalis*, os testículos sofrem modificações relacionadas ao formato, ao tamanho e ao número de folículos testiculares. (**Tab. 01; Figs. 1e 2**).

Na fase larval foram observados dois testículos localizados na região dorsal, no quinto segmento abdominal, próximos à linha mediana e dispostos um de cada lado do corpo do inseto. Apresentam formato reniforme, coloração esbranquiçada, e são aerados por traquéias provenientes do quinto espiráculo abdominal (**Tab. 01; Figs. 1A e 2A**).

Em pré-pupas os testículos estão muito próximos um do outro, no entanto a fusão ainda não foi iniciada. Possuem formato oval, coloração esbranquiçada e apresentam um aumento significativo no tamanho em relação às larvas (**Tab. 01; Figs. 1B e 2B**). A fusão só inicia-se em pupas jovens (**Tab. 01; Figs. 1C e 2C**).

Em pupas de idades mais avançadas e nos insetos adultos é observado apenas um testículo com formato esférico e coloração esbranquiçada, e a localização permanece sem alterações (**Tab. 01; Figs. 1D e 2D**). Macroscopicamente também podem ser observados os outros órgãos que compõem o sistema reprodutor masculino (vasos deferentes, vesícula seminal, glândulas acessórias e ducto ejaculador) (**Fig. 1D**).

### 2. Histologia

As análises histológicas em microscopia de luz revelam que morfologicamente os testículos são envoltos por um epitélio de revestimento

externo, voltado para a hemocele, e um epitélio de revestimento interno, voltado para o lúmen, que sofrem modificações ao longo dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário (**Tab. 01; Figs. 3C, 3D, 4B, 5A, 5B e 5C**). Na interface entre o epitélio de revestimento externo e a hemolinfa verifica-se a presença de uma estrutura acelular, de reação positiva ao método de PAS, a membrana basal, que também está presente entre o epitélio de revestimento interno e o lúmen (**Tab. 01; Figs. 4A e 4B**).

Nas larvas, o epitélio de revestimento externo é composto por duas camadas de células pequenas e arredondadas. A porção basal da célula apresenta grande quantidade de grânulos e cora pouco em eosina. Os núcleos são arredondados e apresentam granulações (**Tab. 01; Figs. 4C e 4D**). Traqueíolas penetram neste epitélio e um tecido gorduroso é observado adjacente à sua superfície (**Tab. 01; Figs. 3D e 2A**).

Em pré-pupas, e a seguir nas pupas jovens quando a fusão dos testículos foi iniciada, o epitélio de revestimento externo apresenta-se constituído de quatro camadas de células, cuja morfologia se mantém arredondada (**Tab. 01; Fig. 4B**). Na porção basal da célula verifica-se uma pequena quantidade de grânulos fracamente eosinófilos. Os núcleos permanecem arredondados e, da mesma forma que em larvas, traqueíolas penetram no epitélio, cuja superfície apresenta grande quantidade de tecido gorduroso e hemócitos (**Tab. 01; Figs. 2C, 3C e 5D**).

Em pupas velhas e em adultos, o epitélio de revestimento externo é constituído de uma única camada de células achatadas e núcleos achatados (**Tab. 01; Fig. 4D**). A porção basal da célula permanece com pouca quantidade de

grânulos como durante a fusão apresentando traqueíolas e tecido gorduroso (**Tab. 01; Fig. 2D**).

O epitélio de revestimento interno é constituído, em todos os estágios de desenvolvimento do inseto, por uma única camada de células grandes e achatadas (**Tab. 01; Figs. 3C e 3D**), cujo citoplasma apresenta grânulos PAS positivos (**Tab. 01; Fig. 4B**). Os núcleos acompanham a morfologia achatada das células (**Tab. 01**).

Os testículos são compostos de folículos testiculares, os quais variam em número conforme o estágio de desenvolvimento: quatro em larvas e pré-pupas, oito durante a fusão em pupas jovens, e um número variável em pupas velhas e adultos, geralmente mais que oito (**Tab. 01**). Os folículos são delimitados por projeções do epitélio de revestimento interno, os septos foliculares (**Figs. 3D, 4A, 4C e 4D**).

Em larvas e pré-pupas, os septos foliculares possuem células e núcleos achatados, cujo citoplasma apresenta grande quantidade de grânulos (**Tab. 01; Fig. 4A**). Durante a fusão as células permanecem achatadas, mas são maiores que nos estágios anteriores (**Tab. 01**). O citoplasma continua apresentando grande quantidade de grânulos em toda sua extensão (**Tab. 01; Fig. 4C**). Em pupas velhas e nos insetos adultos, as células são semelhantes às de pupas jovens, e ainda é observada grande quantidade de grânulos em toda extensão do citoplasma destacando-se em adultos o citoplasma mais eosinófilo (**Tab. 01; Fig. 4D**).

No lúmen dos folículos testiculares estão dispostas as células germinativas, ordenadas conforme a fase do desenvolvimento em que se encontram, originando

regiões distintas. Na região apical ou germário, estão dispostas as espermatogônias, caracterizadas por células pequenas com pouco citoplasma e núcleos esféricos (**Figs. 3A, 3B, 3C, 4A e 4B**), que circundam a célula apical, a qual apresenta prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 3B**). Logo abaixo, é observada a zona de crescimento, onde as espermatogônias encontram-se dentro de cistos e sofrem mitose originando espermatócitos (**Figs. 3A, 3C e 4A**). Estas células possuem citoplasma denso, núcleo esférico e nucléolo evidente (**Fig. 4A**). A região seguinte é a zona de maturação, onde os cistos de espermatócitos originam por meiose, cistos de espermátides. Estas células possuem citoplasma volumoso e núcleo esférico (**Fig. 3C**). A seguir, a zona de transformação é o local onde os cistos de espermátides se diferenciam e originam os cistos de espermatozóides num processo conhecido como espermiogênese (**Figs. 4A e 4D**).

Estas quatro regiões são observadas desde o quarto instar do estágio larval até o início da fase de pupa. Em pupas mais velhas e em adultos são observados apenas cistos de espermatozóides (**Fig. 4D**).

## Discussão

### 1. Anatomia

Os aspectos anatômicos de *D. saccharalis*, em geral, são semelhantes aos citados em outros Lepidoptera. Assim, a presença de dois testículos em formato reniforme observada em larvas, e de um único testículo em formato esférico em pupas velhas e adultos de *D. saccharalis*, também já foi descrita em *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982), *M. sexta* (Reinecke *et al.*, 1983), *Leucoptera coffeella*

(Lepidoptera: Lynotiidae) (Alves *et al.*, 2006) e *G. mellonella* (Polanska *et al.*, 2005). Entretanto, a coloração esbranquiçada dos testículos observada em todos os estágios do desenvolvimento de *D. saccharalis* não ocorre em outras espécies de Lepidoptera. Em larvas de *M. sexta* os testículos são translúcidos e em pupas vão adquirindo coloração creme, sendo esta também a cor em adultos (Reinecke *et al.*, 1983). Segundo Lai-Fook, 1982, os testículos de *C. ethius*, variam de transparentes a opacos em larvas, e de amarelos a vermelhos em pupas e adultos. Já nos adultos de *E. hegesia*, os testículos são vermelhos (Mancini e Dolder, 2004a). Segundo Caspari e Blomstrand, 1958 em *Ephestia* observa-se a presença de um pigmento amarelo no epitélio de revestimento dos testículos em larvas que vai desaparecendo ao longo do desenvolvimento.

Quanto à localização do órgão, ela pode variar nas diferentes espécies de Lepidoptera. Em larvas de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Omura, 1936), de *M. sexta* (Reinecke *et al.*, 1983) e de *H. virescens* (Meola e Loeb, 1995), os testículos encontram-se no quinto segmento abdominal, como o observado em *D. saccharalis*. No entanto, em *C. ethius* (Lai-Fook, 1982), são encontrados no sexto segmento abdominal.

Os testículos são aerados por traquéias que partem do sexto espiráculo abdominal (Lai-Fook, 1982; Meola e Loeb, 1995) ou do quinto segmento abdominal (Reinecke *et al.*, 1983), como o observado em *D. saccharalis*.

O tamanho dos testículos também pode variar em Lepidoptera, e de acordo com Omura (1936), o tamanho varia com a espécie e também com o estágio de desenvolvimento. No último instar do estágio larval o tamanho dos testículos de *D. saccharalis* é de 1,85mm de comprimento e 0,9mm de largura, sendo maior que o

tamanho descrito para o último instar larval de *M. sexta* (Reinecke *et al.*, 1983), 1,6mm de comprimento e 0,8mm de largura. Entretanto, em pupas de *M. sexta* o testículo é maior, 3,8mm de comprimento e 3,5mm de largura (Reinecke *et al.*, 1983), do que o observado em *D. saccharalis* é menor, 1,75mm de comprimento e largura e 1,5mm de espessura.

A fusão dos testículos ocorre em muitos Lepidoptera, e foi descrita em várias espécies como *L. coffella* (Alves *et al.*, 2006), *H. virescens* (Meola e Loeb, 1995), *E. hegesia* (Mancini e Dolder, 2004a), *M. sexta* (Reinecke *et al.*, 1983), *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982) e em *G. mellonella* (Polanska *et al.*, 2005). Mas em alguns, como em *B. mori*, ela não ocorre (Omura, 1936). Em larvas de quinto instar de *M. sexta*, prontas para o início da pupação, é descrita a aproximação e a união dos testículos, mas ainda não foi iniciada a fusão dos mesmos (Reinecke *et al.*, 1983), como também observado em pré-pupas de *D. saccharalis*. A fusão dos testículos em *M. sexta* (Reinecke *et al.*, 1983) ocorre no estágio de pré-pupa e, aproximadamente, por volta de uma a duas horas do início da fase de pupa semelhante ao observado em *D. saccharalis*. Entretanto em *C. ethlius* a fusão ocorre no quinto instar larval por volta de doze horas antes do início da pupação (Lai-Fook, 1982).

## 2. Histologia

Em *D. saccharalis*, os testículos são envoltos por dois epitélios. O epitélio de revestimento externo é denominado camada externa, “membrana comunis” ou bainha peritoneal (Caspari e Blomstrand, 1958; Chapman, 1998; King e Akai, 1982; Lai-Fook, 1982; Omura, 1936; Szollosi *et al.*, 1980). Separando este epitélio da hemolinfa, em *D. saccharalis* foi observada a presença de uma membrana

basal através da reação positiva para PAS, que é denominada de túnica externa por Omura (1936).

O epitélio de revestimento interno é denominado cápsula lobular, camada interna ou epitélio folicular (Caspari e Blomstrand, 1958; Chapman, 1998; Lai-Fook, 1982; Omura, 1936). Delimitando internamente este epitélio, em *D. saccharalis*, está presente uma membrana basal constatada através da reação positiva para PAS, que Omura (1936) denomina túnica interna. A presença de duas lâminas basais também é citada por King e Akai (1982).

Nas larvas de últimos ínstares de *C. ethlius* o epitélio de revestimento externo possui células um pouco achatadas (Lai-Fook, 1982), enquanto que em *D. saccharalis*, as células são pequenas e arredondadas. O epitélio de revestimento externo em pupas de *D. saccharalis* possui células muito semelhantes as do epitélio externo de larvas, também arredondadas, mas um pouco maiores. Enquanto que nos adultos, este epitélio torna-se extremamente delgado e apresenta células e núcleos mais achatados, como o observado em *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982).

Segundo King e Akai (1982), o epitélio de revestimento externo é composto por células que contém grandes quantidades de partículas de glicogênio. Em *D. saccharalis*, observou-se a presença de grânulos corados em vermelho pela técnica do PAS, o que também poderia comprovar a positividade para a presença de glicogênio, principalmente em larvas e pré-pupas, pois a quantidade destes grânulos diminui em pupas e adultos. A quantidade de grânulos de glicogênio pode estar relacionada ao desenvolvimento e à fusão dos testículos, pois a partir do estágio de pupa ocorre uma diminuição na quantidade destes grânulos.

O epitélio externo apresenta canais que dão aspecto esponjoso a esta camada (King e Akai, 1982; Szollosi *et al.*, 1980), e segundo Szollosi *et al.*, (1980), permitem a passagem de macromoléculas da hemolinfa para o testículo. Em *D. saccharalis* este epitélio consiste de camadas celulares (duas em larvas e pré-pupas, quatro em pupas jovens e 1 em pupas velhas e adultos) que são penetradas por traqueíolas, assim como descrito em outros Lepidoptera (Caspari e Blomstrand, 1958; King e Akai, 1982; Lai-Fook, 1982). Ainda segundo Caspari e Blomstrand (1958), o epitélio de revestimento externo torna-se mais denso e com limites indistintos durante o estágio de pré-pupa, o que também ocorre em pupas jovens de *D. saccharalis*, durante a fusão dos testículos.

O epitélio de revestimento interno em *D. saccharalis* é composto de uma camada de células grandes e achatadas que coram mais intensamente em corantes ácidos e que também apresentam reação positiva para o PAS, o que pode determinar a presença de grânulos de glicogênio. Este epitélio não se modifica morfológicamente ao longo do desenvolvimento. Em *C. ethlius*, o epitélio é mais estreito, cora-se mais intensamente quando observado na microscopia de luz, entretanto são relatadas modificações ao longo do desenvolvimento (Lai-Fook, 1982). Segundo King e Akai (1982), este epitélio contém células com citoplasma rico em glicogênio. Em *D. saccharalis* a quantidade de grânulos corados em vermelho que provavelmente comprovam a positividade para a presença de glicogênio, vai diminuindo em quantidade com o desenvolvimento.

Segundo Chapman (1998) e Snodgrass (1993), as paredes dos folículos consistem em um epitélio fino, às vezes com duas camadas de células, assentado sobre uma membrana basal. Os septos foliculares em larvas de *D. saccharalis*,

também são finos e possuem células alongadas e núcleos alongados, enquanto que em pupas e adultos, os septos tornam-se mais espessos e mais acidofílicos. Estes septos em *C. ethlius* se modificam ao longo do desenvolvimento, com aumento da espessura e da quantidade de grânulos, mas, no entanto, o citoplasma de adultos torna-se basofílico (Lai-Fook, 1982).

Segundo Nation (2002), cada testículo consiste de um número de tubos ou folículos nos quais os espermatozoides amadurecem. O número de folículos testiculares, segundo Uvarov (1966) e Nation (2002), é bastante variado nas espécies e tem importância taxonômica. Em larvas tanto de *B. mori* (Omura, 1936), *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982), *M. sexta* (Reinecke *et al.*, 1983) e *G. mellonella* (Polanska *et al.*, 2005), quanto de *D. saccharalis* são observados quatro folículos. Entretanto, a quantidade de folículos testiculares em adultos, relatada para *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982) é de oito, enquanto que em outros lepidoptera como *L. coffeella* (Alves *et al.*, 2006), *E. hegesia* (Mancini e Dolder, 2004a) e *D. saccharalis* é variável. Cada folículo testicular está ligado ao vaso deferente, por um vaso eferente (Maranhão, 1978; Vanetti, 1983; Gillot, 2005), não observado em *D. saccharalis*.

Os dados observados quanto à localização das regiões do folículo em *D. saccharalis*, corroboram com a descrição para outros insetos e Lepidoptera (Lara, 1992; Chapman, 1998; Garcia and Fernandez, 2001; Gillot, 2005). No germário, as espermatogônias observadas em *E. hegesia* apresentam citoplasma abundante e núcleos esféricos (Mancini e Dolder, 2004a), enquanto que em *D. saccharalis* estas células são pequenas, com pouco citoplasma e núcleos também esféricos. King e Akai (1982), observaram a presença de uma célula apical com

prolongamentos citoplasmáticos que penetram nas espermatogônias de Lepidoptera. Em *D. saccharalis* também foi observada a presença da célula apical. Na zona de crescimento, os espermatócitos observados em *E. hegesia*, apresentam citoplasma abundante, e núcleos esféricos com nucléolo evidente (Mancini e Dolder, 2004a) e esta morfologia também se apresenta em *D. saccharalis*. Na zona de maturação, e na zona de transformação, as espermátides e os espermatozóides respectivamente, em *E. hegesia*, apresentam diferenciação em dois tipos de células. As apirenes, que não apresentam núcleo e as eupirenes, nas quais o núcleo se alonga e se compacta durante a espermiogênese (Mancini e Dolder, 2004a). Entretanto, estes aspectos não foram analisados neste trabalho. Hemócitos estão presentes adjacentes à superfície do testículo em pupas e adultos de *D. saccharalis*. Em *Apis mellifera*, também são observados hemócitos próximos aos testículos (Cruz-Landim, 2004). Em *H. virescens* estes hemócitos estão associados com gotas de lipídios que parecem extrusar da superfície do testículo (Meola e Loeb, 1995). Szollosi *et al.* (1980), também observou hemócitos na superfície do testículo de *A. kuehniella*.

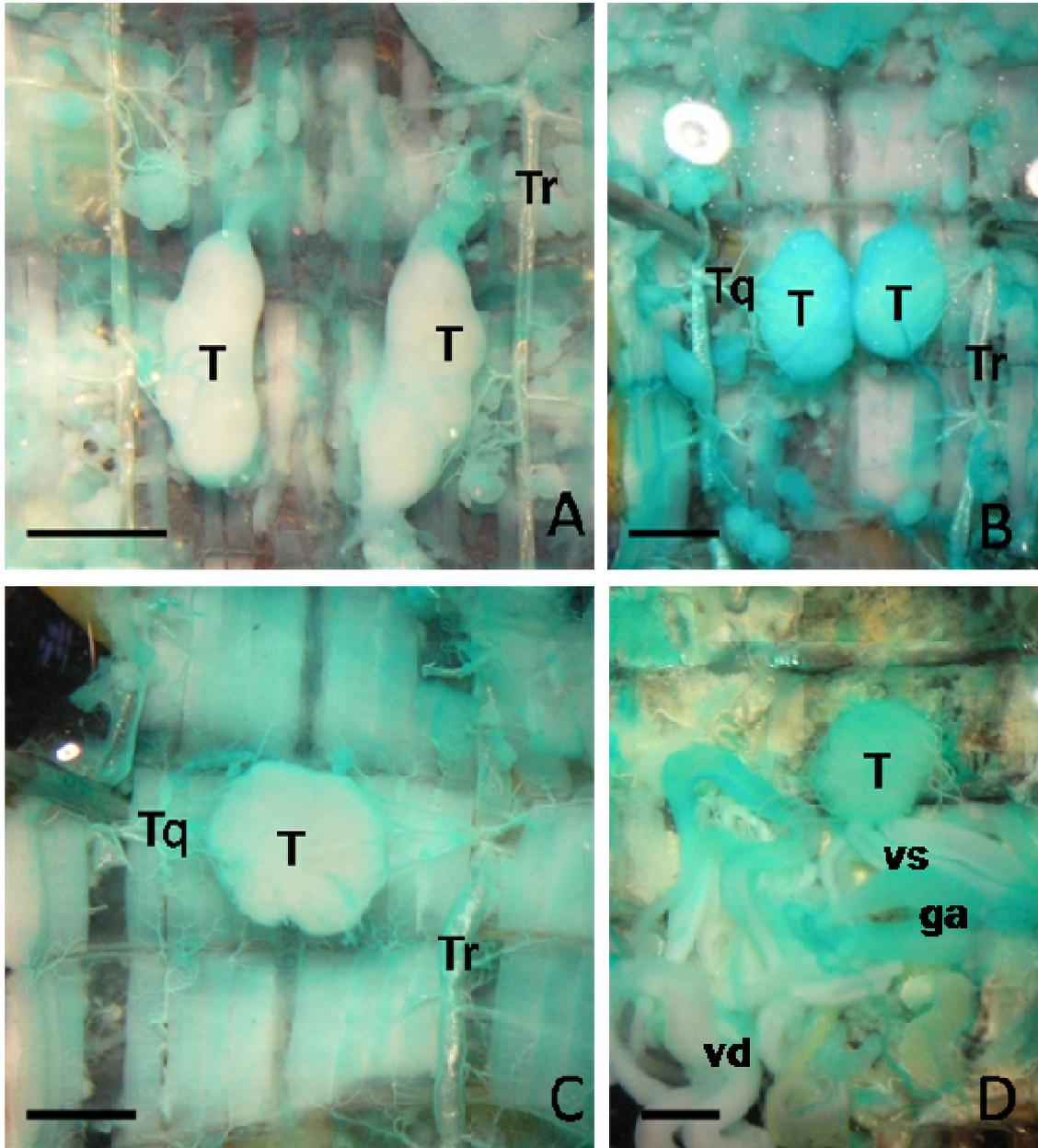
Os resultados obtidos permitem concluir que existem diferenças quanto à localização, tamanho, formato e coloração dos testículos de *D. saccharalis*; também nos epitélios de revestimento, quanto à morfologia das células, presença de grânulos no citoplasma e morfologia do núcleo, quando comparados a outros Lepidoptera. Entretanto, apesar das diferenças observadas, o padrão geral da anatomia e morfologia é muito semelhante em toda ordem.

Desta forma, trabalhos futuros relacionados à ultraestrutura dos testículos e da espermatogênese devem ser conduzidos para ampliar o entendimento a

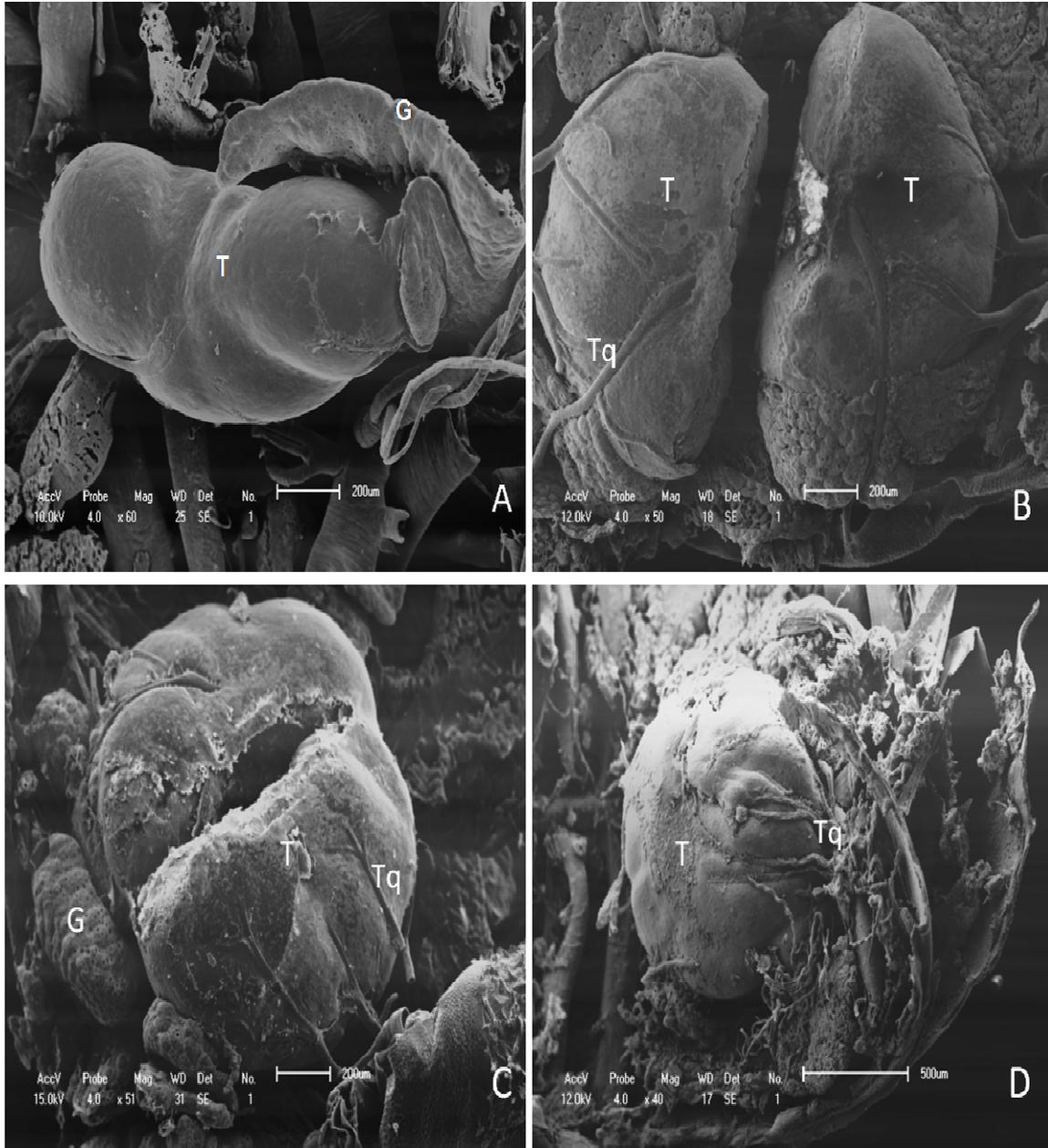
respeito do sistema reprodutor masculino ao longo do desenvolvimento pós-embriônico de *D. saccharalis*.

Parâmetros anatômicos e histológicos do Testículo		Estágio do Desenvolvimento			
		Larvas – 2 <sup>o</sup> -5 <sup>o</sup> instares	Pré-Pupa	Pupa Jovem	Pupa Velha/Adulto
Quantidade de Testículos		2	2 (próximos)	1 (em fusão)	1
Tamanho (mm)	Comp.	0,5 - 1,85	1,85	2,0	1,75/1,5
	Larg.	0,2 - 0,9	11,5	2,0	1,75/1,5
	Esp.	-	-	1,5	1,5/1,5
Formato		Reniforme	Oval	Esférico	
Coloração		Esbranquiçada			
N <sup>o</sup> de Folículos		4		8	Mais de 8
<b>Epitélio de Revestimento Externo</b>					
N <sup>o</sup> de Camadas		2		4	1
Células		Pequenas e arredondadas	Arredondadas		Achatadas
Núcleos		Arredondados e com grânulos evidentes (HE)		Arredondados	Achatados
Citoplasma		Levemente eosinófilo.		Levemente eosinófilo. Grânulos PAS + na porção basal	
Tecido gorduroso		Adjacente			Não observado
Traqueíolas		Observadas			
Hemócitos		Não observados		Observados	Não observados
<b>Epitélio de Revestimento Interno</b>					
N <sup>o</sup> de camadas		1			
Células		Grandes e achatadas			
Núcleos		Achatados			
Citoplasma		Intensamente eosinófilo. Grânulos PAS + na parte basal			
Traqueíolas		Observadas			
Lâmina Basal		Presente			
<b>Septos Foliculares</b>					
Células		Achatadas		Grandes e achatadas	
Núcleos		Achatados			
Citoplasma		Levemente eosinófilo. Grande quantidade de grânulos PAS +.		Intensamente eosinófilo. Grande quantidade de grânulos PAS +.	

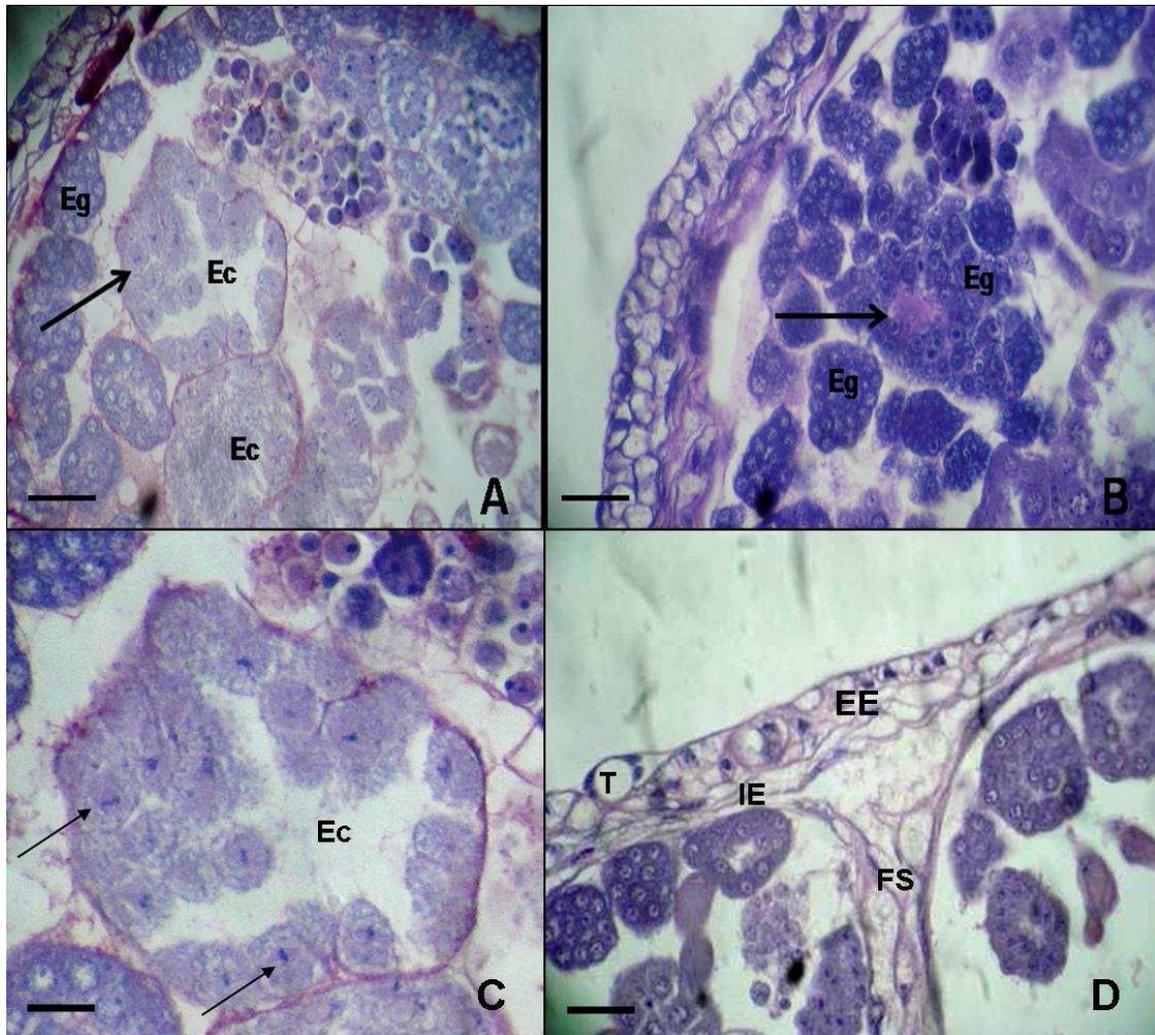
Tabela 1: Parâmetros anatômicos e histológicos observados ao longo do desenvolvimento dos testículos *D. saccharalis*.



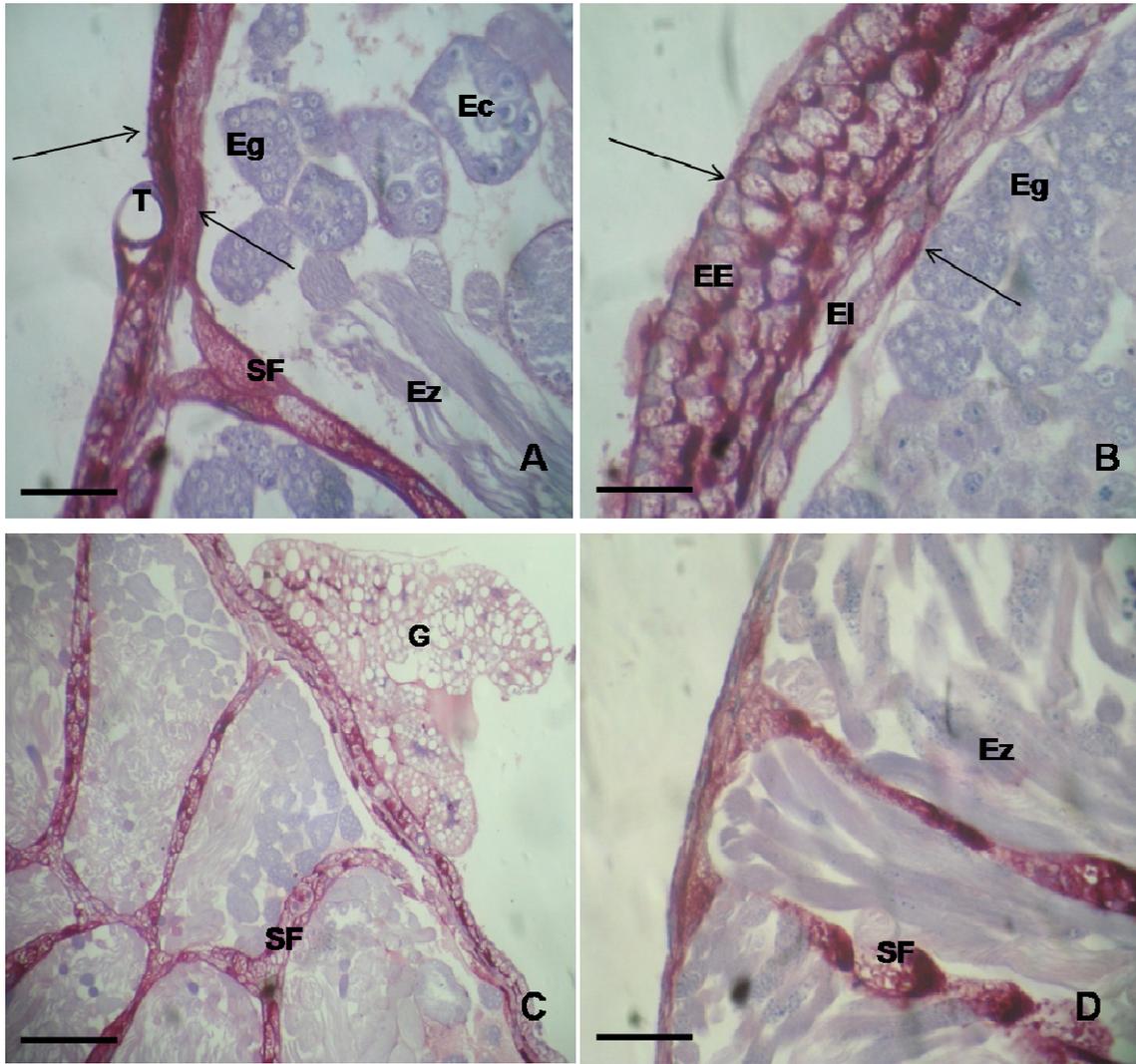
**Figura 1:** Testículos de *D. saccharalis* nos diferentes estágios do desenvolvimento pós-embriônico observados em microscópio estereoscópico. Técnica da Montagem total, coloração verde luz. Em (A) Larva 3º instar; em (B) Pré-pupa evidenciando aproximação dos testículos; em (C) Pupa jovem onde os testículos já apresentam fusão avançada; em (D) Adulto destacando testículo único após a fusão. T= testículo, Tr= traquéias, Tq= traquéolas, vs= vesícula seminal, vd= vasos deferentes, ga= glândulas acessórias. Barra de escala: A=500µm; B a D =1000µm.



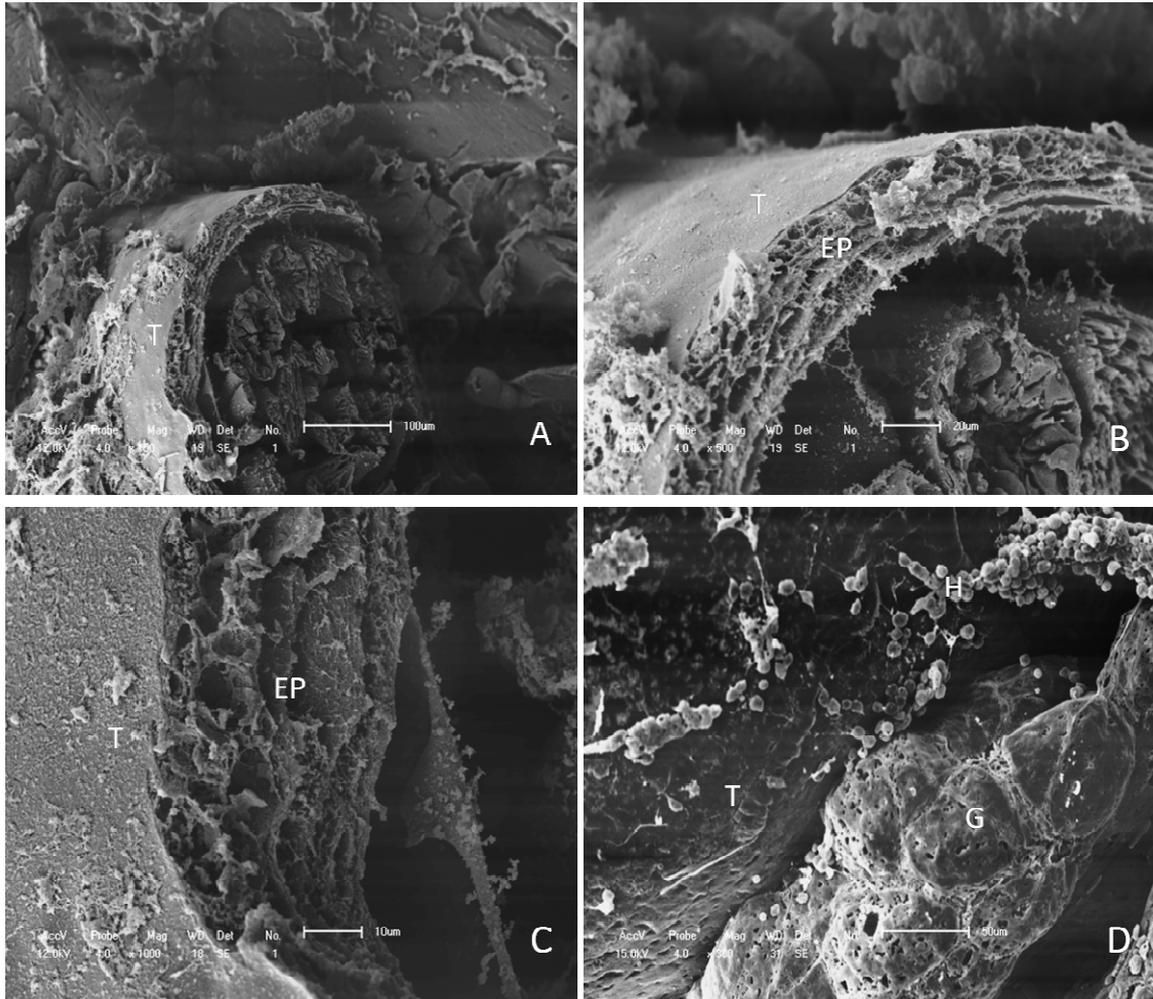
**Figura 2:** Microscopia Eletrônica de Varredura dos testículos de *D. saccharalis*, em (A) Larva 5<sup>o</sup> instar; (B) Pré-Pupa; (C) Pupa com testículos em fusão (D) Adulto. T= testículo, G= gordura, Tq= traqueólas. Barra de escala: A, B e C= 200µm; D= 500µm.



**Figura 3:** Testículos de *D. saccharalis* observados em microscopia de luz. Coloração H/E. Cortes longitudinais. (A a D) Larva 5<sup>o</sup> instar. EE= epitélio de revestimento externo; IE= epitélio de revestimento interno; Eg= espermatogônias; Ed= espermatídes; Ec= espermatócitos; SF= septo folicular; T= traquéias; seta= evidenciando fases da divisão celular em (A e C); seta= evidenciando a célula apical em (B). Barra de escala: A a D= 50µm.



**Figura 4:** Testículos da *D. saccharalis* nos diferentes estágios do desenvolvimento pós-embriônico observados em microscopia de luz. Cortes longitudinais. PAS. (A) Larva 5º instar; (B) Pré-pupa; (C) Pupa; (D) Adulto. **G**= Tecido Gorduroso; **T** = traquéias; **Eg**= espermatogônias; **Ec**= cistos de espermatócitos; **Ez**= cistos de espermatozóides; **SF**= septo folicular; Setas= membrana basal (interna e externa) Barra de escala: **A, B e D**= 50µm; **C**= 100µm.



**Figura 5:** Microscopia Eletrônica de Varredura dos testículos de *D. saccharalis*, em (A, B, C) Larva 5º instar (D) Pupa. T= testículo, G= gordura, EP= epitélio de revestimento, H= hemócitos. Barra de escala: A= 100µm; B= 20µm; C= 10µm; D= 50µm.

## Referências Bibliográficas

Alves, L., Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lynotiidae), *Acta Zoologica (Stocholm)* 87, 131-139.

Callahan, P., Cascio, T., 1963. Histology of the reproductive tracts and transmission of sperm in the Corn Earworm, *Heliothis zea*. *Annals of the Entomological society of America* 56, 535-556.

Caspari, E., Blomstrand, I., 1958. A Yellow pigment in the testis of *Epehestia*: its development and its control by genes. *Genetics* 43, 679-694.

Chapman, R.F., 1998. *The insect structure and function*. New York. 4th edition. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Chen, P.S. 1984. The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretion. *Annual Review of Entomology* 29, 233-255.

Cruz-Landim, C., 2004. *Biologia do desenvolvimento em abelhas*. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro. Available in: <http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carminda.html>.

Eaton, J.L., 1988. *Lepidopteran Anatomy*. Wiley-Interscience Publication. New York. Willey Interscience Publication.

Garcia, S.M.L., Fernandez, C. G., 2001. *Embriologia*, Porto Alegre. 2nd edition. Artmed.

Gillot, C., 2005. *Entomology*. Netherlands, 2nd edition. Springer.

Happ, G.M., 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology* 37, 303-20.

Hensley, S.D., Hammond, A.M., 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on artificial diet. *Journal Economic Entomology* 61(6), 1742-1743.

Junqueira, L.C.U., Carneiro, L.M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo. Editora Santos.

King, R., Akai, H., 1982. *Insect Ultrastructure*. New York. Vol. I. Plenum Press.

Lai-Fook, J., 1982. Testicular and spermatogenesis in *Calpododes ethlius* Stoll (Lepidoptera: Hesperidae). *Canadian Journal of Zoology* 60, 1161-1171.

Lara, F.M., 1992. *Princípios de Entomologia*. Jaboticabal. 3rd edition. Editora Ícone.

Mancini, K.; Dolder, H., 2004a. Dichotomic spermiogenesis in *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Brazilian Journal morphology Science* 21(1), 13-23.

Mancini, K.; Dolder, H., 2004b. Protein detection in spermatids and spermatozoa of the butterfly *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera). *Biocell* 28(3), 299-310.

Mancini, K.; Bão, S.N.; Fernandes, A.P.; Dolder, H., 2005. Immunocytochemical localization of tubulins in spermatids and spermatozoa of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue and Cell* 37, 81-89.

Mancini, K.; Dolder, H., 2001. Ultrastructure of apyrene and eupyrene spermatozoa from the seminal vesicle of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue and Cell* 33(3), 301-308.

Maranhão, Z.C., 1978. *Morfologia Geral dos Insetos*. São Paulo. Livraria Nobel S.A.

Martinez, I.M., 2002. Metodologías (Técnicas básicas de anatomía microscópica y morfometría para estudiar los insectos). *Aracnet Biology Boletín de la SEA* 30, 187-195.

Meola, S.M.; Loeb, M.J., 1995. Unique interstesticular tissue complex in larvae of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidóptera: Noctuidae). *International Journal. Insect Morphology and Embryology* 24(4), 443-457.

Nation, J.L., 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. Washington. CRC Press D.C.

Nijhout, H. F.; Willians, C.M., 1974. Control of molting and metamorphosis in the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta* (L.): Growth of the last-instar larva and the decision to pupate. *Journal Experimental Biology* 61, 481-491.

Omura, S. 1936. Studies on the reproductive system of the male of *Bombyx mori*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University*, 2(38), 151-181.

Pearse, A.G.E., 1972. *Histochemistry theoretical and applied*. Edinburgh. 3rd. edition. Churchill Livingstone.

Phillips, D.M. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 44, 243-277.

Polanska, M.A.; Ciuk, M.A.; Cymborowski B.; Bebas, P., 2005. Germ Cell death in the testis and its relation to spermatogenesis in the Wax Moth, *Galleria mellonella*

(Lepidoptera: Pyralidae), effects of facultative diapause. *Journal of Experimental Zoology* 303A:1013-1029.

Quicke, D.L.J.; Ingram, S.N.; Baillie-Gaitens, P.V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica. Scripta* 21, 381-402.

Reinecke, L.H.; Reinecke, J.P.; Adams, T.S., 1983. Morphology of the Male Reproductive Tract of Mature Larval, Pupal and Adult Tobacco Hornworms (Lepidoptera: Sphingidae), *Manduca sexta*. *Annals of the Entomological Society of America* 76(3), 365-375.

Rigoni, GM; Tomotake, M.E.M.; Conte, H., 2004. Morphology of Malpighian Tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at final larval development. *Cytologia* 69(1), 1-6.

Snodgrass, R.E., 1993. *Principles of insect Entomology*. London. 2nd Edition. Cornell University Press.

Szollosi, A.; Riemann, J.; Marcallou, C., 1980. Localization of the Blood-Testis Barrier in the Testis of the Moth, *Anagasta kuehniella*. *Journal of Ultrastructure Research* 72, 189-199.

Uvarov, S.B., 1966. *Grasshoppers and Locusts*. London. Cambridge University Press.

Vanetti, F., 1983. *Entomologia Geral*. Viçosa, Coopasul.

Wagner, R.M.; Loeb, M.J.; Dochansky, J.P.; Gelman, D.B.; Lusby, W.R.; Bell, R.A. 1997. Identification and characterization of ecdysiotropic peptide from brain extracts of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 34, 175-189.

# 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](#)