

## SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Desenvolvimento Ovariano e Influência da Cópula na Maturação dos Ovírios de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)

FÁBIO C A DOSSI, FERNANDO L CÔNSOLI

*Lab de Interações em Insetos, Depto de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP, Av Pádua Dias 11, 13418-900 Piracicaba, São Paulo, Brasil; fabiodossi@biologo.bio.br; fconsoli@esalq.usp.br**Edited by Fernando B Noll – UNESP**Neotropical Entomology 39(3):414-419 (2010)*Ovarian Development and Analysis of Mating Effects on Ovary Maturation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)

**ABSTRACT** - As many other insects with a restricted diet, the citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, which vector the causing agent of the *Huanglongbing*, the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., is intimately associated with symbiotic microorganisms. These mutualist symbionts play a key role on their host nutritional ecology, and are vertically transmitted to the progeny. However, despite the role symbionts play on host development and reproduction, and the growing opportunities of exploitation of the association insect-symbiont to control insect vectored-pathogens, there are very few studies on the host reproductive biology and on the symbiont transovarial transmission. Therefore, we aimed at analyzing the ovary development during *D. citri* adulthood, and at verifying for the mating requirement as a trigger to initiate ovary development. Newly-emerged *D. citri* females were grouped as virgin or mated and ovary development was observed during adulthood. Newly-emerged females have immature ovaries, and ovaries remain without any mature eggs until females mate. Once female mates, the vitellogenesis synthesis and uptake are stimulated, and oocytes are quickly developed. Oocytes maturation in ovarioles is metachronic, with only one oocyte developing at a time in each oogenic cycle. Morphological observations of the reproductive system including the ovaries and spermatheca, after the first cluster of eggs is laid, indicated *D. citri* is polyandrous, and may require multiple mating to develop additional oogenic maturation cycles.

**KEY WORDS:** Reproductive strategy, symbiont, reproduction

Insetos apresentam diferentes estratégias reprodutivas, as quais influenciam a alocação e utilização de nutrientes adquiridos nas fases imatura e adulta (Alcock & Gwynne 1991, Huffaker & Gutierrez 1999). Assim, os recursos nutricionais adquiridos na fase imatura podem ser utilizados para o desenvolvimento do soma e de reservas nutritivas, exigindo a aquisição de nutrientes na fase adulta para a sustentação das atividades reprodutivas. Podem também ser utilizados para o desenvolvimento do aparelho reprodutor, dando origem a adultos aptos a se reproduzirem logo após a emergência. Fêmeas que utilizam nutrientes da fase adulta para sustentar suas atividades reprodutivas podem ser beneficiadas com moléculas nutritivas e/ou reguladoras presentes no líquido seminal, que são transferidas às fêmeas podem ter função nutricional na sustentação das atividades metabólicas destas ou serem utilizados diretamente como recursos nutricionais para a sustentação do desenvolvimento embrionário da progênie. O líquido seminal ainda pode conter moléculas reguladoras que irão induzir alterações

fisiológicas nas fêmeas, levando-as a iniciar o processo de síntese de vitelogenina e de maturação do ovário e/ou alterar suas respostas comportamentais (Adams 2000, Liu & Kubli 2003, Jervis & Ferns 2005).

A variação encontrada quanto ao processo de maturação do ovário de insetos tem implicações adaptativas, influenciando o sucesso reprodutivo da fêmea. Assim, fêmeas que apresentam capacidade reprodutiva elevada logo após a emergência potencializam a deposição do maior número possível de ovos no início de sua vida adulta, mas reduzem as chances de responder às limitações temporais da disponibilidade de hospedeiros adequados. Por outro lado, fêmeas que apresentam um reduzido número de ovos maduros ao emergir, têm como fator limitante ao seu sucesso reprodutivo o fato de contar apenas com uma fração de sua capacidade reprodutiva total, ficando sujeita às oportunidades futuras para a produção e deposição de frações complementares de ovos, até atingir sua capacidade reprodutiva total (Heimpel & Rosenheim 1998, Jervis *et al* 2001, Ellers & Jervis 2003). Além das implicações dessas diferentes estratégias

na diversidade e evolução dos diferentes modos de vida dos insetos, o padrão de maturação do ovário e desenvolvimento dos oócitos traz informações importantes sobre a estratégia reprodutiva de insetos e, conseqüentemente, da dinâmica populacional dos mesmos (Wheeler 1996, Papaj 2000, Vanderkerkhove *et al* 2006).

O psilídeo dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama, tornou-se uma das mais sérias ameaças à citricultura nacional devido a sua relação com a bactéria causadora do *Huanglongbing*. Dessa forma, o conhecimento da estratégia reprodutiva desse inseto poderá fornecer informações relevantes que permitam compreender sua dinâmica populacional, auxiliando no seu monitoramento e controle. Ainda, informações sobre a estratégia reprodutiva desse inseto e, conseqüentemente, do processo de maturação de seus ovários, dariam subsídios para estudos do processo de transmissão transovariana dos simbiontes a ele associados. Os simbiontes apresentam relação de mutualismo com seu hospedeiro, sendo fundamentais para o crescimento e desenvolvimento adequado de seu hospedeiro, garantindo o seu sucesso reprodutivo. A contribuição dos simbiontes à aptidão biológica do hospedeiro tem sido explorada no desenvolvimento de técnicas de controle de patógenos associados a insetos vetores (Beard *et al* 1998, Douglas 2007, Feldhaar & Gross 2009). Apresenta-se também como uma possível alternativa no controle da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, causadora do *Huanglongbing* em citros.

Assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar a maturação dos ovários de *D. citri* ao longo de sua vida adulta e a sua resposta à cópula, como etapa inicial na determinação da estratégia reprodutiva utilizada por esse inseto, da qual faz parte a transmissão transovariana de endossimbiontes fundamentais a esse hospedeiro.

## Material e Métodos

Os espécimes de *Diaphorina citri* Kuwayama empregados nos experimentos foram provenientes de população mantida em gaiolas teladas, sob condições controladas ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR, fotofase 14h), utilizando-se mudas de murta, *Murraya paniculata*, como substrato de criação (Tsai & Liu 2000, Nava *et al* 2007).

**Desenvolvimento ovariano e influência da cópula na maturação dos ovários de *D. citri*.** Adultos de *D. citri* recém-emergidos ( $\leq 12\text{h}$ ) 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). Segundo Wenninger & Hall (2007), *D. citri* torna-se apta à cópula em torno de 2-3 dias após a emergência. Contudo, testes preliminares indicaram alta heterogeneidade quanto ao período de pré-cópula do inseto, optando-se por permitir a cópula apenas no décimo dia após a emergência. Dessa forma, machos e fêmeas foram sexados, com base no dimorfismo da terminália, e acondicionados em gaiolas (proporção 1♀: 1♂) com as mesmas dimensões supracitadas, permitindo-se o acasalamento por 24h, 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 após a cópula (décimo dia após a emergência) a intervalos de 48h, 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 ovariolos, se i) pré-vitelogênicos, ii) vitelogênicos ou coriogênicos e iii) pós-oviposição.

**Obtenção de ovários.** 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 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3 mM, KCl 182 mM, NaCl 46 mM, Tris base 10 mM, HCl 1N para ajustar pH 7,2) (CSH Protocols 2007), sob microscópio estereoscópico Motic SMZ-168. Os ovários foram transferidos imediatamente após a extração para solução fixadora condizente ao tratamento subsequente.

**Preparação de ovários para análise em montagem total.** Ovários de *D. citri*, previamente fixados em solução AFATD (75,0 ml etanol 96%, 10,0 ml formaldeído 40%, 5,0 ml ácido acético, 10,0 ml dimetilsulfóxido, 1g ácido tricloroacético) por 2h 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 2,5 N ácido clorídrico (5 min) (Martínez 2002). 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 Entelan® (Merck) sobre lâmina de microscopia. 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.).

**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  $\text{CaCl}_2$ ), por 24h. 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 24h, seguido por historresina pura por 24h a  $4^\circ\text{C}$ . Logo após, os ovários foram incluídos em solução de inclusão Leica Historesin® e mantidos à temperatura ambiente por 48h para polimerização do substrato.

Cortes semi-finos (1 a 4  $\mu\text{m}$ ) 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) durante 1 min (Behmer *et al* 2003). 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 de montagem em Entelan® (Merck) sobre lâmina de microscopia. A análise e registro fotográfico do material processado foram realizados em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 equipado com câmera Axicam MRC (Carl Zeiss®).

**Microscopia eletrônica de varredura.** Os ovários e espermatecas foram dissecados em solução fisiológica de Ringer, fixados em solução Karnovski (3% glutaraldeído + 3% paraformaldeído em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,2, contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>), por 24 h a 4°C. Em seguida, o material foi lavado em tampão cacodilato 50 mM, acrescido de 5 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7,2) (3 banhos de 10 min/cada), pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão (60 min) e desidratado em concentrações crescentes de acetona

(30, 50, 70, 90, 100%) antes da secagem ao ponto crítico (CPD-030 Balzers, BAL-TEC), montagem em “stubbs” e metalização com ouro (SCD-050 Sputter Coater, BAL-TEC). A análise e o registro fotográfico foram realizados em microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO 435 VP (Carl Zeiss®).

## Resultados

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 (Figs 1, 3), apresentaram rápido desenvolvimento e maturação de seus ovários (Figs 2, 4).

Em algumas das fêmeas copuladas foi possível observar ovários de aspecto pós-oviposição e espermatecas vazias, mas ainda dilatadas, 48h após a cópula (Fig 1). Entretanto, essa condição tornou-se mais frequente após o quarto dia pós-cópula, estendendo-se até o oitavo dia (= último

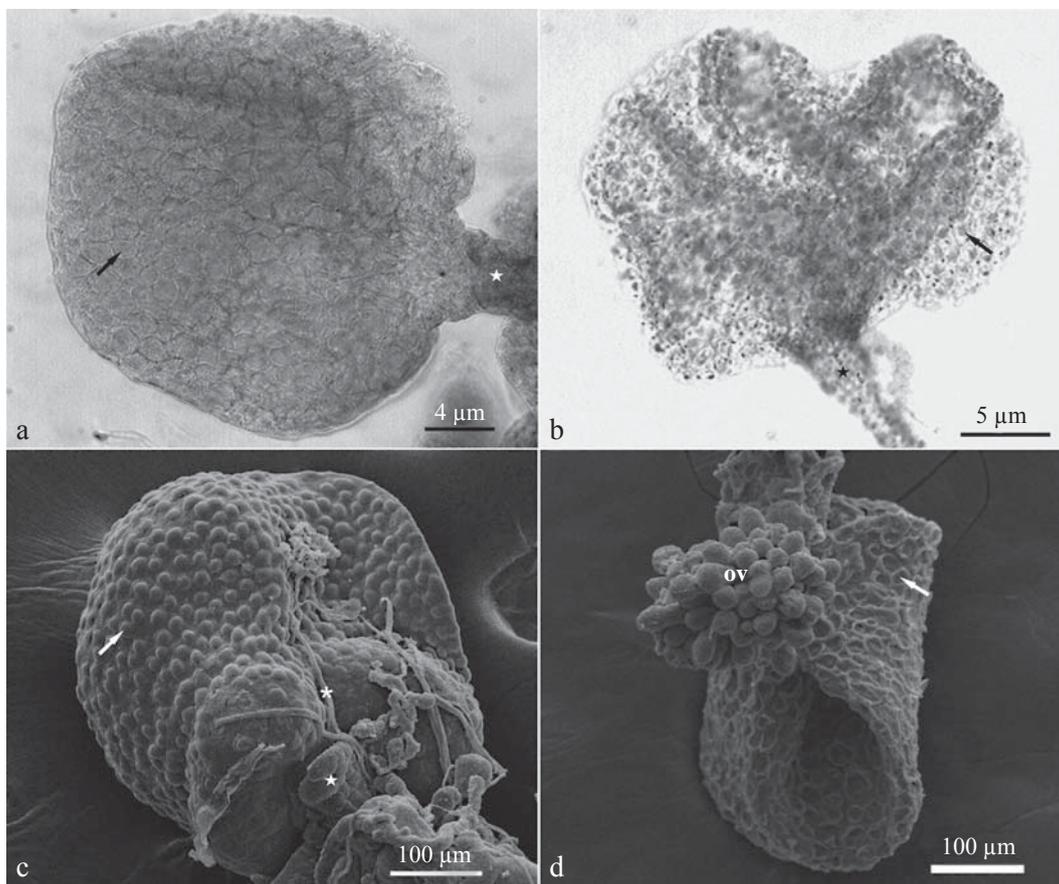


Fig 1 Aspecto morfológico da espermateca de *Diaphorina citri*. a e c), espermateca de formato sacciforme, túrgida em decorrência de inseminação, constituída por epitélio secretor simples (→). Coloca-se na região ventral do abdome, próximo aos ovários, sendo sustentada na hemocele por ramificações traqueais (\*) e tecido adiposo (★), e apresenta duto (★) curto e lúmen delgado (não-mostrado); b e d), espermateca vazia, após ciclo oogênico, em fêmeas na ausência de recópula, mostrando células epiteliais (→), duto da espermateca (estrela) e ovário pós-oviposição (ov).

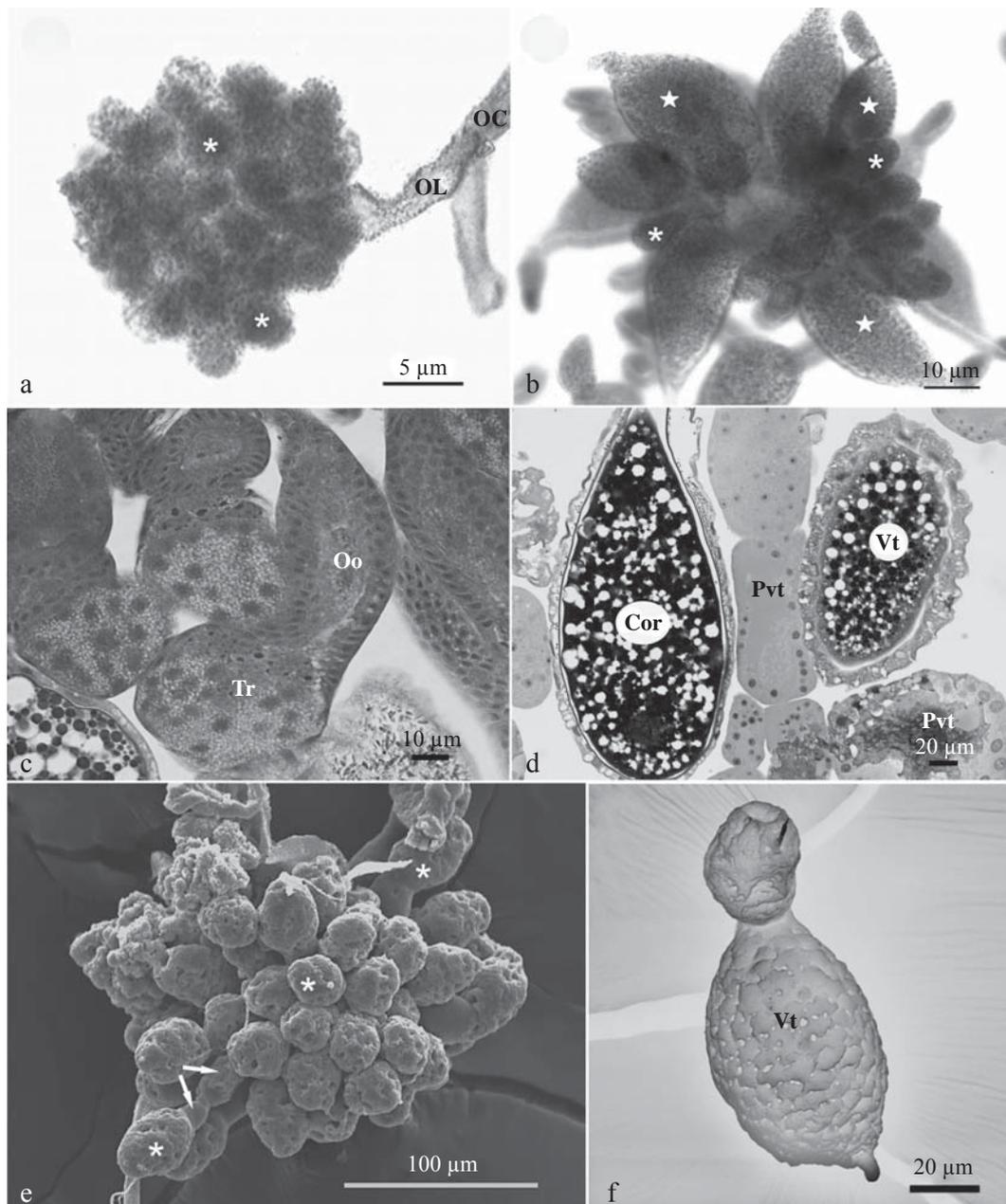


Fig 2 Ovários de *Diaphorina citri*. a-b) ovários em montagem total, ilustrando ovaríolos pré-vitelogênicos (\*) e vitelogênicos (★); c) ovaríolo pré-vitelogênico em corte longitudinal, mostrando oócito (Oo) no vitelário e a câmara trófica sincicial (Tr); d) ovaríolos em diferentes estágios de maturação, destacando oócito pré-vitelogênico em cortes longitudinal e transversal (Pvt), oócito vitelogênico em corte tangencial (Vt), e oócito coriogênico (Cor) em corte longitudinal; e) ovário pós-oviposição, apresentando ovaríolos (\*) com a região do vitelário e pedicelo distendida (→); f) ovaríolo vitelogênico (Vt) (imagem tratada com o filtro "invert" do Adobe Photoshop CS4<sup>(R)</sup>).

dia analisado) (Figs 3, 4). Apenas fêmeas copuladas apresentaram maturação dos ovaríolos (Tabela 1). Os ovários após a oviposição, observados dois, quatro, seis e oito dias pós-cópula, assemelham-se aos ovários pré-vitelogênicos, mas apresentam câmara trófica e vitelário maiores que os observados em ovaríolos virgens. Além disso, apresentam região basal conspícua, correspondente ao vitelário e pedicelo, onde houve o último oócito em crescimento.

## Discussão

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 (Hammack 1999, Adams 2000, Lemos *et al* 2005). Outra fonte comum de nutrientes utilizada por fêmeas sinovigênicas é o fluido seminal produzido pelo

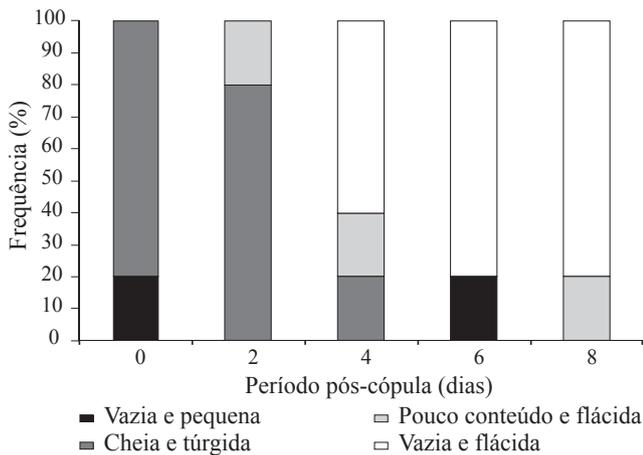


Fig 3 Aspecto morfológico da espermateca de fêmeas de *Diaphorina citri* virgens e acasaladas, como indicativo de cópula e utilização do fluido seminal no decorrer do respectivo ciclo oogênico.

macho (Friedel & Gillott 1977, Hayashi & Kamimura 2002). 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, Gillott 2003).

A importância do papel da cópula e, consequentemente, da transferência de fluídos seminais para a sustentação do processo reprodutivo de fêmeas pode ser percebida em espécies poliândricas ou que necessitam da realização de múltiplas cópulas para a maximização de sua reprodução (Fox 1993, Wheeler 1996, Wolfner 2002).

A condição imatura do ovário de *D. citri* pós-emergência e o desenvolvimento do ovário apenas em fêmeas copuladas indicam a importância da cópula no processo reprodutivo do inseto. Os resultados obtidos quanto ao processo de desenvolvimento de ovos, em que foi observada a completa

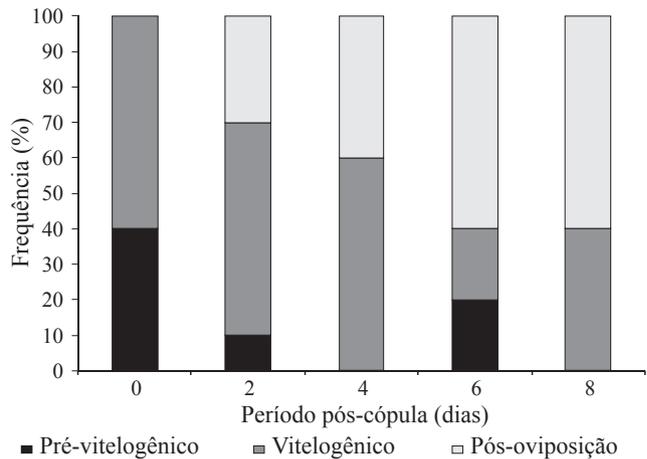


Fig 4 Influência da cópula na maturação dos ovários de *Diaphorina citri* relacionada à predominância de ovaríolos em pré-vitelogênese, vitelogênese ou pós-oviposição.

utilização do conteúdo da espermateca (fluídos seminais e 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, esse inseto parece necessitar de estímulos físicos (distensão da espermateca) e/ou químicos (moléculas sinalizadoras, nutrientes) produzidos via cópula, para o desenvolvimento de novos ciclos oogônicos. Porém, a natureza dos fatores envolvidos nessa estimulação ainda necessita de investigação detalhada.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processo 2004/14215-0) e bolsa de estudo (processo 2006/59300-0), e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA, pelo suporte técnico prestado na realização desse trabalho e pela disponibilização dos equipamentos.

Tabela 1 Maturação do ovário de *Diaphorina citri* em condições controladas (28 ± 2°C, 60 ± 10% UR, fotofase 14h) ao longo do seu desenvolvimento reprodutivo e o efeito da cópula na maturação dos ovários, baseando-se em aspectos morfológicos.

Condição das fêmeas	Período de avaliação (dias) após emergência / cópula											
	1º dia		10º / 0		12º / 2º		14º / 4º		16º / 6º		18º / 8º	
	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário	Espermateca	Ovário
Recém-emergidas	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Virgem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Copulada	-	-	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2

Parâmetros observados para: Espermateca: 0) vazia-virgem, 1) cheia, 2) vazia-pós-oviposição; Ovários: 0) imaturo ou pré-vitelogênico, 1) vitelogênico e/ou coriogênico, 2) pós-oviposição (ovariolos vazios).

## Referências

- Adams T S (2000) Effect of diet and mating status on ovarian development in a predaceous stink bug *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann Entomol Soc Am* 93: 529-535.
- Alcock J, Gwynne D T (1991) Evolution of insect mating systems: the impact of individual selectionist thinking, p.11-36. In Bailey W J, Ridsdill-Smith J (eds) *Reproductive behavior of insects*. London, Chapman & Hall, 356p.
- Beard C B, Durvasula R V, Richards F F (1998) Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerg Infect Dis* 4: 581-591.
- Behmer O A, Tolosa E M C, Freitas Neto A G, Rodrigues C J (2003) Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Barueri, Manole, 331p.
- Cold Spring Harbour Protocols (2007) *Drosophila ringer's* solution. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/full/2007/7/pdb.rec10919>>. Acesso em: 15 jun. 2007.
- Douglas A E (2007) Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends Biotechnol* 25: 338-342.
- Ellers J, Jervis M A (2003) Body size and the timing of egg production in parasitoid wasps. *Oikos* 102: 164-172.
- Feldhaar H, Gross R (2009) Insects as host for mutualistic bacteria. *Int J Med Microbiol* 299: 1-8.
- Fox CW (1993) The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Oecologia* 96: 139-146.
- Friedel T, Gillott C (1977) Contribution of male-produced proteins to vitellogenesis in *Melanoplus sanguinipes*. *J Insect Physiol* 23: 145-151.
- Gillott C (2003) Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu Rev Entomol* 48: 163-184.
- Hammack L (1999) Stimulation of oogenesis by proteinaceous adult diets for screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Bul Entomol Res* 89: 433-440.
- Hayashi F, Kamimura Y (2002) The potential for incorporation of male derived proteins into developing eggs in the leafhopper *Bothrogonia ferruginea*. *J Insect Physiol* 48: 153-159.
- Heimpel G E, Rosenheim J A (1998) Egg limitation in parasitoids: a review of the evidence and a case study. *Biol Contr* 11: 160-168.
- Huffaker C B, Gutierrez A P (1999) *Ecological entomology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley, 756 p.
- Jervis M A, Ferns P N (2005) The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. *Oikos* 107: 449-460.
- Jervis M A, Heimpel G E, Ferns P N (2001) Life history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. *J Anim Ecol* 70: 442-458.
- Lemos W P, Ramalho F S, Serrão J E, Zanuncio J C (2005) Morphology of female reproductive tract of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on different diets. *Braz Arch Biol Technol* 48: 129-138.
- Liu H, Kubli E (2003) Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9929-9933.
- Martínez I M (2002) Técnicas básicas de anatomía microscópica y morfometría para estudiar los insectos. *Bol. S.E.A.*, n. 30, p.187-195. Disponível em: <<http://entomologia.rediris.es/aracnet/9/metodologias/tecnicas/index.htm>>. Acesso em: 21 nov 2008.
- Nava D E, Torres M L G, Rodrigues M D L, Bento J M S, Parra J R P (2007) Biology of *Diphorina citri* (Hemiptera, Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *J Appl Entomol* 131: 709-715.
- Papaj (2000) Ovarian dynamics and host use. *Annu Rev Entomol* 45: 423-448.
- Tsai J H, Liu Y H (2000) Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *J Econ Entomol* 93: 1721-1725.
- Vandekerkhove B, Van Baal E, Bolckmans K, De Clercq P (2006) Effect of diet and mating status on ovarian development and oviposition in the polyphagous predator *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Biol Control* 39: 532-538.
- Wheeler D (1996) The role of nourishment in oogenesis. *Annu Rev Entomol* 41: 407-431.
- Wenninger E J, Hall D G (2007) Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Flo Entomol* 90: 715-722.
- Wolfner M F (2002) The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity* 88: 85-93.

Received 29/XI/08. Accepted 10/IX/09.