

HELEN CRISTINA PINTO SANTOS

**ESPERMATOGÊNESE NO PERCEVEJO *PODISUS NIGRISPINUS* TRATADO COM
O BIOINSETICIDA AZADIRACTINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Santos, Helen Cristina Pinto, 1988-

S237e
2013

Espermatogênese no percevejo *Podisus nigrispinus* tratado
com o bioinseticida azadiractina / Helen Cristina Pinto Santos.

– Viçosa, MG, 2013.

vi, 14 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 11-14.

1. Inseticidas vegetais. 2. Nim. 3. Testículos. 4. Morfologia.
5. Percevejo (Inseto). 6. Reprodução. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 632.95

HELEN CRISTINA PINTO SANTOS

**ESPERMATOGÊNESE NO PERCEVEJO *PODISUS NIGRISPINUS* TRATADO
COM O BIOINSETICIDA AZADIRACTINA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 18 de Março de 2013

José Eduardo Serrão

Luciane Cristina de Oliveira Lisboa

José Lino Neto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia geral por proporcionarem todas as condições necessárias à realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao professor orientador José Lino Neto que com certeza foi mais que um amigo durante esses anos.

Às co-orientadoras Maria do Carmo Queiroz Fialho e Uyrá dos Santos Zama pelo carinho e generosidade ao dividirem seus conhecimentos.

A banca composta pelos professores José Eduardo Serrão e Luciane C. de O. Lisboa pelas valiosas sugestões apresentadas.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão às pessoas que acompanharam, criticaram, contribuíram e facilitaram meu progresso e aprendizado durante a execução deste trabalho, em especial: André, Beth, Serrão, Ana Flávia, Rafael, Zanuncio, Monteiro, João Marcos e Sérgio da Matta.

Às flores Ana, Aline, Talitta, Marta, Glenda e Thaís. E aos colegas Dihego, Marcelo, Dr. Alex, Polly, Fernando, Márcio e Cláudia pela amizade, carinho e torcida.

Às minhas companheiras de república Bruna, Jéssica e, em especial, Michelle pelo companheirismo e suporte.

À minha família por toda dedicação e incentivo.

Por fim, citando Chico Xavier, “agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar”.

BIOGRAFIA

Helen Cristina Pinto Santos, filha de Adelgundes Moisés dos Santos e Maria Helena Pinto dos Santos, nascida em 26 de agosto de 1988, natural de Congonhas, Estado de Minas Gerais. Iniciou a graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Licenciatura, em 2006 pela Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Estado de Minas Gerais, finalizando-a em fevereiro de 2011 quando obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas. Em março de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Estado de Minas Gerais, defendendo a dissertação em Março de 2013.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Espermatogênese	1
1.2. <i>Podisus nigrispinus</i> e Neem	2
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1. Obtenção dos <i>Podisus nigrispinus</i>	4
3.2. Preparo e aplicação da solução de azadiractina.....	5
3.3. Delineamento experimental.....	5
3.3. Histologia dos testículos.....	5
4. RESULTADOS	6
5. DISCUSSÃO	10
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

RESUMO

SANTOS, Helen Cristina Pinto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2013. **ESPERMATOGÊNESE NO PERCEVEJO *PODISUS NIGRISPINUS* TRATADO COM O BIOINSETICIDA AZADIRACTINA** Orientador: José Lino Neto. Co-Orientadoras: Uyrá dos Santos Zama e Maria do Carmo Queiros Fialho

Percevejos predadores, especialmente da família Pentatomidae, são inimigos naturais muito utilizados em programas de controle biológico. O presente estudo buscou avaliar se o contato tópico do predador *Podisus nigrispinus* com azadiractina em baixas concentrações causa alterações em sua morfologia testicular e espermatogênese. Foi aplicado 1 µL de azadiractina contendo 30 ppm (30 µg/mL) sobre o escutelo de 20 adultos recém emergidos e 30 ninfas de terceiro instar logo após a muda. Os tratamentos controle foram feitos usando água destilada e etanol absoluto. Após a emergência das ninfas em adultos, os machos foram divididos em três grupos (I, II e III) de 10 insetos cada. Os testículos dos percevejos do grupo I foram dissecados 24 h após a emergência, do grupo II após 7 dias e do grupo III após 15 dias. Dos 20 adultos tratados, 10 tiveram seus testículos dissecados com 7 dias e outros 10 com 15 dias. O material foi processado para microscopia de luz e cortes de 1 µm de espessura foram corados com hematoxilina e azul de toluidina. Na morfologia geral dos testículos e na espermatogênese de *P. nigrispinus* não se observou diferença entre os grupos tratados e controle. As espermatogônias apresentam formato esférico e um grande núcleo com um nucléolo evidente e adjacente ao envelope nuclear e os espermatócitos apresentam um grande núcleo com cromatina granular e homoganeamente distribuída. Às espermátides iniciais apresentam núcleo arredondado, com localização periférica e menor que aquele dos espermatócitos. Concomitantemente à condensação da cromatina, o acrossomo começa a ser formado e, no polo oposto, o complexo mitocondrial e o axonema alongam-se. Após esse processo tem-se o espermatozoide formado. Portanto, estes resultados sugerem que *P. nigrispinus* e o bioinseticida azadiractina apresentam potencial para serem usados em concomitância no Manejo Integrado de Pragas.

ABSTRACT

SANTOS, Helen Cristina Pinto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2013.
SPERMATOGENESIS OF THE STINKBUG *PODISUS NIGRISPINUS*
TREATY WITH BIOPESTICIDE AZADIRACHTIN. Adviser: José Lino Neto.
Co-Advisers: Uyrá dos Santos Zama and Maria do Carmo Queiros Fialho

Bedbugs predators, especially of the Pentatomidae family, are natural enemies very used in biological control programs. The present study aimed to evaluate if the topical contact of the predator *Podisus nigrispinus* with azadirachtin at low concentrations causes alterations in testicular morphology and spermatogenesis. Was applied 1 μ L de azadirachtin containing 30 ppm (30 μ g / ml) on the scutellum of 20 newly-emerged adults and 30 third instar nymphs after molting. The control treatments were made used distilled water and absolute ethanol. After emergence of nymphs on adult, males were divided into three groups (I, II and III) of 10 insects each. The testes of stinkbugs from group I were dissected 24 hours after emergence, from group II after 7 days after emergence and group III after 15 days after emergence. Out of the 20 adults treated, 10 had their testes dissected with 7 days and another 10 with 15 days. The material was processed for light microscopy and sections of 1 mm in thickness were stained with hematoxylin and toluidine blue. In the *P. nigrispinus* testis general morphology and spermatogenesis was the same between the treated and control groups. No difference was observed between the treated and control groups. The spermatogonia have spherical shape and a large nucleus with a evident nucleolus adjacent to the nuclear envelope and the spermatocytes have a large nucleus with a granular chromatin homogeneously distributed. Early spermatids have rounded nuclei, smaller than spermatocytes ones, and with peripheral location. Concurrently with the chromatin condensation, the acrosome begins to be formed, and in the opposite pole, the axoneme and mitochondrial complex become longer. After this process the sperm has been formed. Therefore, these results suggest that *P. nigrispinus* and bioinsecicida azadirachtin have potential to be used concomitantly in Integrated Pest Management.

1. Introdução

1.1 Espermatogênese

O aparelho reprodutor masculino de *Podisus nigrispinus* apresenta dois testículos, se localizam no início da região abdominal e possui uma membrana caracterizada pela presença de pigmentos vermelhos. Eles são arredondados ou sutilmente ovais e compostos por seis folículos cada, sendo dois destes atrofiados e localizados na periferia em corte longitudinal (Lemos *et al.*, 2005).

Dentro desses testículos são produzidos dois tipos de espermatozoides com 170 μm e 205 μm de comprimento (Araújo, 2011). Polimorfismo dos espermatozoides, caracterizado por gametas com tamanhos distintos, foi retratado em outras quatro espécies de Pentatomidae (Bowen, 1922; Schrader & Leuchtenberger, 1950; Araújo, 2011).

O desenvolvimento das células gaméticas masculinas é denominado espermatogênese e ocorre dentro dos folículos testiculares. Em insetos a espermatogênese é cística, pois a diferenciação das células-tronco em células germinativas adultas ocorre dentro de uma área (cisto) delimitada por células não germinativas, as células císticas. Esse processo é sequencial e a primeira etapa tem início no ápice do folículo pela divisão assimétrica das células-tronco, originando tanto células-tronco novas quanto espermatogônias (Dumser, 1980).

As espermatogônias são células grandes e esféricas com núcleos polimórficos que apresentam nucléolo proeminente. Por meio de uma série de divisões mitóticas, cujo número de divisões é característico de cada espécie, estas formarão os espermatócitos (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Landim, 2004; Gottardo *et al.*, 2012). Os espermatócitos permanecem interligados por pontes citoplasmáticas reforçadas por anéis de actina. Eles possuem núcleo esférico, com cromatina difusa e um citoplasma pobre em organelas com polirribossomos e mitocôndrias esféricas. Além disso, o citoplasma apresenta um centrosomo adjacente à membrana plasmática (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Landim, 2004; Gottardo *et al.*, 2012).

Assim que o número de espermatócitos por cisto, típico da espécie, é atingido, ocorrem as divisões meióticas, resultando na formação das espermátides. Após formadas, as espermátides passam por várias modificações morfológicas que as transformam em espermatozoides, processo denominado espermiogênese. As

espermátides iniciais são células globulares com núcleo central, com um nucléolo e uma cromatina difusa (Cruz-Landim, 2004; Klowden, 2007; Gottardo *et al.*, 2012).

À medida que a espermiogênese avança as seguintes transformações ocorrem: o acrossomo se forma pela união de vesículas liberadas a partir do complexo de Golgi; o núcleo começa a apresentar forma afilada com cromatina cada vez mais compactada; as mitocôndrias se fundem formando uma estrutura denominada *nebenkern*, que posteriormente se divide formando os dois derivados mitocôndrias que se alongarão a medida que o flagelo é formado; o axonema é formado a partir de um centríolo e é caracterizado por um arranjo microtubular $9 + 9 + 2$, que é uma organização microtubular convencional para insetos pterigotas. Por fim, todas as estruturas das espermátides se alongam, o citoplasma excedente é eliminado, terminando a diferenciação celular com a formação do espermatozoide (Hoage & Kessel, 1968; González *et al.*, 1998; Cruz-Landim, 2004; Klowden, 2007).

Assim sendo, células gaméticas masculinas maduras são constituídas na região de cabeça pelo acrossomo e núcleo e na região de cauda pelos dois derivados mitocondriais e o axonema. Os espermatozoides recém formados deixam os testículos através dos ductos deferentes e ficam armazenados na vesícula seminal até a cópula, durante a qual eles são transferidos para o trato reprodutor feminino (Dumser, 1980; Klowden, 2007; Chapman, 1998).

1.2 *Podisus nigrispinus* e Neem

Em vista dos impactos causados com a utilização apenas do controle químico, programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) vem sendo utilizados para reduzir as infestações das culturas através de um método integrado, que prevê a morte das pragas por meio de inimigos naturais. Esses programas visam à mínima interferência possível nos agrossistemas e culturas florestais (Boaretto & Brandão, 2000).

Dentre os métodos do MIP de controle múltiplo das pragas que vem ganhando destaque está o controle biológico. Este associa o manejo de organismos benéficos, como inimigos naturais, com o uso concomitante de bioinseticidas letais às pragas e presumidamente inofensivos aos inimigos naturais. Na prática, o controle biológico dentro do MIP visa que os inimigos naturais sejam aptos a persistirem nas plantações promovendo um eficaz controle de pragas (Metcalf & Luckmann, 1994).

Percevejos predadores, especialmente os pentatomídeos, são inimigos naturais utilizados em programas de controle biológico, pois são generalistas, alimentando-se de

insetos praga de diferentes ordens que atacam diversos sistemas agrícolas e florestais. A presença desses inimigos naturais nas culturas tem grande impacto, causando uma considerável redução nas populações de insetos praga (Zanuncio *et al.*, 1994).

Dentre esses percevejos, o predador zoofitófago *Podisus nigrispinus* contribui de forma eficaz para o combate de pragas, pois é um dos principais predadores de lepidópteros desfolhadores na região Neotropical. Assim como outros percevejos predadores da subfamília Asopinae, o ciclo de vida do *P. nigrispinus* apresenta a fase de ovo, cinco estádios ninfais e a fase adulta, sendo predador a partir do segundo estágio larval (Torres *et al.*, 2006).

Podisus nigrispinus ocorre naturalmente em vários ecossistemas agrícolas e florestais (Torres *et al.* 2006) como, por exemplo, culturas de algodão (Medeiros *et al.*, 1998), de tomate (Torres *et al.*, 1996; De Clercq, 2000; Vivan *et al.*, 2002) e de soja (Grazia & Hildebrand, 1986), bem como em áreas de reflorestamento com *Pinus* e eucalipto (Zanuncio *et al.*, 1994).

O Manejo Integrado de pragas com o uso do predador *P. nigrispinus*, assim como o uso de outros inimigos naturais, torna menos impactante a intervenção humana no controle de pragas. Entretanto, são raros os casos que só o controle biológico natural é suficientemente eficaz no combate a pragas sem utilização simultânea de inseticidas (Degrande *et al.*, 2002). Uma alternativa proposta para minimizar os problemas relacionados ao uso de inseticidas é a utilização de compostos químicos seletivos. A seletividade ocorre quando a substância consegue controlar a praga alvo, mas causando impacto mínimo sobre os outros componentes do ecossistema (Soares & Busoli 2000, Degrande *et al.*, 2002).

Neste contexto, o uso do bioinseticida seletivo azadiractina (popularmente conhecida como Neem ou Nim) tem destaque. Essa substância pode afetar os insetos de várias formas: (1) diminuindo a ingestão de alimentos ao bloquear os receptores que respondem a fagoestímulos; (2) inibindo o crescimento larval, por impedir as mudas, ou levando à má formação por interromper a síntese ou bloquear a liberação dos hormônios; (3) reduzindo a viabilidade dos ovos por alterar as concentrações dos ecdiosteróides e do hormônio juvenil e; (4) provocando efeitos celulares como perda do tônus muscular, bloqueio da divisão celular de células gaméticas masculinas e da síntese de proteínas em vários tecidos, incluindo enzimas digestivas (Chapman, 1974; Dethier, 1982; Shultz & Schluter, 1984; Mordue – Luntz & Blackwell, 1993; Mordue - Luntz, 2000).

A azadiractina tem se mostrado adequada para o uso no Manejo Integrado de Pragas, pois os vertebrados e vários inimigos naturais apresentam baixa sensibilidade a esse composto, característica que o torna pouco prejudicial ao ambiente. Como essa substância não causa a morte imediata da espécie praga, há uma diminuição na probabilidade de indivíduos resistentes serem selecionados. Além disso, já que a ação desse composto é mais eficaz por ingestão do que por contato, isso favorece a eliminação dos insetos praga e garante a predação concomitante pelos inimigos naturais (Córdor Golec, 2007).

Entretanto, para se presumir o sucesso do Neem no MIP, os inimigos naturais não podem ser imediatamente afetados ao entrarem em contato com plantações tratadas. Assim, entender o processo de desenvolvimento desses inimigos naturais, após a exposição ao pesticida, ajuda a entender se, e como, essas substâncias poderão ser usadas para complementar programas de controle biológico (Evangelista Jr. *et al.*, 2002; Gonring *et al.*, 2003). Um dos aspectos relevantes que precisa ser esclarecido é de que forma esses bioinseticidas afetam a reprodução dos inimigos naturais (Fernandes, 2002), visto que, a habilidade de produzir gametas funcionais é essencial à sobrevivência da espécie.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral:

Avaliar se o contato tópico do predador *P. nigrispinus* com a azadiractina causa alterações em sua morfologia testicular e na espermatogênese.

3. Material e métodos

3.1. Obtenção dos *Podisus nigrispinus*

Podisus nigrispinus foram obtidos da criação massal mantida no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. No local, os animais são criados a 25 °C, umidade relativa de 70%, fotofase de 12 horas (claro e escuro) e são alimentados *ad libitum* com pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

3.2. Preparo e aplicação da solução de azadiractina

Para adultos e ninfas

A dose comercial da azadiractina (Azamax[®]) é 12 g de ingrediente ativo/L. Esta foi diluída em etanol absoluto para 30 µg/mL (30 ppm). Em seguida, 1 µL dessa solução foi aplicado sobre o escutelo de adultos e ninfas de terceiro ínstar. Os tratamentos controle foram realizados um com etanol absoluto e outro com água destilada.

3.3. Delineamento experimental

Imediatamente após cada muda, bem como após a emergência do adulto, o percevejo apresenta coloração avermelhada, escurecendo no tempo máximo de uma hora. Para uma aplicação e absorção padronizadas, todos os percevejos utilizados no experimento foram tratados durante o período de coloração avermelhada.

Ninfas: 30 ninfas de terceiro ínstar receberam aplicação tópica de azadiractina. Após a emergência, os indivíduos foram divididos em três grupos contendo 10 insetos cada. Os testículos dos percevejos do grupo 1 foram dissecados 24 h após a emergência, do grupo 2 após 7 dias e do grupo 3 após 15 dias. Nos tratamentos controle, para cada grupo, foram dissecados testículos de cinco indivíduos tratados com etanol absoluto e cinco com água destilada.

Adultos: 20 adultos foram expostos a azadiractina logo após a emergência. 10 indivíduos tiveram seus testículos dissecados com 7 dias da fase adulta, enquanto os outros 10 com 15 dias. Os intervalos de dias entre tratamento e dissecação compreendem o tempo necessário para ocorrer o amadurecimento sexual do *P. nigrispinus* (Zanuncio et al., 1992). Nos tratamentos controle, para cada intervalo, foram dissecados testículos de cinco indivíduos tratados com etanol absoluto e cinco com água destilada.

3.4. Histologia dos testículos

Os testículos foram dissecados em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, fixados por 1 a 2 h em solução de glutaraldeído 2,5% nesse mesmo tampão. Após a

fixação foram lavados por duas horas no mesmo tampão, desidratados em série alcoólica crescente a 30, 50, 70 e 90% (15 minutos cada) e depois em dois banhos de 10 minutos cada em álcool 100%. As amostras foram infiltradas, à temperatura ambiente, em dois banhos de 4 h cada, sendo o primeiro com uma mistura de historesina e álcool (1:1) e o segundo com historesina pura. O material foi incluído em historesina acrescida do endurecedor em moldes de silicone que foram colocados em placas de Petri e mantidos em temperatura ambiente. Cortes semifinos com 1 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo Leica RM 2155 com navalhas de vidro. Estes foram transferidos para lâminas histológicas, as quais foram colocadas em placa aquecida a 50 °C por 15 minutos para que os cortes ficassem distendidos e aderidos à lâmina. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris por 15 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, corados com azul de toluidina por 30 segundos e lavados rapidamente em água de torneira. Para proteção dos cortes, lamínulas foram aderidas às laminas usando *Entellan*[®] (Merck Millipore) como meio de montagem.

4. Resultados

A morfologia geral dos testículos e a espermatogênese de *Podisus nigrispinus*, quando observados à microscopia de luz, se mantiveram idênticas entre os grupos tratados e controles (Figs 1 e 2). As fases da espermatogênese seguem a mesma cronologia de eventos, sem adiantamento ou atraso das etapas. Cistos que estão na mesma fase quando comparando folículos de indivíduos tratados e não tratados apresentam células com morfologias idênticas. Os cistos mais jovens se localizam próximos ao ápice folicular, enquanto aqueles em fases mais adiantadas da espermatogênese estão nas porções mais próximas ao ducto deferente (Figs 1A e 2A). Todos os folículos apresentavam-se funcionalmente ativos produzindo espermatozoides (Figs 1A e 2A).

Como não foram observadas diferenças na espermatogênese entre os grupos tratados e controles, elas serão descritas juntas. No início do processo, as espermatogônias estão localizadas no ápice do folículo. Essas células apresentam formato esférico e um grande núcleo com um nucléolo evidente e adjacente ao envelope nuclear (Figs 1B e 2B).

Após seis ciclos de divisões mitóticas, as espermatogônias entram em meiose, caracterizando sua diferenciação em espermátócito I (Figs 1C e 2C). Estes

espermatócitos apresentam um grande núcleo com cromatina granular e homogeneamente distribuída (Figs 1D e 2D). O citoplasma ocupa uma pequena área e se mostra mais basófilo do que o da espermatogônia.

Ao fim da meiose I tem-se os espermatócitos II, os quais, após a meiose II, darão origem às espermátides iniciais (Figs 1E-I e 2E-H). Estas apresentam núcleo arredondado, com localização periférica e menor que o dos espermatócitos.

Já na espermátide inicial a cromatina começa sua compactação com distribuição irregular de alguns pontos mais densos. Ao mesmo tempo, no citoplasma, aparece uma região menos corada que corresponde às mitocôndrias fundidas, denominadas complexo mitocondrial ou *nebenkern* (Figs 1E, F e 2E, F).

Em seguida, a cromatina apresenta pontos de compactação mais densos distribuídos na periferia do núcleo (Figs 1F-H e 2H). Concomitantemente à condensação da cromatina, o acrossomo começa a ser formado e, no polo oposto, o complexo mitocondrial (Figs 1I, H e 2G) e o axonema alongam-se. Em seguida, o complexo mitocondrial se divide em dois, sendo agora denominados derivados mitocondriais, que continuam a se alongar juntamente com os demais elementos do flagelo (Figs 1I e 2G).

Os derivados mitocondriais já no início apresentam pontos mais corados distribuídos de forma homogênea. À medida que eles se alongam os pontos se organizam em linha ao longo do centro dos derivados (Figs 1G-I e 2G, H). À medida que as espermátides avançam no seu desenvolvimento, o núcleo apresenta-se cada vez mais afilado, com a cromatina homogeneamente compactada, e o citoplasma praticamente ausente (Figs 1M, N e 2J), finalmente são formados os espermatozoides que migram para o ducto deferente, onde permanecem até a cópula.

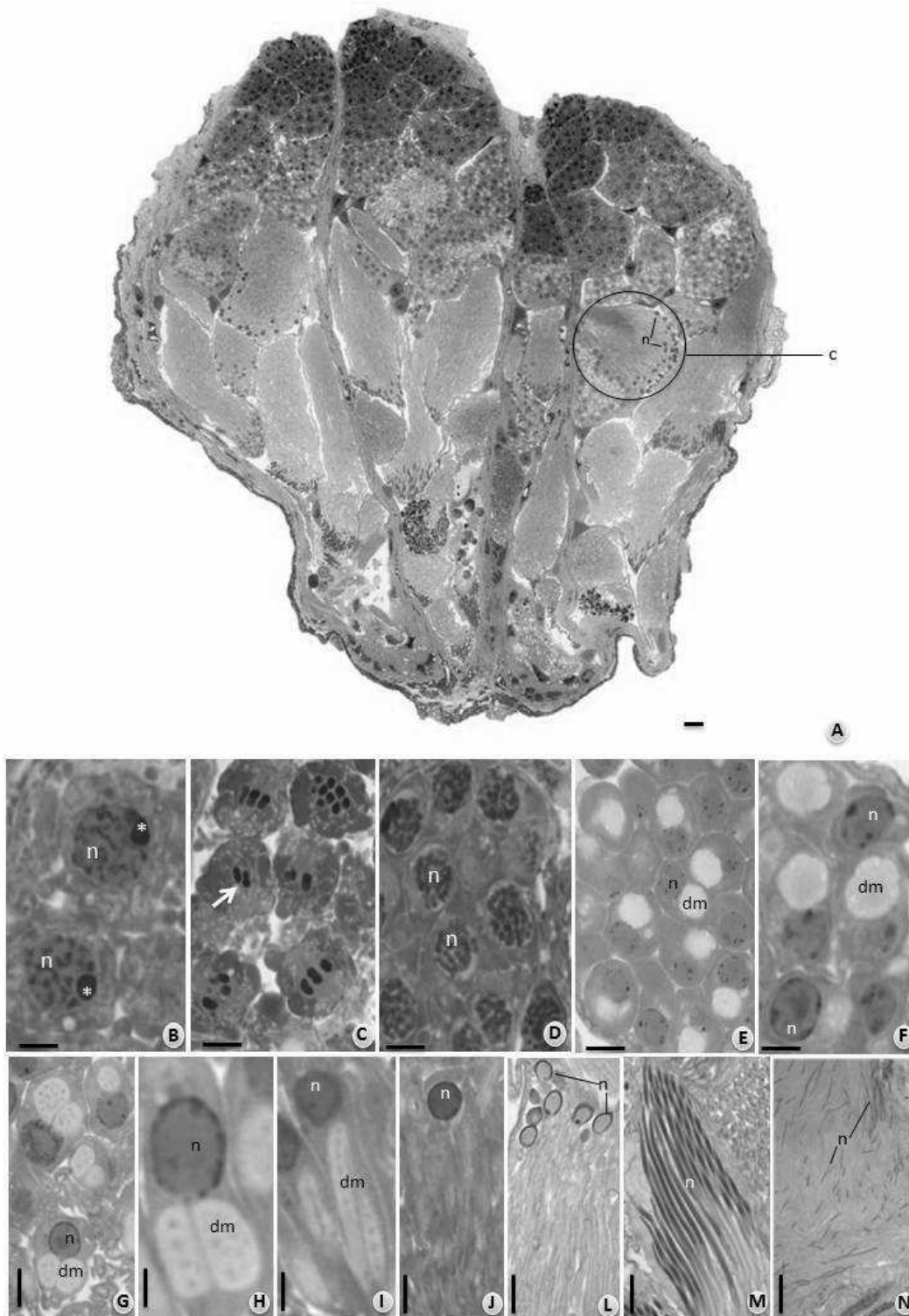


Figura 1. Fotomicrografias de luz do testículo de *P. nigrispinus* não tratados com Azadiractina. Secções longitudinais do grupo controle, mostrando os folículos testiculares (A) e o processo de espermatogênese (B-M). Em A: n- núcleo e c- cisto. Em (B-N): n- núcleo, dm- derivado mitocondrial, seta- divisão celular e asterisco- nucléolo. Barras: (A) = 50 μm e (B-N) = 2,0 μm

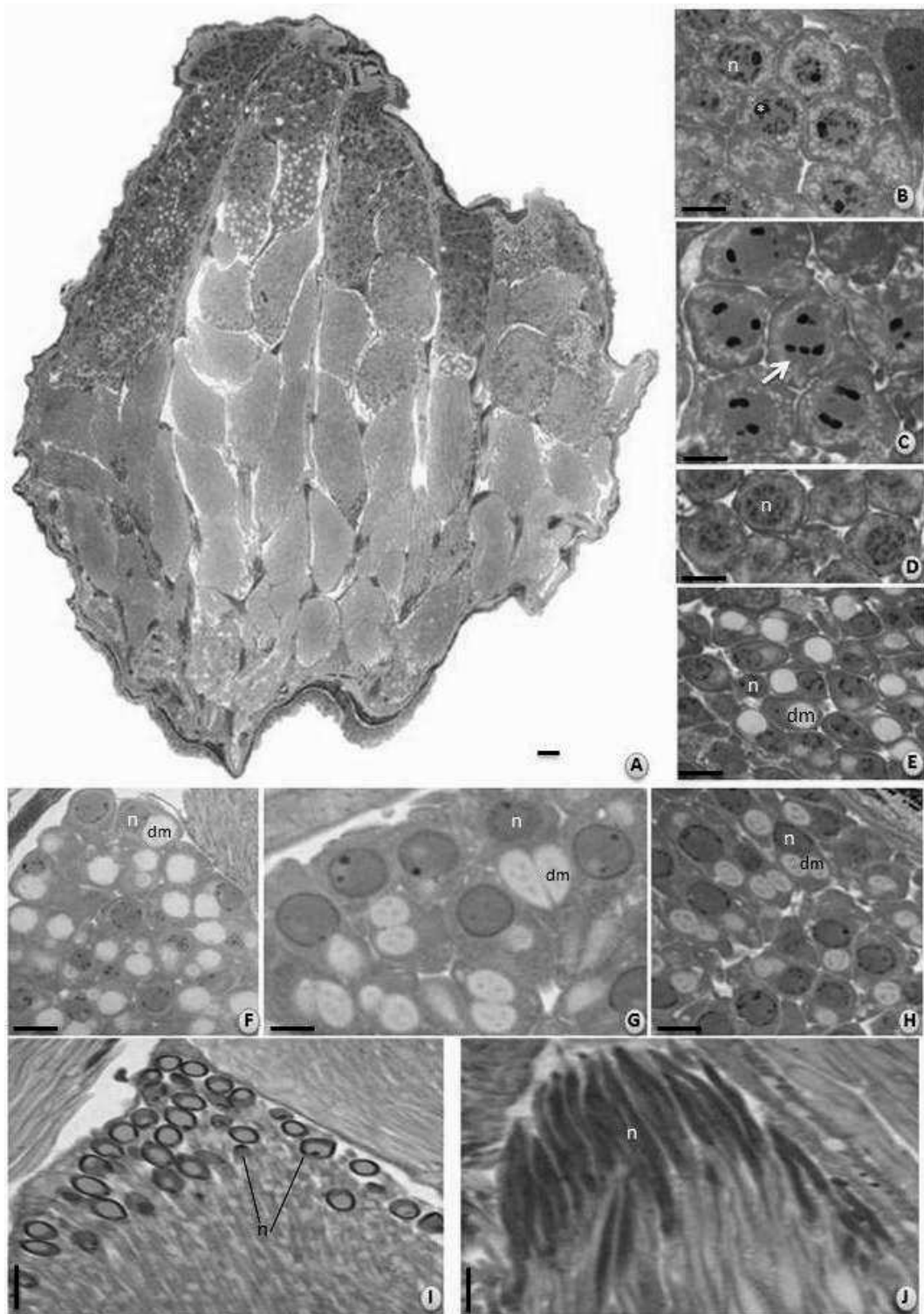


Figura 2. Fotomicrografias de luz do testículo de *P. nigrispinus* tratados com Azadiractina (A-J). Secções longitudinais do grupo tratado, mostrando os folículos testiculares (A) e o processo de espermatogênese (B-J). Em (B-J): n- núcleo, dm- derivado mitocondrial, seta- divisão celular e asterisco- nucléolo. Barras: (A) = 50 µm e (B-J) = 2,0 µm.

5. Discussão

A sensibilidade à azadiractina varia muito entre as ordens de insetos. Apreservação da morfologia testicular de *P. nigrispinus* na dosagem de 30 ppm corrobora com a observação de que efeitos de intoxicação em Hemiptera surgem na dose de 100-600 ppm. Por outro lado, em Lepidoptera a intoxicação surge na dose de <1-50 ppm, confirmando a alta sensibilidade das espécies dessa ordem a este composto (Mordue –Luntz & Nisbet, 2000).

Autores como GripWall (1999) afirmaram que a diferença de sensibilidade dos insetos a esse composto, torna a azadiractina um bioinseticida seletivo, podendo devido a isso ser usado junto com inimigos naturais no Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Já é bem estabelecido que baixas concentrações de azadiractina prejudicam o sistema reprodutor e a espermatogênese de certos insetos. Esse fenômeno de alterações na reprodução foi reportado por Linton *et al.* (1997) em machos do inseto praga gafanhoto-do-deserto (*Schistocerca gregaria*). Estes autores observaram uma redução nas dimensões testiculares e a interrupção da divisão meiótica durante a metáfase, levando a não produção de espermatozoides nesse gafanhoto. Essa interrupção da meiose na espermatogênese pode ocorrer por interação da azadiractina com os microtúbulos durante a metáfase, impedindo assim, a separação dos cromossomos homólogos pelos microtúbulos do fuso mitótico (Mordue-Luntz & Nisbet, 2000).

Além disso, Shimizu (1988) observou a ocorrência de degeneração dos espermatócitos em machos de *Mamestra brassicae* (Lepidóptera) em diapausa quando esses eram expostos a apenas 3 ppm de azadiractina. E em testículos de *Heteracris littoralis* (Orthoptera) submetidos a doses de 25 ppm de azadiractina houve degeneração de espermátides, presença de vacúolos na matriz e desorganização dos feixes de espermatozoides (Ghazawi *et al.* 2007).

Apesar das alterações morfológicas nas células germinativas ao longo da espermatogênese serem conservadas entre algumas ordens de insetos, estes resultados mostram que existe uma diversidade na fisiologia reprodutiva, pois a concentração de 30ppm de azadiractina não alterou a produção de espermatozoides em *P. nigrispinus*, sendo completamente preservado o processo espermatogênético.

Esta conservação das funções reprodutivas em *P. nigrispinus* tratados com azadiractina está de acordo com resultados obtidos em laboratório mostrando que

machos tratados apresentam a mesma capacidade de fertilização de ovos que machos não tratados (Mourão, 2008).

Além disso, é provável que espermatozoides de alguns insetos só sejam sensíveis a azadiractina quando esta encontrar-se em altas concentrações durante alguns estágios específicos do desenvolvimento destes (Nisbet *et al.* 1996).

Portanto, visto que o predador *P. nigrispinus* é eficaz para o controle natural de insetos praga (Zanuncio *et al.* 1994) e possui sua morfologia testicular e espermatogênese preservadas ao ter contato com a azadiractina, essa substância é uma opção a ser utilizada em projetos de Manejo Integrado de Pragas em concomitância com a liberação desse inimigo natural na cultura.

6. Referências Bibliográficas

- Araújo, V. A.; Lino-Neto, J.; Francisco de Sousa Ramalho, F. S.; Zanuncio, J. C.; Serrão, J. E. 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron*, 42: 560–567.
- Boaretto, M. A. C.; Brandão, A. L. S. 2000. Manejo integrado de pragas. Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, UESB. Vitória da Conquista, BA. Acessado em: 25 de Fevereiro de 2013. Disponível em: <http://www.uesb.br/entomologia/manejo.html>
- Bowen, R.H. 1922. Studies on insect spermatogenesis. *Proc. Amer. Acta Arts Sci.* 57,391–423.
- Chapman, R. F. 1974. Chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: A review. *Bulletin of Entomological Research*, 64, 339-363.
- Chapman, R.F. 1998. *The Insects: structure and function*. 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press, 788.
- CóndorGolec, A. F. 2007. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticides on parasitoids. *Revista Peruana de Biología*, 14(1), 069-074.
- Cruz-Landim, C. 2004. *Biologia do desenvolvimento em abelhas*. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro. Capítulo 2. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carminda.html>>. Acessado em: 18/02/2013.

- De Clercq, P.; Mohaghegh, J.; Tirry, L. 2000. Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control*, 18, 65-70.
- Degrande, P. E.; Reis, P. R.; Carvalho, G. A.; Belarmino, L. C. 2002. Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais. In: Parra J R P, Botelho P S M, Corrêa-Ferreira B S, Bento J M S. (Ed.). *Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e predadores*. Manole, São Paulo, 75-81.
- Dethier, V. G. 1982. Mechanisms of host plant recognition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 31, 49-56.
- Dumser, J. B. 1980. The regulation of spermatogenesis in insects. *Annual Review of Entomology*, 25, 341–369.
- Evangelista Jr., W. S.; Silva-Torres, C. S. A.; Torres, J. B. 2002. Toxicidade de Lufenurom para *Podisus nigrispinis* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 31, 319-325.
- Fernandes, P. A. 2002. Estudo comparativo da espermiogênese normal e diapausica em insetos pertencentes ao complexo percevejo da soja (Hemiptera: Pentatomidae). Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Programa de Pesquisa e Pós-graduação em Biologia Celular, Universidade de Campinas, Campinas, SP. Acessado em: 04 de Fevereiro de 2013. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000239021>.
- Ghazawi, N.A.; El-Shranoubi, E.D.; El-Shazly, M.M.; Abdel Rahman, K.L. 2007. Effect of azadiractin on mortality rate and reproduction system of grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera-Acrididae). *J. Orthop. Res*, 16: 57-65.
- González, C.; Tavosanis, G.; Mollinari, C. 1998. Centrosomes and microtubule organisation during *Drosophila* development. *J. Cell. Sci*, 111:2697–2706.
- Goring, A. H. R.; Picanço, M. C.; Leite, G. L. D.; Suinaga, F. A.; Zanuncio, J. C. 2003. Seletividade de inseticidas a *Podisus rostralis* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) predador de lagartas desfolhadoras de eucalipto. *Revista Árvore*, 27(2) 263-268.
- Gottardo, M.; Mercati, D.; Dallai, R. 2012. The spermatogenesis and sperm structure of *Timemapoppensis* (Insecta: Phasmatodea). *Zoomorphology*, 131:209–223.
- Grazia, J.; Hildebrand, R. 1986. Hemípteros predadores de insetos. In: Encontro Sulbrasileiro de Controle Biológico de Pragas, Passo Fundo, RS, 21-37.

- Gripwall, E. 1999. The effect of a neem-based insecticide on three important greenhouse pests. *Integrated Control in Glasshouses*. IOBC Bulletin, 22(1), 97-100.
- Hoage, T. R.; Kessel, R. G. 1968. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *J. Ultrastructure Research*, 24: 6-32.
- Klowden, M. J. 2007. *Physiological Systems in Insects*. New York: Academic Press.
- Lemos, W. P.; Serrão, J. E.; Ramalho, F. S.; Cola Zanuncio, J. C.; Lacerda, M. C. 2005. Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology*, 65(1), 91-96.
- Linton, Y. M.; Nisbet, A. J.; Mordue (Luntz), A. J. 1997. The effects of azadirachtin on the tests of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 43, 1077-1084.
- Medeiros, R. S.; Lemos, W. P.; Ramalho, F. S. 1998. Efeitos da temperatura no desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), predador do curuquerê-do-algodoeiro (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 42, 121-130.
- Metcalf, R. L.; Luckmann, W. H. 1994. *Introduction to insect pest management*. 3th ed. New York: Copyright, 129-139.
- Mordue (Luntz), A. J.; Nisbet, A. J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(4), 615-632.
- Mordue (Luntz), A. J.; Blackwell, A. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology*, 39, 903-924.
- Mourão, S. A. 2008. Toxicidade dos inseticidas metamidofós, imidaclopride + beta-ciflutrina e extrato de neem (*Azadirachta indica*) ao predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em plantas de soja. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Acessado em: 04 de Fevereiro de 2013. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/17/TDE-2008-05-5T055640Z-1167/Publico/texto%20completo.pdf.
- Nisbet, A. J.; Mordue (Luntz), A. J.; Williams, L. M.; Hannah, L.; Jennens, L.; Ley, S. V.; Mordue, W. 1996. Autoradiographic localization of [22,23-3H2]

d. hydroazadirachtin binding sites in desert locust testes and effects of Azadirachtin on sperm motility. *Tissue and Cell*, 28 (6) 725-729.

Schrader, F.; Leuchtenberger, C. 1950. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Exp. Cell Res.* 1, 421-452.

Schultz, W. D. and Schluter, W. 1984. Structural damages caused by neem in *Epilachna varivestis*. A summary of histological and ultrastructural data. II tissue affected in adults. In: *Proc 2nd Int Neem Conf.* (eds Schmutterer & Ascher) GTZ Eschborn, Germany. 252-237.

Shimizu, T. 1988. Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, *in vitro*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 46, 197-199.

Soares, J. J.; Busoli, A. C. 2000. Efeito de inseticidas em insetos predadores em culturas de algodão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(9), 1889-1894.

Torres, J. B.; Zanuncio, J. C.; Zanuncio, T. V. 1996. Produção e uso de percevejos predadores no controle biológico de pragas florestais. In: *Workshop sobre Proteção Florestal do Mercosul*, Santa Maria, UFSM, 41-51.

Torres, J. B.; Zanuncio, J. C.; Moura, M. A. 2006. The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in Eucalyptus forests in Brazil. *Perspective In Agriculture Veterinary Science Nutrition And Natural Resources*, Londres, v. 15, n.1, p. 1-18.

Vivan, L. M.; Torres, J. B.; Veiga, A. F. S. L.; Zanuncio, J. C. 2002. Comportamento de predação e conversão alimentar de *Podisus nigrispinus* sobre a traça-do-tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(5), 581-587.

Zanuncio, J. C.; Alves, J. B.; Sartório, R.C.; Leite J.E.M. 1992. Métodos para criação de hemípteros predadores de lagartas. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 21: 245-251.

Zanuncio, J. C.; Alves, J. B.; Zanuncio, T. V.; Garcia, J. F. 1994. Hemipterous predators of eucalyptus defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, 65(1), 65-73.