

**CLÁUDIA VÂNIA MIRANDA DE OLIVEIRA**

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE TRÊS ESPÉCIES DE  
BETHYLIDAE (HYMENOPTERA: CHRYSIDOIDEA)**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Viçosa  
Minas Gerais –Brasil  
2011

**CLÁUDIA VÂNIA MIRANDA DE OLIVEIRA**

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE TRÊS ESPÉCIES DE  
BETHYLIDAE (HYMENOPTERA: CHRYSIDOIDEA)**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 05 de agosto de 2011

---

Prof. Lúcio Antônio de O. Campos

---

Prof<sup>a</sup>. Mary Anne Heidi Dolder

---

Prof. Vinícius Albano Araújo

---

Prof<sup>a</sup>. Mariana Machado Neves

---

Prof. José Lino Neto  
(Orientador)

*“ É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é  
melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até  
o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me  
esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”*

Martin Luther King

Dedico este trabalho ao meu Senhor Jesus Cristo por ser minha fonte de luz e esperança, por guiar meus caminhos e por ter me concedido o dom da perseverança

Aqueles que lutam por mim e que foram meus maiores incentivadores para que eu chegasse até aqui, meus pais João Paulo (*in memoriam*) e Divaci, meus irmãos Ana Cléia, Ana Ruth, Ana Paula, James Paulo e João Paulo e meus sobrinhos Vinícius e Miguel

Amo vocês

*Feliz o homem que achou o saber e o homem que adquire a inteligência  
Mais vale ganhá-la do que a prata e adquirí-la do que possuir o ouro  
É mais preciosa do que as pérolas, e tudo que mais ama não a iguala.  
É árvore de vida a quem a elegeu e aquele que a retém torna-se feliz.  
(Provérbios, 2, 13-18).*

## AGRADECIMENTOS

Eis que chega o momento, diante dele, só tenho a agradecer... As lágrimas derramadas nos momentos de aflição e das muitas sensações de dúvidas e incertezas, hoje só engrandecem a doce e sublime sensação do conhecimento adquirido, do dever cumprido, do sonho realizado, dos amigos conquistados... Várias pessoas contribuíram para que tudo isso fosse possível! A todas elas registro minha imensa gratidão

Obrigada Meu Deus por teu incondicional amor, por toda inspiração concedida, por toda força e conforto nos momentos difíceis e por me fazer acreditar que quando desejamos verdadeiramente a realização de um sonho é possível.

Minha eterna gratidão aos meus amados e maravilhosos pais João Paulo (*in memoriam*) e Divaci pelo amor que sempre demonstraram. Obrigada pelo exemplo de força, honestidade, perseverança e sabedoria. Pai você estará sempre em meu coração! Mãe obrigada por me ajudar a superar os momentos difíceis.

Aos meus amados irmãos Ana Cléia, Ana Ruth, James Paulo, Ana Paula pelo amor, incentivo, amizade e cumplicidade. Em especial à Kéia e Rutinha. Kéia, obrigada pela inspiração que me incentivou a seguir meu caminho e pelas doces e abençoadas palavras que sempre me confortaram nos momentos de aflição. Rutinha, obrigada por me entender e abrir mão da nossa convivência diária e por sempre me ajudar quando precisei, até mesmo para ceder meus caprichos.

Aos meus lindos e amados sobrinhos Vinícius e Miguel por encherem minha vida de tanta alegria.

Ao Daniel Fagundes por todo carinho e apoio, principalmente no final do Doutorado. Obrigada pelos momentos tão felizes!

Ao meu orientador José Lino Neto por ter aceitado o desafio de me orientar, pela paciência, compreensão, amizade e oportunidade de amadurecimento científico e pessoal.

À Profa Maria Aparecida Alves Silva pelo exemplo de simplicidade, competência e dedicação. Cida, muito obrigada, sem a sua coragem e generosidade este sonho não teria sido realizado.

À Profa Karina Carvalho Mancini que aceitou ser minha Co-orientadora e mais uma vez com imensa dedicação, competência, compreensão e amizade, compartilhou seus conhecimentos.

À Profa Mariana Machado Neves pela linda amizade e contribuição neste trabalho.

À Dra. Mary Anne Heidi Dolder por ter sempre me recebido tão bem em seu laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (IB-UNICAMP) e pela contribuição neste trabalho.

Ao professor Lúcio Antônio de Oliveira Campos. Obrigada pelos conhecimentos, profissionalismo e gentileza de sempre querer ajudar.

Um agradecimento especial ao meu grande amigo Luiz Fernando Gomes (o Fernandinho), por ser um amigo fiel e sempre disposto a me ajudar. Obrigada pelos ensinamentos, sugestões, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelas alegrias compartilhadas e, principalmente, pela amizade e cumplicidade que construímos. Sem você teria sido impossível!

Aos meus demais irmãozinhos de laboratório Max, Ana Paula, Patrícia, Felipe Bertholdi (o Bife), Jane, Vinícius, Michele, Edalton, Fran, Glenda e Hellen pela amizade e companherismo nessa caminhada, pela contribuição na construção desse trabalho e simplesmente por tornarem minha vida em Viçosa mais feliz.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, em especial, Prof. José Eduardo Serrão pela confiança e oportunidade concedida

A todos os colegas do laboratório de Biologia estrutural e do programa de Biologia Celular e Estrutural pela amizade, ensinamentos, troca de experiências, excelente convivência e por tornarem minha vida em Viçosa mais divertida: Alex (sempre disponível a ajudar), Odair, Lívia Tomé, Edson, Arlete, Mírian, Manuella, Bruna Moraes, Lílian, Sirlene Sartori, Edmilson, Katiane, Kenner, Marcília, Dani, Maytê, Carol, Suellem, Daniel Basile, Alípio, Silvita, Douglas, Michele, Kívia, Juliana, Fabíola, Eudes, Tetsu, Diego, Alípio, Diane, Madu, Ana Paula.

À professora Sílvia Pompolo pela disponibilidade em ceder seu laboratório e sempre ter me acolhido tão bem.

À professora Juliana Rocha pela amizade e pelas belas palavras que sempre me confortaram. Obrigada Jú!

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural: Sérgio da Matta, Clóvis, Leandro, Denilce, Mara, João Marcos, Everaldo, Izabel, Adilson, Tânia e Elza, Sérgio de Paula.

Às Funcionárias do Departamento de Biologia Geral Diana, Maristela, em especial à nossa secretária Beth pela competência, gentileza e por ter sempre se desdobrado para atender as minhas necessidades.

À professora Uyrá Zama pelas sugestões ensinamentos e amizade.

Ao Pedro Brito pela amizade e pela gentil disponibilidade em ajudar na construção deste trabalho.

A equipe do núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise, Karla, Gilmar e Patrícia, em especial à Cláudia Vanneti pelo apoio, confiança e pela agradável convivência.

À Profa Sônia Bão e toda sua equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNB, pela acolhida e disponibilidade dos equipamentos.

As queridas amigas de república Carla e Brenda pelo carinho, convivência diária e apoio nos momentos difíceis. Vou sentir muita falta dos nossos brigadeiros com pipoca!

As minhas irmãs de coração Deise e Débora pela ótima convivência em Viçosa, carinho e apoio nos momentos difíceis. Deise amiga, sentirei falta das nossas caminhadas na reta da UFV. Obrigada pela amizade incondicional!

Ao meu tio José Guilherme de Miranda por sempre torcer por mim. Obrigada pelo seu exemplo de vida que me ajudou a percorrer os meus caminhos.

A todos familiares e amigos que sempre me incentivaram nos momentos de dificuldades, em especial, minha amiga Jaci Lopes, meu cunhado Alexandre e cunhada Ana Maria, minha madrinha Nininha, meus primos Ailton, Ana, Suely e Andréa Amorim e amigos Riviani, Maurinele, Rodrigo, Félix, Lyeuwa, Ninha, Juciane, Karina Furieri, Iracenir, Katiene.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso. Além da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido, através da bolsa de estudos.

Ao Governo de Arapiraca em especial ao Prof. César Fontes (*in mormoriam*) pelo apoio e concessão do meu afastamento para Pós-Graduação.

Ao povo brasileiro por ter custeado meus estudos.

Agradeço a todos aqueles que um dia expressaram qualquer incentivo, uma palavra amiga e que torceram por mim, o meu “ Muito obrigada”.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. Introdução Geral</b> .....	1
1.1. A Ordem Hymenoptera.....	1
1.2. A família Bethylidae .....	4
1.3. Morfologia Geral dos Espermatozoides em Hymenoptera .....	6
1.4. Referências Bibliográficas .....	8
<b>2. Objetivos</b> .....	16
<b>3. Artigos</b> .....	17
3.1. Capítulo 1: Morfologia dos espermatozoides de <i>Dissomphalus connubialis</i> (Ashmead) (Hymenoptera: Bethylidae). .....	17
3.2. Capítulo 2: Morfologia dos espermatozoides de <i>Cephalonomia</i> <i>stephanoderis</i> (Betrem) (Hymenoptera: Bethylidae) .....	38
3.3. Capítulo 3: Morfologia dos Espermatozoides de <i>Apenesia sp.</i> (Hymenoptera: Bethylidae).....	60
<b>4. Conclusões Gerais</b> .....	81

## RESUMO

OLIVEIRA, Cláudia Vânia Miranda de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Morfologia dos espermatozoides de três espécies de Bethylidae (Hymenoptera: Chrysoidea)** Orientador: José Lino Neto.

Hymenoptera é uma das mais numerosas entre as ordens dos insetos, com mais de 190.000 espécies descritas em todo o mundo. Esta ordem é composta por aproximadamente 80 famílias, divididas nos táxons 'symphyta' (O grupo basal) e Apocrita. Os Apocrita são os mais estudados, sendo subdivididos em dois grupos: Parasitica e Aculeata. A ampla variedade de padrões ecológicos determinou uma grande diversidade de estruturas morfológicas associadas à reprodução, capazes de suportar análises filogenéticas. A filogenia de Hymenoptera ainda permanece ambígua, havendo muitas controvérsias sobre as relações de diversas famílias dentro da ordem. Em Bethylidae, por exemplo, as relações filogenéticas internas são bastante confusas. O estudo da morfologia dos espermatozoides tem sido usado para auxiliar na elucidação de problemas filogenéticos e taxonômicos. Neste trabalho descrevemos a morfologia dos espermatozoides de três espécies da família Bethylidae. Para isso, utilizamos as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Comparando os dados desse estudo com aqueles disponíveis na literatura, observamos que algumas características como a presença do material intermitocondrial, de uma camada extracelular associada ao ápice dos espermatozoides e, ainda, os microtúbulos acessórios sendo os primeiros a finalizarem na porção final do flagelo em diferentes espécies de Bethylidae, parecem fornecer informações importantes para serem utilizadas na filogenia de Hymenoptera. Entretanto, esses dados devem ser associados aqueles de morfologia, comportamental e molecular, para que análises futuras sejam mais consistentes e conclusivas.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Cláudia Vânia Miranda de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Sperm morphology of three species of Bethylidae (Hymenoptera: Chrysidoidea)**. Adviser: José Lino Neto.

Hymenoptera is one of the largest orders among the insects, with more than 190.000 described species worldwide. This order is composed of about 80 families divided into 'symphyta' (most basal) and Apocrita. The Apocrita are the more intensively studied, subdivided in two groups Parasitica and Aculeata. A wide range of ecological patterns led to a great diversity of morphological structures associated with reproduction and useful for phylogenetic analysis. The phylogeny of the Hymenoptera still remains ambiguous and there are many controversies about the relationship of several families. In Bethylidae, for exemple the internal phylogenic relations are very confusing. The study of sperm morphology has been extensively used to aid in elucidating phylogenetic and taxonomic problems. Here we describe the morphology of spermatozoa of three species of the Bethylidae family. For this light microscopy and transmission electron microscopy were utilized. Comparing data from these studies to those available in the literature. We observed that some features like the presence of intermitochondrial material, the extracellular layer associated with the sperm apex and also accessory microtubules, which are the first to finish at the last portion of the flagellum in different species of Bethylidae. Appear to provide important information to be used in the phylogeny of Hymenoptera. However this data should be associated with those of morphology, behavioral and molecular biology morphology so that future analyses will be more consistent and conclusive.

## 1. Introdução Geral

### 1.1. A ordem Hymenoptera

Hymenoptera é um dos mais numerosos grupos de insetos, com aproximadamente 115 mil (Triplehorn & Johnson, 2005) a 199 mil espécies descritas em todo o mundo (Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla, 1999), mas estima-se que esta ordem compreenda cerca de 600.000 a 1.200.000 espécies (Grimaldi & Engel, 2005), excedendo em número de espécies os Lepidoptera (borboletas e mariposas) e Diptera (moscas) e equivalendo aos Coleoptera (besouros) (Gaston, 1991; Hanson & Gauld, 1995).

Mesmo com toda esta riqueza de espécies, a importância dos Hymenoptera está nas diversas funções que eles desempenham na natureza e nos benefícios fornecidos ao homem. Dentre os insetos, é provavelmente o grupo que causa maior impacto econômico. Muitas de suas espécies são parasitóides ou predadoras e atacam um número igualmente grande de outros insetos, sendo considerada a ordem de insetos mais importante no controle de pragas (Hanson, 1995). A polinização das angiospermas depende em grande parte das abelhas e de outros Hymenoptera (Hanson & Gauld, 1995), sendo assim, essenciais à manutenção da diversidade desses vegetais. Além disso, a importância das abelhas deve ser ressaltada quando se considera a produção de alimentos, pois cerca de 30% de toda a alimentação humana depende direta ou indiretamente da polinização feita por elas (O'Toole, 1992). As formigas são insetos dominantes nos ecossistemas tropicais e influenciam na estrutura e dinâmica de solos e árvores (Fernández & Sharkey, 2006). Embora seja uma pequena minoria, existem espécies de Hymenoptera que podem causar grandes prejuízos econômicos. Dentre estas estão às formigas cortadeiras (*Atta e Acromyrmex*), que causam prejuízos mais severos (Cherrett, 1986).

Os Hymenoptera são excelentes modelos para estudos em Etologia, por exibirem vasta diversidade de hábitos e alta complexidade comportamental, apresentando desde grupos solitários até grupos eusociais avançados, com hábito fitófago, entomófago ou uma combinação de ambos. Os entomófagos

podem ser predadores ou parasitóides com uma grande variedade de hábitos intermediários que dificulta sua classificação (Gaston, 1991).

A ordem possui 80 famílias, divididas nos táxons 'symphyta' e Apocrita (Gauld & Hanson, 1995). Os 'symphyta' reúne os Hymenoptera mais basais e são considerados parafiléticos (Gauld & Bolton, 1988). Este táxon contém pouco mais que 5% das espécies descritas, divididas em quatro subfamílias: Megalodontoidea, Cephoidea, Siricoidea e Orussoidea (Hanson & Gauld, 1995). A subordem Apocrita compreende a grande maioria das espécies descritas, é considerada monofilética e divide-se em dois grupos: Parasítica e Aculeata.

O grupo Parasítica é o maior dentre os Hymenoptera, com 48 famílias distribuídas em 12 superfamílias: Megalyroidea, Trigonalioidea, Stephanoidea, Cynipoidea, Proctotrupoidea, Diaprioidea, Evanioidea, Chalcidoidea, Mymarommatoidea, Platygastroidea, Ichneumonoidea e Ceraphronoidea (Sharkey, 2007). A grande maioria das espécies é parasitóide, existindo também espécies fitófagas ou predadoras (Gaston, 1991).

Os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas com ferrão, são os Hymenoptera mais conhecidos e se caracterizam basicamente pela presença de ferrão nas fêmeas, desenvolvido a partir de modificações do ovipositor. Estes são considerados o grupo mais derivado dentre os Hymenoptera e possuem 19 famílias distribuídas entre as superfamílias Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea. A maioria das espécies é predadora, no caso das vespas, ou alimentam-se de pólen, no caso das abelhas. O parasitismo é comum nos Chrysidoidea, considerados mais basais (LaSalle & Gauld, 1992).

A superfamília Chrysidoidea é composta por cerca de 4.000 espécies (Goulet & Hubner, 1993) que se distribuem em sete famílias: Chrysididae, Bethylidae, Drynidae, Embolemidae, Plumaridae, Sclerogibbidae e Scolebythilidae. As relações entre as famílias de Chrysidoidea foram estudadas por Carpenter (1986, 1999), Brothers & Carpenter (1993) e Brothers (1998). Chrysidoidea é considerada grupo irmão de Aculeata *sensu stricto* (Apoidea + Vespoidea). Apesar de não restarem muitas dúvidas quanto a Chrysidoidea ser um grupo monofilético (Gauld & Hanson, 1995), a relação entre suas famílias ainda apresenta algumas divergências (Rasnitsyn, 1980; Carpenter, 1986).

A superfamília Vespoidea é constituída pelas formigas e vespas. Este grupo possui dez famílias: Sierolomorphidae, Mutillidae, Sapygidae, Pompilidae, Tiphidae, Rhopalosomatidae, Bradynobaenidae, Formicidae, Scoliidae e Vespidae (Brothers, 1995). As famílias Formicidae, Vespidae, Pompilidae, Mutillidae, Rhopalosomatidae e Scoliidae são encontradas predominantemente nas regiões tropicais, enquanto as famílias Tiphidae, Bradynobaenidae e Sapygidae possuem apenas algumas subfamílias ou gêneros ocorrendo nessas regiões (Brothers, 1995). Os Vespoidea são o grupo mais diversificado, em termos de comportamento, dentre os Hymenoptera, apresentando desde indivíduos solitários (Tiphidae) até colônias eusociais (Formicidae e Vespidae). Seus representantes mais conhecidos são aqueles das famílias Formicidae e Vespidae. Na sistemática desse grupo ainda há bastante controvérsia (Carpenter, 1982; Brothers, 1998; Carpenter & Wheeler, 1999).

A superfamília Apoidea é composta pelas abelhas e vespas esfeciformes (Brothers, 1975; Brothers & Carpenter, 1993). Este grupo inclui cerca de 30.000 espécies descritas, sendo a maioria pertencente à família Apidae a qual agrupa todas as abelhas (Melo, 1999; Melo & Gonçalves, 2005).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido produzidos enfocando, independentemente, características morfológicas, comportamentais e moleculares para resolver as relações filogenéticas entre os Hymenoptera (Brothers, 1998; Carpenter & Wheeler, 1999; Ronquist, 1999; Downton & Austin, 1999; Melo & Gonçalves, 2005). Mesmo com estas diferentes abordagens, a filogenia em Hymenoptera ainda é bastante controversa, sendo necessário que novos sistemas de caracteres sejam inseridos aos dados já existentes. A morfologia dos espermatozoides vem sendo amplamente empregada por sua aplicabilidade potencial nas análises taxonômicas e filogenéticas, visto que permite caracterizar famílias, gêneros e até mesmo espécies.

O primeiro trabalho comparativo da morfologia dos espermatozoides nos Hymenoptera foi realizado por Quicke e colaboradores em 1992. Desde então, vários trabalhos tem sido publicados (Lino-Neto et al., 1999, 2000a,b, 2008; Lino-Neto & Dolder, 2001a,b, 2002; Báó et al., 2004; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2008, 2009; Mancini et al., 2006, 2009; Moya et al., 2007; Brito et al., 2009; Gracielle et al., 2009; Oliveira

et al., 2010; Moreira et al., 2010). Apesar do crescente número desses trabalhos, a cobertura de caracteres ainda não é suficiente para uma análise filogenética mais abrangente, sendo necessário que mais espécies representando novos táxons sejam estudadas, a fim de estabelecer um plano básico para contribuir com matrizes de análises filogenéticas em grupos cuja sistemática é incompleta ou ainda confusa.

## 1.2. A Família Bethylidae

Bethylidae é provavelmente a maior família dentro da superfamília Chrysoidea, com cerca de 2400 espécies descritas em 100 gêneros (Mugrabi & Azevedo, 2010) distribuídos entre as subfamílias Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae e Pristocerinae (Finnamore & Gauld, 1995). Bethylidae é cosmopolita, com a maior parte de suas espécies habitando as regiões tropicais.

Os betilídeos são vespas pequenas, medindo entre 1 a 2 mm de comprimento. Todas as suas espécies são ectoparasitoides primários, conhecidos por atacarem larvas e pupas de besouros brocadores de madeira, sementes e grãos armazenados, bem como uma gama de microlepidópteros-praga e coleópteros (Cock, 1985). Por essa razão, os betilídeos são potencialmente benéficos para a agricultura e silvicultura como agentes de controle biológico (Gordh, 1982; Gordh & Medved, 1986; Legner & Gordh, 1992). Várias espécies já foram citadas atacando diversas pragas agrícolas, dentre elas duas espécies afrotropicais: *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Vespa-do-Togo) e *Prorops nasuta* Waterston (Vespa-da-Uganda) são consideradas de maior importância econômica para região Neotropical (Lachaud et al., 2002). Estas vespas foram introduzidas para o controle da broca do café (*Hypothenemus hampei*) (Ferrari), Scolytidae. Outros Bethylidae como *Goniozus pakmanus* Gordh (Gordh & Medved, 1986), *G. aethiops* Evans (Gordh & Evans, 1976), e *G. legneri* (Gordh, 1982) foram importados do Paquistão, Etiópia e Uruguai, respectivamente, para a Califórnia, para o controle da *Pectinophora gossypiella* (Saunders) e *Amyilois transitella* (Walker). Por outro lado, como são parasitoides de besouros brocadores de madeira,

podem ser encontrados em habitações. Alguns gêneros, como *Cephalonomia*, *Epyris* e *Sclerodermus*, são bastante conhecidos por causarem graves dermatites em humanos devido à freqüentes picadas (Tachikawa, 1985; Terayama, 1995). Embora este seja um grupo potencialmente importante para agricultura e silvicultura, estudos aplicados envolvendo estes insetos ainda são escassos pela falta de conhecimento taxonômico, filogenético e biológico dos mesmos.

A sistemática de Bethylidae é bastante confusa, existindo muitas controvérsias nas relações entre suas subfamílias e poucos estudos sobre a sua filogenia. De acordo com Brothers & Carpenter (1993), Bethylidae é considerado grupo irmão de Chrysididae devido a modificações no ferrão das espécies dessas famílias. Para filogenia interna de Bethylidae, Kieffer (1914) reconheceu cinco principais tribos para Bethylidae: Sclerodermini, Mesitiini, Epyrini, Pristocerini e Bethylini. Posteriormente, Berland (1928) elevou ao status de subfamília, respectivamente, Scleroderminae, Mesitiinae, Epyrinae, Pristocerinae e Bethylinae. Evans (1964) reconsiderou Scleroderminae ao status (Sclerodermini) inserindo-a em Epyrinae e apresentou o primeiro trabalho sistemático baseado na análise de três subfamílias, oferecendo hipóteses sobre as relações entre os gêneros de cada subfamília, no qual Bethylinae é um grupo irmão de Pristocerinae + Epyrinae (Mesitiinae não foram avaliados). Porém, poucos caracteres morfológicos foram indicados para explicar tais relações (Vargas-Rojas & Terayama, 2006). Três outras subfamílias, todas monotípicas, foram propostas: Galodoxinae (Nagy, 1974), Afgoiogfinae (Argaman, 1988) e Parapenesiinae (Terayama, 2003), entretanto as análises ainda não são consensuais. Para alguns pesquisadores, Afgoiogfinae (Gordh & Móczár, 1990) e Galodoxinae (Carpenter, 1999) poderiam ser colocadas dentro de Pristocerinae. No entanto, Lanes & Azevedo (2008) demonstraram que Galodoxinae pertence à Scleroderminae, porém esta não foi aceita como subfamília por vários pesquisadores (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Hubet, 1993; Hanson & Gauld, 1995; Finnamore & Gauld, 1995), que reconhecem apenas quatro subfamílias: Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae e Pristocerinae. Já Terayama (2003) propõe a filogenia para Bethylidae, reconhecendo 6 subfamílias, incluindo Parapenesiinae e Galodoxinae. O estudo mais recente de filogenia de Bethylidae foi realizado por Carr e

colaboradores (2010), baseado em dados moleculares. Este estudo suporta a taxonomia descrita por Berland (1928), que propõe cinco subfamílias para Bethylidae.

#### **2.4. Morfologia geral dos espermatozoides em Hymenoptera**

Os espermatozoides em Hymenoptera são células filiformes que medem de 8  $\mu\text{m}$  (Quicke et al., 1992) a 1500  $\mu\text{m}$  (Zama et al., 2005a). São constituídos por uma região de cabeça e outra de flagelo. A região de cabeça é formada, anteriormente, por um acrossomo seguido pelo núcleo. O acrossomo em geral é formado por uma vesícula acrossomal e um perforatorium. O perforatorium é um bastão eletrondenso, às vezes, paracristalino, que tem sua base inserida em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo. O núcleo também é bastante longo e, geralmente, apresenta a cromatina elétron-densa e compacta. O núcleo é conectado aos elementos do flagelo através do adjunto do centríolo. Na maioria dos Hymenoptera, essa estrutura é eletrondensa, aproximadamente cilíndrica e compacta, podendo variar de comprimento entre as espécies. O flagelo, por sua vez, é formado pelo axonema e, em geral, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. O axonema apresenta padrão de organização microtubular  $9 + 9 + 2$ , sendo nove microtúbulos acessórios simples, nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais simples. O axonema inicia abaixo da base nuclear, a partir do centríolo e é a última estrutura a finalizar na porção final do flagelo. Os derivados mitocondriais são estruturas alongadas, paralelas ao axonema, que geralmente contém inclusões paracristalinas, podendo ou não ser iguais em diâmetro e comprimento. Os corpos acessórios também são estruturas longas, situadas entre os derivados mitocondriais e o axonema e, geralmente, possuem formato aproximadamente triangular, em corte transversal.

A morfologia geral dos espermatozoides, nos diferentes grupos que compõem a ordem Hymenoptera, é diversificada e, portanto, é uma fonte de dados não tradicionais, tendo seus caracteres uma natureza mais conservativa que os caracteres morfológicos usados tradicionalmente. Com isso, análises filogenéticas usando características estruturais e ultraestruturais dos

espermatozoides vêm ganhando o interesse na Biologia Celular e Sistemática, sendo utilizada em estudos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Baccetti, 1970; Dallai, 1974; Dallai & Afzelius, 1990, 1993; Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999). Adicionalmente, cada vez mais tem sido demonstrada que a diversidade morfológica dos espermatozoides é suficiente para compor um sistema de caracteres que, associado a outros conjuntos de caracteres, poderá ser usado para esclarecer vários pontos de controvérsias das relações evolutivas dos Hymenoptera. Neste aspecto, dados da literatura incluem espécies:

Grupo '**symphyta**' (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1999a)

Subordem **Apocrita (Parasítica)**, nas superfamílias:

**Chalcidoidea** (Hogge & King, 1975; Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009).

**Platygastroidea** (Lino-Neto & Dolder, 2001a)

**Megalyroidea** (Newman & Quicke, 2000)

**Cynipoidea** (Newman & Quicke, 1999b; Quicke et al., 1992)

**Ichneumonoidea** (Chauvin et al., 1988; Newman & Quicke, 1998; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010)

Subordem **Apocrita (Aculeata)**, nas superfamílias:

**Apoidea: Apidae** (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Höfling et al., 1970; Lensky et al., 1979; Peng et al., 1993; Lino Neto, et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2003, 2004, 2005a; Báó et al., 2004; Araújo et al., 2005, 2010; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al., 2009), **Sphecidae** (Zama et al., 2005b, 2007).

**Vespoidea: Formicidae** (Thompson & Blum, 1967; Caetano, 1980; Wheeler et al., 1990; Lino & Dolder, 2002; Moya et al., 2007), **Vespidae** (Mancini et al., 2006, 2009).

**Chrysoidea: Chrysididae** (Brito, 2008), **Bethylidae** (Oliveira et al., 2010).

#### 1.4. Referências Bibliográficas

- Araújo, VA; Zama, U; Dolder, H; Lino-Neto, J (2005). Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22: 137-141.
- Argaman, Q (1988). A new subfamily of Bethyridae allied to Pristocerinae (Hymenoptera). Boll. Soc. Entomol. Ital. 120: 139 -152.
- Baccetti, B (1970). The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogeny. In: Baccetti, B. Comparative spermatology. New York, Academic Press, pp. 169-182.
- Báo, SN; Simões, DG; Lino-Neto, J (2004). Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). J. Submicr. Cytol. Pathol. 36: 23-28.
- Berland, L (1928). Bethyridae. In: Berland, L. (Ed.) Fauna de France 19 – Hyménoptères vespiformes II .Office Central de Faunistique , Paris , pp 96 -137.
- Brito, PVA (2008). Morfologia dos Espermatozoides de *Melittobia hawaiiensis*, Perkins, *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae) e *Neochrysis leointei*, Ducke (Chrysidoidea: Chrysididae), com considerações filogenéticas em Apocrita (Hymenoptera). Tese de doutorado. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 64p.
- Brito, P; Lino-Neto, J; Dolder, H (2009). Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). Tissue Cell 41: 113-117.
- Brothers, DJ (1975). Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to the Mutillidae. Uni. Kan. Sci. Bull. 50: 483-648.
- Brothers, DJ (1995). The Vespoid families (except vespids and ants). In: Hanson PE & Gauld ID. The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, New York.
- Brothers, DJ (1998). Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). Zool. Scr. 28: 233-249.
- Brothers, DJ & Carpenter, JM (1993). Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). J. Hym. Res. 2: 227:302.
- Caetano, FH (1980). Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). Naturalia 5: 105-111.

- Carpenter, JM (1982). The phylogenetic relationship and natural classification of the Vespoidea (Hymenoptera). *Syst. Entomol.* 7: 11-38.
- Carpenter, JM (1986). Cladistics of the Chrysidoidea (Hymenoptera). *J. New York Entomol. Soc.* 94: 303-330.
- Carpenter, JM (1999). What do we know about chrysidoid (Hymenoptera) relationships? *Zool Scr.* 28: 215-231.
- Carpenter, JM & Wheeler WC (1999). Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zool. Scr.* 28: 251-260.
- Carr, M; Young, JPW & Mayhew, PJ (2010). Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethyidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Syst. Evol.* 41: 55-73.
- Chauvin, G; El Agoze, M; Hamon, C; Huignard, J (1988) Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17: 359-366.
- Cherret, JM (1986). History of the leaf-cutting ant problem. In: Lofgren CS & Vander Meer RK. (eds.) *Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management*. Westview Press, Boulder. 10-17 pp.
- Cock, MJW (1985). A Review of Biological Control of Pests in the Commonwealth Caribbean and Bermuda up to 1982. Commonwealth Institute of Biological Control, Technical Communication. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough. 9-218 pp.
- Cruz-Höfling, MA; Cruz-Landim, C; Kitajima, EW (1970). The fine structure of spermatozoa from the honey bee. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 42: 69-78.
- Dallai, R (1974). Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta apterygota. *Pedobiol.* 14: 148-156.
- Dallai, R & Afzelius, BA (1990). Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J. Struct. Biol.* 103: 164-179.
- Dallai, R & Afzelius, BA (1993). Development of the accessory tubules of insect sperm flagella. *J. Submicr Cytol. Pathol.* 25: 499-504.
- Dowton, M & Austin AD (1999). Models of analysis for molecular dataset for the reconstruction of basal hymenopteran relationships. *Zool. Scr.* 28: 69-74.
- Evans, HE (1964). A synopsis of the American Bethyidae (Hymenoptera: Aculeata). *Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard University)* 132: 1-222.

- Fernández, F & Sharkey, M (2006). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Bogotá Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, 893 pp.
- Finnamore, AT & Gauld, ID (1995). Bethylidae. In: Hansom, P.E., Gauld, I.D. (Eds.), Hymenoptera da Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, pp. 470-479.
- Fiorillo, BS; Coelho, AM; Lino-Neto, J; Bábó SN (2005). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicr. Cytol. Pathol. 37: 75-81.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto, J; Bábó, SN (2008). Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). Micron 39: 1271-1280.
- Fiorillo, BS; Zama, U; Lino-Neto, J; Bábó, SN (2009). Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). Acta Zool. 89: 1463-1470.
- Gaston, KJ (1991). The magnitude of global insect species richness. Conserv. Biol. 5: 283-29.
- Gauld, ID & Bolton, B (1988). The Hymenoptera. British Museum (Natural History), London, and Oxford University Press, Oxford , 332 .pp.
- Gauld, ID & Hanson, PE (1995). The structure of Hymenoptera. Larval morphology, p.102-137. In P.E. Hanson, & I.D. Gauld (eds), The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford, Oxford University Press. 893p.
- Gordh, G (1982). A new species of *Goniozus* (Hymenoptera, Bethylidae) imported into California for the biological control of the navel orangeworm (Lepidoptera, Pyralidae). Entomol. News 93: 136-138.
- Gordh, G & Evans, HE (1976). A new species of *Goniozus* imported into California from Ethiopia for the biological control of pink bollworm and some notes on the taxonomic status of *Parasierola* and *Goniozus* (Hymenoptera, Bethylidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington, 78: 479-489.
- Gordh, G & Medved RE (1986). Biological notes on *Goniozus pakmanus* Gordh (Hymenoptera, Bethylidae), a parasite of pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera, Gelechiidae). J. Kans. Entomol. Soc. 59: 723-734.
- Gordh, G & Móczár, L (1990). A catalog of the world Bethylidae (Hymenoptera: Aculeata). Mem. Am. Entomol. 46: 1-364.

- Goulet, H & Hubner, JT (1993). Hymenoptera of the world: An identification guide to families. Research Branch, Agriculture Canada. Centre for Land and Biological Resources Research, Ottawa.
- Gracielle, IMS, Fiorillo, BS, Lino-Neto, J, Bao, SN (2009). Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron*.40: 419-425.
- Grimaldi, DA & Engel MS (2005). Evolution of insects. Cambridge, Cambridge Campos, LAO; Lino-Neto, J (Org.). Insetos Sociais: Da Biologia  Aplicaao. 1<sup>a</sup> ed. Viosa-MG: UFV, v. 1, 442 pp.
- Hanson, PE & Gauld, ID (1995). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, UK, xx + 893 pp.
- Hanson, PE (1995). Economic importance of Hymenoptera. In: Hanson PE & Gauld ID. The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, New York.
- Hoage, TR & Kessel, RG (1968). An electron microscopical study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee with special reference to replication and elimination. *J. Ultrastruct. Res.* 24: 6-32.
- Hogge, MAF & King, PE (1975). The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Submicr. Cytol.* 7: 81-96.
- Jamieson, BGM (1987). The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press. 89-101 pp.
- Jamieson, BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999). Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.
- Kieffer, JJ (1914). Bethylinae (Das Tierreich 41: 228–595) R. Friedlander und Sohn , Berlin , 368 pp.
- Lachaud, GP; Hardy, ICW; Lachaud, JP (2002). Insect gladiators: Competitive interactions between three species of bethylid wasps attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Biol. Control* 25: 231-238.
- Lanes, GO & Azevedo, CO (2008). Phylogeny and taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylinidae, Epryinae). *Insect Systemat. Evol.* 39: 55-85.
- LaSalle, J & Gauld, ID (1992). Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: LaSalle J & Gauld ID. Hymenoptera and Biodiversity. CAB International, UK. pp 1-26.

- Legner, EF & Gordh, G (1992). Lower navel orangeworm (Lepidoptera, Phycitidae) population densities following establishment of *Goniozus legneri* (Hymenoptera, Bethyridae) in California. *J. Econ. Entomol.* 85: 2153-2160.
- Lensky, Y; Ben-David, E; Schindler, H (1979). Ultrastructure of the spermatozoan of the mature drone honeybee. *J. Apic. Res.* 18: 264-271.
- Lino-Neto, J; Báo, SN; Dolder, H (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 253-259.
- Lino-Neto, J; Báo, SN; Dolder, H (2000a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool (Stockholm)*, 81: 205-211.
- Lino-Neto, J; Báo, SN; Dolder, H (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool Scr.* 30: 89-96.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool. (Stockholm)*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2002). Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34: 124-128.
- Lino-Neto, J; Dolder, H; Mancini, K; Mercati, D; Dallai, R (2008). The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185-193.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Insect. Soc.* 53: 333-338.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H; Dallai, R (2009). Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38: 54-59.
- Melo, GAR (1999). Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers of the Natural History Museum of the University of Kansas* 14: 1-55.

- Melo, GAR; Gonçalves, RB (2005). Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae *sensu lato*). Rev. Bras. Zool. 22: 153-159.
- Moreira, J; Araújo, VA; Bão, SN; Lino-Neto, J (2010). Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). Micron 41: 187-192.
- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Delabie, J; Dolder, H (2007). Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). Acta Zool. 88: 181-187.
- Mugrabi, DF & Azevedo, CO (2010). Insecta, Hymenoptera, Bethyridae: Range extension and filling gaps in Madagascar. Check List. 6:062-063.
- Nagy, CG (1974). A new Bethyrid subfamily allied to Protopristocerinae. Boll. Soc. Entomol. Ital. 106: 126-130.
- Newman, TM & Quicke DLJ (1998). Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). J. Hym. Res. 7: 25-37.
- Newman, TM & Quicke DLJ (1999a). Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). J. Hym. Res. 8: 35-47.
- Newman, TM & Quicke DLJ (1999b). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). J. Hym. Res. 8: 197-203.
- Newman, TM & Quicke DLJ (2000). Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). J. Hym. Res. 9: 62-70.
- Nieves-Aldrey, JL & Fontal-Cazalla, FM (1999). Filogenia y evolución del orden Hymenoptera. In: Melic, A; Haro, JJ; Mendez, M & Ribera, I (eds.). Evolución y filogenia de Arthropoda. Volumen monográfico SEA, No. 26. 459-474 pp.
- Oliveira, CM; Mancini, K; Dolder H; Lino-Neto J (2010). Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae). Tissue Cell 42: 242-246.
- O'Toole, C (1992). Diversity of native bees and agroecosystem. In: LaSalle J & Gauld ID. Hymenoptera and Biodiversity. CAB International, UK. pp. 277-293.
- Peng, CYS; Yin, CM & Yin, LRS (1993). Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. Physiol. Entomol. 18: 93-101.

- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS & Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21: 381-402.
- Rasnitsyn, AP (1980). Origin and evolution of Hymenoptera. *Transactions of the Paleontological Institute of the Academy of Sciences of the USSR* 174: 1-192.
- Ronquist, F (1999). Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta); The state of the art. *Zool. Scr.* 28: 3-11.
- Sharkey, MJ (2007). Phylogeny and Classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, 1668: 521-548.
- Tachikawa, T (1985). On the bethylid wasps I. *Forest Pest*, 34:135-141.
- Terayama, M (1995). The phylogeny of the bethylidae wasp tribe Sclerodermini (Hymenoptera; Bethylinae). *Proc. Jpn. Soc. Syst. Zool.* 54: 65-73.
- Terayama, M (2003). Phylogenetic systematics of the family Bethylinae (Insecta:Hymenoptera). Part I. Higher classification. *Academic Reports. Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics, Tokyo Metropolitan University* 26: 1-15.
- Thompson, TE & Blum, MS (1967). Structure and behavior of spermatozoa of fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera – Formicidae). – *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60: 632–642.
- Triplehorn, CA; Johnson, N (2005). *Introduction to the Study of Insects*. Belmont, California, Thomson Brooks/Cole.
- Vargas-Rojas, JM; Terayama, M (2006). Familia Bethylinae. In: Fernández, F., Knipe, D.M. (Eds.), *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC, pp. 427–442.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2001). Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10: 261-270.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2004). Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36: 29-41.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H (2005a). Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.* 52: 122-131.
- Zama, U; Brito, P; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H; Báó, SN (2005b). The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom

(Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 37: 313-321.

Zama, U; Moreira, J; Bao, SN; Campos, LAO; Dolder, H & Lino-Neto, J (2007). Morphology of Testicular and Post-testicular Spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. Arth.Struct. & Dev. 36: 304-316.

## **2. Objetivos**

Considerando a grande diversidade morfológica dos espermatozoides em Hymenoptera e a importância dessas informações para a sistemática, este trabalho tem como objetivos:

### **Objetivo Geral**

Descrever a morfologia dos espermatozoides em representantes da família Bethyridae, procurando caracteres consistentes que possam contribuir para futuras análises filogenéticas.

### **Objetivos Específicos**

- Descrever a morfologia dos espermatozoides de *Dissomphalus connubialis* (Pristocerinae).
- Descrever a morfologia dos espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis* (Epyrinae).
- Descrever a morfologia dos espermatozoides de *Apenesia* sp. (Pristocerinae).

# Capítulo 1

## 3.1. Morfologia dos espermatozoides de *Dissomphalus connubialis* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Bethylidae)

## RESUMO

Neste estudo, analisamos a morfologia dos espermatozoides do Bethylidae *Dissomphalus connubialis* (Pristocerinae). Para isso, utilizamos as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides desta espécie são finos, medem aproximadamente 130  $\mu\text{m}$  de comprimento e consistem de uma região de cabeça e outra de flagelo. A cabeça é formada por acrossomo e núcleo. O acrossomo é constituído pela vesícula acrossomal e pelo perforatorium, sendo este paracristalino e com sua porção posterior inserida em uma longa cavidade na extremidade anterior do núcleo. O núcleo é compacto, eletrondenso e mede 15  $\mu\text{m}$  de comprimento. O flagelo possui dois derivados mitocondriais, dois corpos acessórios e um axonema com padrão microtubular 9+9+2. O núcleo é conectado ao flagelo pelo adjunto do centríolo. Os derivados mitocondriais são compactos, aparentemente sem material paracristalino e com raras cristas mitocondriais. Eles são assimétricos em comprimento, sendo que o maior surge paralelo à região posterior do núcleo e o menor logo abaixo do adjunto do centríolo. Na porção final do flagelo, os microtúbulos acessórios são os primeiros a finalizarem. A estrutura básica dos espermatozoides de *D. connubialis* é semelhante àquela dos demais Aculeata estudados. Entretanto, esta espécie mostra variações ainda não descritas para qualquer outro Hymenoptera, como a ampla região eletrólúcida que separa a vesícula acrossomal do perforatorium e a profundidade da cavidade na extremidade anterior nuclear, onde a base do perforatorium está inserida. Ainda há caracteres que não foram observados em Aculeata e que diferenciam esta espécie do também Bethylidae *Prorops nasuta*, como um dos derivados mitocondriais em paralelo com o núcleo por uma longa distância, a pequena quantidade de cristas e a ausência de material paracristalino nessas organelas e os microtúbulos acessórios, sendo os primeiros a finalizarem na porção final do flagelo.

Palavras chaves: Aculeata, parasitoide, inseto, ultraestrutura

## 1. Introdução

A ordem Hymenoptera, com mais de 115.000 espécies descritas, é um dos mais numerosos grupos de insetos (Gaston, 1991), embora o número estimado de espécies seja de 600.000 a 1.200.000 espécies em todo o mundo (Grimaldi & Engel, 2005). A superfamília Chrysidoidea é composta por cerca de 4.000 espécies (Goulet & Hubner, 1993) que se distribuem em 7 famílias. O parasitismo é comum em Chrysidoidea (LaSalle & Gauld, 1992), tendo este grupo um importante papel ecológico como agente controlador de insetos praga.

Bethylidae é provavelmente a maior família de Chrysidoidea, com aproximadamente 2.400 espécies descritas (Mugrabi & Azevedo, 2010). Este grupo é constituído por pequenos ectoparasitoides que atacam larvas de Lepidoptera e Coleoptera comumente encontrados em tronco de árvores (brocadores), solos, sementes e grãos armazenados (Cock, 1985).

Na região neotropical, *Dissomphalus* (subfamília Pristocerinae) é o maior gênero da família Bethylidae, com 190 espécies descritas (Alencar & Azevedo, 2006). Estas espécies são parasitoides de besouros myrmecophilous e larvas de besouros brocadores de madeira (Krombein, 1979).

A sistemática de Bethylidae é bastante confusa, existindo muitas controvérsias nas relações entre suas subfamílias. Evans (1964) apresentou o primeiro trabalho sistemático baseado na análise de três subfamílias em que Bethylinae é grupo irmão de Pristocerinae + Epyrinae. Subsequentemente, quatro subfamílias são reconhecidas: Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae e Pristocerinae (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Hubner, 1993; Hanson & Gauld, 1995; Finnamore & Gauld, 1995; Carpenter, 1999). Ainda, três outras subfamílias, todas monotípicas, foram propostas: Galodoxinae (Nagy, 1974), Afgoiogfinae (Argaman, 1988) e Parapenesiinae (Terayama, 2003), entretanto não são amplamente aceitas. Segundo Gordh & Móczár (1990), Afgoiogfinae deve ser incluída em Pristocerinae. Carpenter (1999) também sugeriu inserir Galodoxinae em Pristocerinae. No entanto, Lanes & Azevedo (2008) propõe que Galodoxinae pertence à Scleroderminae. O estudo mais recente de

filogenia de Bethylidae foi realizado por Carr et al. (2010), baseado em dados moleculares. Este estudo suporta a taxonomia descrita por Berland (1928), que propõe cinco subfamílias para Bethylidae, incluindo Scleroderminae, em contraste com a taxonomia aceita por Evans (1964), o qual agregou Scleroderminae à Epyrinae.

A morfologia dos espermatozoides de vários grupos de Hymenoptera tem sido descrita, fornecendo informações úteis para estudos filogenéticos (Lino-Neto et al., 1999, 2000a,b, 2008; Lino-Neto & Dolder, 2001a,b, 2002; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b 2007; Báó et al., 2004; Araújo et al., 2005, 2009a; Fiorillo et al., 2005, 2008, 2009; Moya et al., 2007; Mancini et al., 2006, 2009; Gracielle et al., 2009; Brito et al., 2009, Moreira et al., 2010). No entanto, em Bethylidae, a descrição morfológica dos espermatozoides restringe-se apenas a espécie *Prorops nasuta* (Epyrinae) (Oliveira et al., 2010). Neste aspecto, o objetivo deste trabalho é descrever a morfologia dos espermatozoides da espécie *Dissomphalus connubialis*, para contribuir com mais informações sobre os espermatozoides da família Bethylidae, bem como dos Hymenoptera em geral, fornecendo informações para futuros estudos filogenéticos do grupo.

## **2. Material e Métodos**

Machos adultos de *Dissomphalus connubialis* (Ashmead, 1893) foram coletados manualmente na área urbana de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **Microscopia de Luz**

Para determinação do tamanho total e do núcleo dos espermatozoides da espécie de *Dissomphalus connubialis*, machos adultos foram dissecados, as vesículas seminais foram retiradas e abertas e os espermatozoides extraídos e espalhados sobre lâminas histológicas, fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, por 15 minutos, lavados em água corrente e secos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram analisadas e os espermatozoides fotografados em fotomicroscópio Olympus BX60, equipado com contraste de fase. 50 espermatozoides foram fotografados para serem medidos. Para determinação do tamanho dos núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml, lavadas em água destilada e montadas com sacarose 50%. A análise e o registro fotográfico foram feitos em microscópio de epifluorescência Olympus BX-60, equipado com filtro de excitação BP360-370 nm e foram fotografados 50 núcleos. Para a morfometria foi utilizado o programa de análise de imagem "Image-Pro Plus", versão 4.5 para Windows 98.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os espécimes tiveram suas vesículas seminais dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 e posteriormente fixadas em solução de glutaraldeído 2.5%, contendo ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por cerca de 24 horas. O material foi, então, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, desidratado em série crescente de álcool, infiltrado e, finalmente, incluído em

resina Epoxi (Epon 812). Para detecção de proteínas gerais e microtubulares, as vesículas seminais foram removidas e fixadas em solução de glutaraldeído 2.5% e ácido tânico 1%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, acrescido de sacarose 1,5% e  $\text{CaCl}_2$  5 mM, por 5 dias à 4 °C (Dallai and Afzelius, 1990). Após lavagens no mesmo tampão, as vesículas foram contrastadas em solução de acetato de uranila aquoso a 1% por 2 h à temperatura ambiente. Finalmente, elas foram desidratadas em série crescente de álcool e incluídas em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram contrastados com soluções de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 3%.

Todos os materiais foram observados e fotodocumentados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss LEO 906), no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP), São Paulo – Brasil.

### 3. Resultados

Os espermatozoides de *Dissomphalus connubialis* são células longas e finas com diâmetro constante em quase toda sua extensão, mostrando-se afilado somente nas extremidades. Eles medem aproximadamente 130  $\mu\text{m}$  de comprimento (Fig. 1A). Neles são observadas as regiões cabeça e flagelo. A cabeça é formada pelo núcleo, com aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de comprimento (Fig. 1B) e o acrossomo. O flagelo possui dois derivados mitocondriais, dois corpos acessórios e um axonema. Na região transição núcleo-flagelo encontra-se o adjunto do centríolo.

O acrossomo, porção inicial do espermatozoide, é uma estrutura alongada e constituída por um perforatorium paracristalino envolvido parcialmente pela vesícula acrossomal de formato cuneiforme (Fig. 1C). O lúmen da vesícula acrossomal é ligeiramente estreito e preenchido por conteúdo homogêneo de eletrondensidade mediana (Fig. 1C-E). Entre a vesícula acrossomal e o perforatorium existe uma região eletrólúcida que se mostra mais ampla anteriormente, resultando em um maior espaço intermediário entre a vesícula e o perforatorium. Ao longo de todo o acrossomo, esta região circunda o perforatorium e se estreita à medida que se aproxima do

núcleo (Figs 1C-F). Em corte transversal, a vesícula acrossomal possui formato variando de oval, na região anterior (Fig. 1D), a elipsoidal em regiões próximas ao núcleo (Fig. 1E), enquanto o perforatorium permanece oval em toda sua extensão (Figs 1D,E). O perforatorium mede aproximadamente 1,8  $\mu\text{m}$  de comprimento e possui as extremidades afiladas (Fig. 1C). Sua extremidade anterior se estende até próximo à região anterior da vesícula acrossomal e a posterior se insere em uma cavidade localizada assimetricamente na região anterior do núcleo de aproximadamente 1,2  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figs 1C,F,G).

O núcleo é linear e alongado (Figs 1A,B), com a cromatina homogeneamente compacta e eletrondensa (Figs 1C,F-J). Em secção transversal, o núcleo possui formato oval (Figs 1G,I). Sua extremidade posterior mostra uma projeção lateral delgada e curta, que se conecta à porção anterior do axonema (Fig. 1H).

A região de transição núcleo-flagelo é composta pela base nuclear, adjunto do centríolo e as porções anteriores do axonema e de um dos derivados mitocondriais. O adjunto do centríolo é uma estrutura longa de forte eletrondensidade, que inicia entre as regiões posterior do núcleo e a anterior de um dos derivados mitocondriais (Figs 1H,J) e continua paralelamente ao axonema e ao derivado mitocondrial por grande parte do comprimento do flagelo, finalizando sobre a extremidade anterior do outro derivado mitocondrial (Figs 1L, 2F). Em corte transversal, ele mostra-se delgado na região anterior e mais posteriormente, na região do flagelo, adquire o formato triangular com a borda pregueada. O adjunto do centríolo é bastante proeminente, com o diâmetro aproximadamente igual ao do axonema e do derivado mitocondrial na região de maior diâmetro (Figs 1L, 2F).

Os derivados mitocondriais são assimétricos em comprimento, um deles surge paralelo à região posterior do núcleo (Figs 1H,J) e o outro imediatamente abaixo do longo adjunto do centríolo. Posteriormente, eles terminam em alturas diferentes e antes da desorganização do axonema (Fig. 2C). Em secções transversais, eles são iguais em forma e diâmetro, com o formato variando de circular a ovalado (Figs 1L, 2A,C,F). Eles são preenchidos por um conteúdo homogêneo e pouco elétron-denso (Figs 1H,J,L e 2A,B,C,F). As cristas mitocondriais são curtas e escassas (Fig. 2B) e, aparentemente, nenhuma

inclusão paracristalina foi observada em toda área dessas organelas (Figs 1H,J,L e 2A,B,C,F).

Os corpos acessórios são longos, situados entre os derivados mitocondriais e o axonema. Eles surgem e desaparecem com os derivados mitocondriais. Eles se mostram bem desenvolvidos e triangulares em corte transversal e, dependendo do nível de secção, têm diâmetros próximos ao do adjunto do centríolo (Figs 1L e 2A,C,F).

O axonema tem padrão microtubular 9+9+2, comum aos insetos. Os microtúbulos acessórios exibem 16 protofilamentos (Fig. 1L e 2A) e são os primeiros a finalizarem na porção final do axonema (Fig. 2E). O axonema também mostra grande quantidade de material intertubular (Figs 1L e 2A,C,D,F), o qual diminui em regiões próximas ao final do flagelo (Figs. 2C,D,E).

Nas vesículas seminais de *D. connubialis*, os espermatozoides se encontram em grande número, dispostos de forma altamente compactada, e embebidos em uma estrutura filamentosa de natureza ainda desconhecida (Fig. 2F). O espermatozoide de *D. connubialis* é representado no esquema mostrado na Fig. 3.

## Legendas das figuras

**Fig. 1.** Fotomicrografias de luz **(A,B)** e de eletrônica de transmissão **(C-H)** dos espermatozoides de *D. connubialis*. Cortes longitudinais **(C,H)** e transversais **(D-G,I,J,L)**. **(A)** Contraste de fase de um espermatozoide mostrando região de cabeça (h) e região do flagelo (f). **(B)** Núcleo corado com DAPI. **(C)** Corte longitudinal da região da cabeça, vesícula acrossomal (av), perforatorium (p), núcleo (n). Observe o perforatorium inserido em uma profunda cavidade nuclear (seta). **(D-G)** Cortes transversais da região de cabeça dos espermatozoides. **(D)** Porção anterior do acrossomo, vesícula acrossomal (av), perforatorium (p). **(E)** Porção mediana do acrossomo, vesícula acrossomal (av), perforatorium (p). **(F)** Região posterior do acrossomo, mostrando o perforatorium paracristalino (p), vesícula acrossomal (av) e núcleo (n). **(G)** região anterior do núcleo (n) mostrando o perforatorium (p) inserido em sua cavidade. **(H)** Região de transição núcleo-flagelo, mostrando a base do núcleo (n) inserida na porção anterior do axonema (ax) e a projeção do derivado mitocondrial maior (md) e adjunto do centríolo (ca) acima da base nuclear. **(I)** Núcleo (n) de formato oval. **(J)** Região do núcleo (n) paralela ao derivado mitocondrial (md) e adjunto do centríolo (ca). **(L)** Início do flagelo mostrando axonema completo, com 9 microtúbulos acessórios (am), 9 duplas (dm) e 2 microtúbulos centrais (cm), adjunto do centríolo (ac) com formato triangular e borda pregueada, corpo acessório (ab), derivado mitocondrial (md), membrana celular (pm). Barras: A = 10µm; B = 1 µm; C,H,I,J = 0,2 µm; D,G-L = 0,1 µm.

**Fig. 2.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de *D. connubialis*. **(A,C-F)** cortes transversais **(B,C,D,E,G,H,I)** e longitudinal **(B)**. **(A)** Região mediana do flagelo mostrando axonema (ax) completo, dois derivados mitocondriais (md) e dois corpos acessórios (ab), membrana celular (pm). **(B)** Derivado mitocondrial mostrando cristas (seta). **(C)** Porção flagelar mostrando axonema (ax), um único derivado mitocondrial (md) e dois corpos acessórios (ab). **(D,E)** Região de finalização do axonema, microtúbulos acessórios (am), duplas (dm), centrais (cm). Note em **(E)** que os microtúbulos acessórios (am) são os primeiros a terminarem. **(F)** Cortes transversais mostrando a organização compactada dos espermatozoides na vesícula seminal. Observe a estrutura filamentosa (setas), axonema (ax), corpo acessório (ab), adjunto do centríolo (ca), derivado mitocondrial (md). Barras: A,C = 0,1 µm; B,D,E,F = 0,2 µm.

**Fig. 3.** Representação esquemática do espermatozoide de *Dissomphalus connubialis*. **(A)** Região de cabeça do espermatozoide mostrando acrossomo (a), vesícula acrossomal (av), perforatorium (p), núcleo (n). **(B)** Região de transição núcleo-flagelo, núcleo (n), centríolo (ce), adjunto do centríolo (ca), axonema (ax), derivados mitocondriais (md1, md2). **(C)** Região de flagelo, axonema (ax), corpo acessório (ab), derivados mitocondriais (md1, md2).

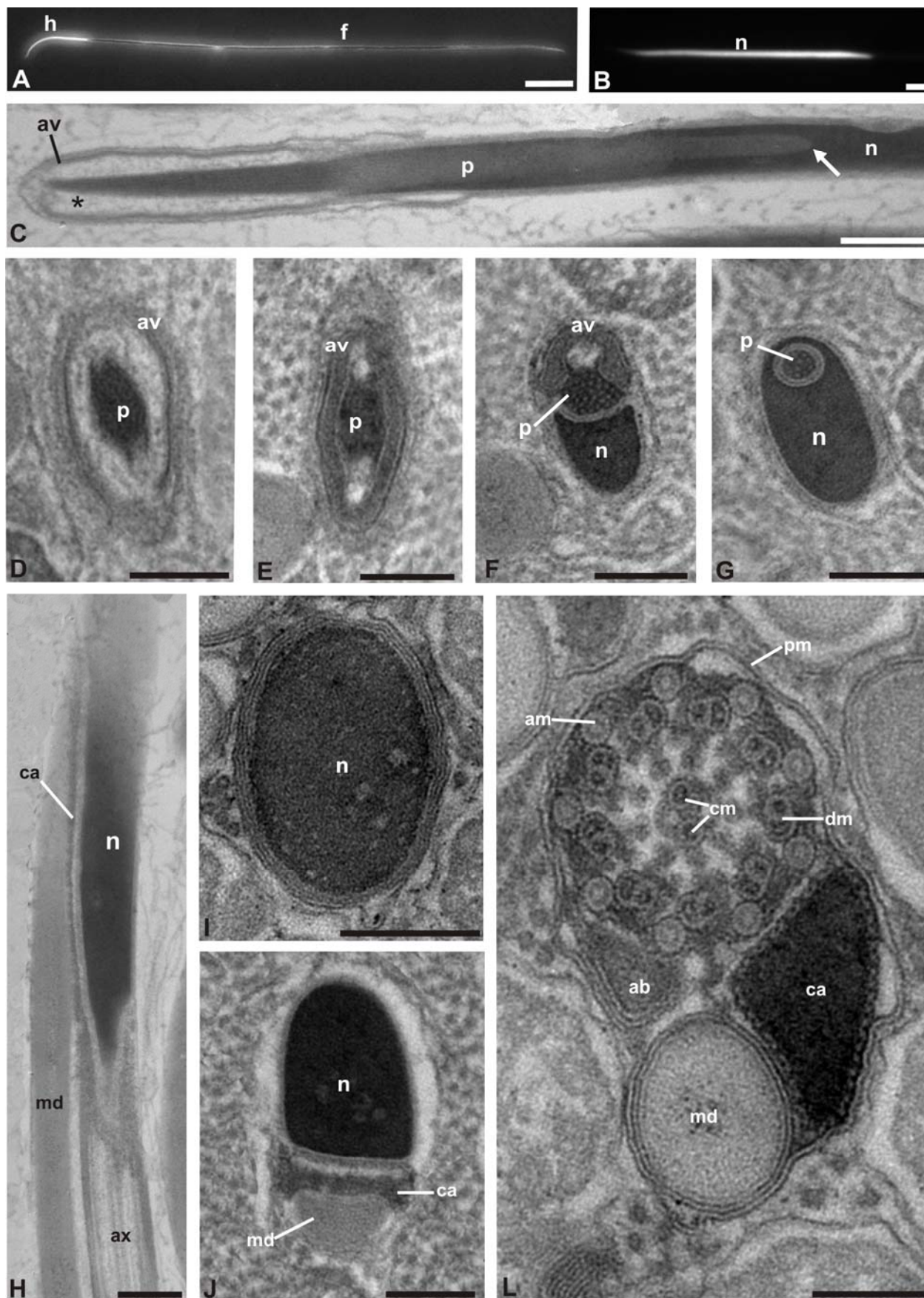


Figura 1

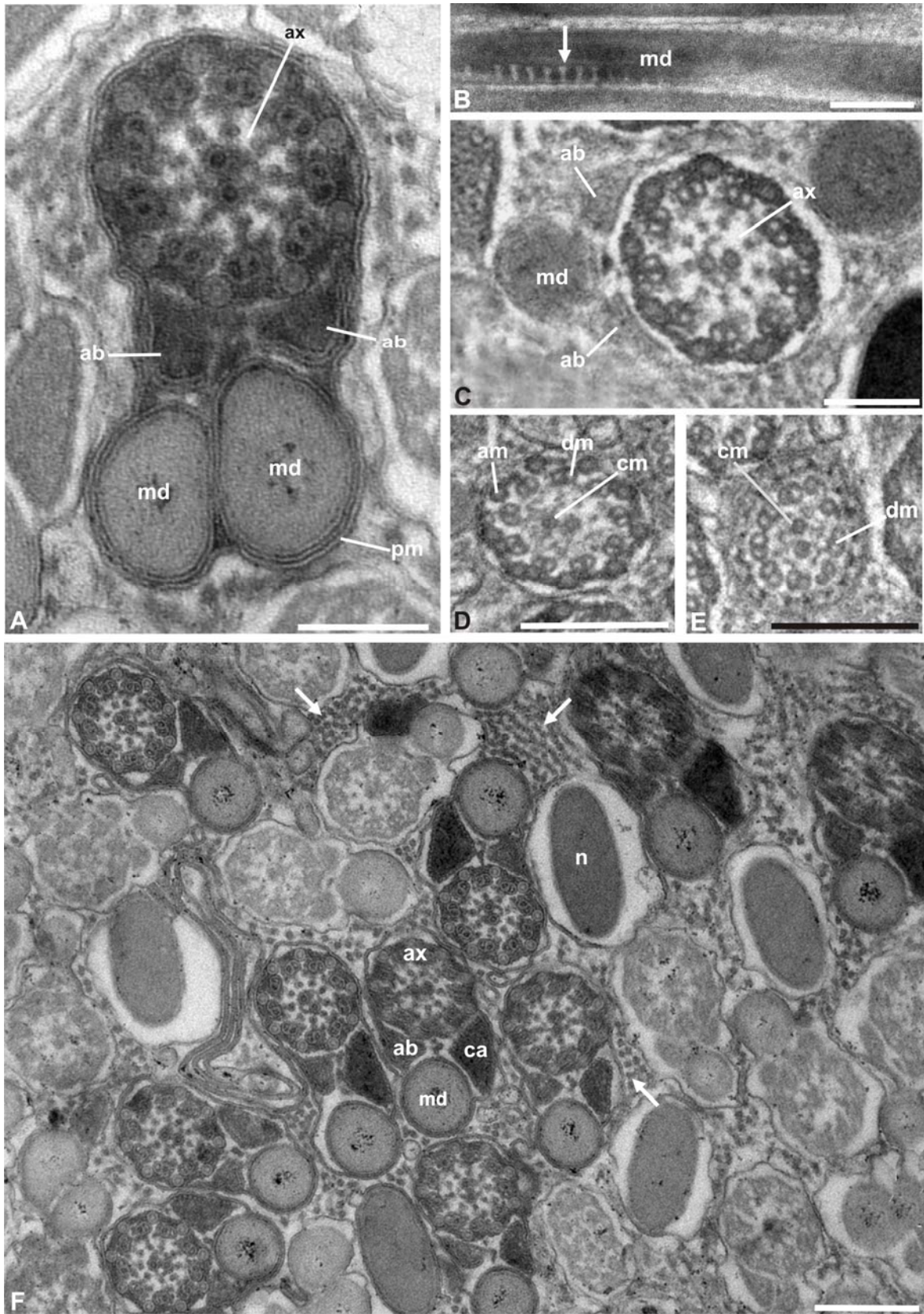
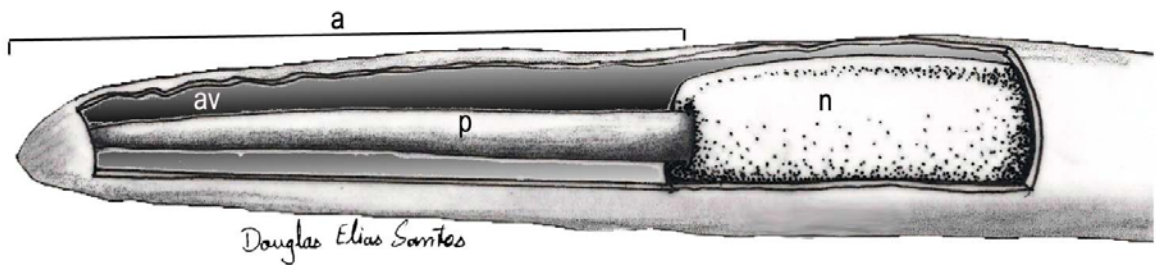
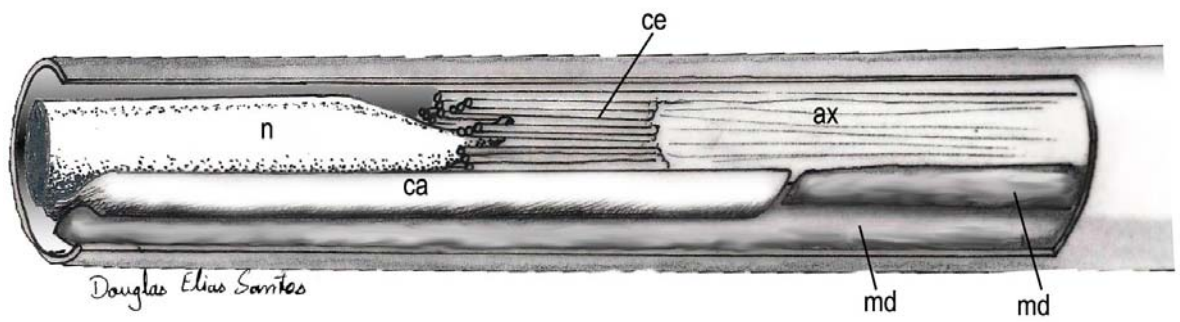


Figura 2



**A**



**B**



**C**

**Figura 3**

#### 4. Discussão

A estrutura básica dos espermatozoides de *Dissomphalus connubialis* é semelhante aos Aculeata em geral, incluindo o Bethylidae *Prorops nasuta*. Entretanto, *D. connubialis* exibe alguns caracteres ainda não descritos para qualquer outro Hymenoptera.

Os espermatozoides de *D. connubialis*, medindo 130  $\mu\text{m}$  de comprimento, se aproximam da média descrita para os demais Hymenoptera estudados (160  $\mu\text{m}$ ). Entretanto, são bem menores do que os de *P. nasuta* que, com 665  $\mu\text{m}$  de comprimento, estão entre os maiores já descritos para Hymenoptera (Oliveira et al., 2010). Contudo, em ambas as espécies de Bethylidae, a média do comprimento nuclear é de aproximadamente 16  $\mu\text{m}$ . Variação semelhante foi também descrita para outros grupos de Hymenoptera, mostrando que espécies próximas podem ter ampla divergência no comprimento do flagelo e similaridade no núcleo (Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo et al., 2008).

Espermatozoides lineares e de diâmetro uniforme apenas com as extremidades afiladas, como observado em *D. connubialis*, é uma característica comum aos Aculeata. Somente *P. nasuta* mostrou espermatozoides lineares, mas com diâmetro disforme, possuindo uma longa porção delgada (Oliveira et al., 2010). Espermatozoides espiralados são encontrados nas vespas Parasíticas das superfamílias Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001b, Fiorillo et al., 2008, Brito et al., 2009) e Platygastroidea (Lino-Neto & Dolder 2001a).

O acrossomo formado pela vesícula acrossomal e perforatorium, como observado em *D. connubialis*, é comum para ordem Hymenoptera. Embora em várias vespas parasíticas seja claramente observada uma camada extracelular cobrindo o acrossomo (Newman & Quicke, 1999; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010) e, ainda, em algumas destas vespas da superfamília Chalcidoidea não foi encontrado perforatorium (Lino-Neto et al., 2000a; Lino-Neto & Dolder,

2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009). A existência de uma cavidade na extremidade anterior do núcleo na qual a base do perforatorium está inserida é uma característica também conservada nos Hymenoptera (Jamieson et al., 1999), que varia de 0,08  $\mu\text{m}$  de profundidade em *Trypoxylon albitarse* (Araújo et al., 2009a) a 0,63  $\mu\text{m}$  em abelhas Euglossini (Zama et al., 2005a). Entretanto, o núcleo dos espermatozoides *D. connubialis* tem a maior cavidade de todos os Hymenoptera estudados, com 1,2  $\mu\text{m}$  de profundidade.

O perforatorium nos Hymenoptera aparece como um bastão denso e compacto, com ou sem organização paracristalinas. Em *D. connubialis* o perforatorium é compacto com inúmeras inclusões paracristalina. Entretanto, este arranjo não foi visto em *P. nasuta* (Oliveira et al., 2010). Em outros grupos de Aculeata também foi demonstrado perforatorium paracristalino, como Apidae (Báo et al., 2004; Fiorillo et al., 2005, 2009), o Sphecidae *Microstigmus nigrophthalmus* (Zama et al., 2007) e nas Vespidae *Agelaia vicina* e *Vespa crabro* (Mancini et al., 2006, 2009).

Nos espermatozoides da maioria dos Hymenoptera, a cromatina nuclear é fortemente eletrondensa e homogeneamente compacta, como observado em *D. Connubialis*. Entretanto, alterações na compactação da cromatina são bem evidentes em algumas espécies de Aculeata, incluindo *P. nasuta* cuja cromatina da periferia nuclear-basal mostra-se frouxa (Oliveira et. al. 2010). Em algumas Apidae a cromatina é descompactada em toda área nuclear (Zama et al., 2004; Fiorillo et al., 2005; Gracielle et al., 2009). Em Formicidae (Lino-Neto & Dolder, 2002, Moya et al., 2007) e em outras abelhas, como *Dialictus* spp. (Fiorillo et al., 2005), Xylocopini (Fiorillo et al., 2009) e nas abelhas solitárias *Thygater (Thygater) analis* e *Melitoma segmentaria* (Araujo, 2009b), a cromatina é compacta, mas com várias lacunas eletrólúcidas.

O adjunto do centríolo é uma estrutura presente nos espermatozoides da maioria dos Hymenoptera, localizado na região de transição núcleo-flagelo, estabelecendo uma conexão entre o núcleo e os elementos do flagelo. Em diferentes grupos, ou mesmo entre espécies relativamente próximas, o adjunto do centríolo pode mostra-se variado. Em *D. connubialis*, ele é longo, de formato triangular e bastante proeminente em cortes transversais, com poucas diferenças no diâmetro, quando comparado as estruturas flagelares (axonema

e derivado mitocondrial). Ainda nesta espécie, ele inicia acima da região posterior do núcleo e projeta-se por uma longa distância paralelamente ao axonema e ao derivado mitocondrial maior, confinando o derivado mitocondrial menor a uma curta estrutura no plano flagelar. Por isso, observa-se essa estrutura na maioria dos flagelos, quando seccionados transversalmente. A borda pregueada do adjunto do centríolo como observada em *D. connubialis*, também foi descrita em *P. nasuta* (Oliveira et al., 2010), em Vespidae (Mancini et al., 2009) e no 'symphyta' *A. pagana* (Lino-Neto et al., 2008). Dessa forma, essa característica parece ser comum em Hymenoptera.

Os derivados mitocondriais observados nos Hymenoptera apresentam normalmente duas regiões, uma de cristas e outra de material paracristalino, podendo exibir diferenças na posição e disposição destes. Em *D. connubialis* não foram observadas inclusões paracristalinas, e as cristas mitocondriais foram raramente visualizadas. Com relação às cristas, é possível supor que ou a grande maioria dos espermatozoides desta espécie não possui cristas, ou estas estão restritas a uma pequena região em relação ao comprimento total dos derivados mitocondriais. É importante ressaltar que estas são características que diferenciam *D. connubialis* dos demais Aculeata estudados, principalmente de *P. nasuta*, onde as cristas se mostram bem desenvolvidas e profundas e o material paracristalino é abundante e presente em ambos os derivados (Oliveira, et al., 2010).

O fato de um dos derivados mitocondriais iniciar acima da base do núcleo, como observado em *D. connubialis*, já foi descrito para outros grupos de Hymenoptera, como em *P. nasuta* (Oliveira et al., 2010), Apidae (Lino-Neto et al., 2000; Zama et al. 2004, 2005b; Fiorillo et al., 2005, 2009) Vespidae (Mancini et al. 2006, 2009), Sphecidae (Zama et al., 2005b) e também em algumas vespas Parasíticas das superfamílias Proctotrupeoidea e Platygastroidea (Quicke et al., 1992; Lino-Neto & Dolder, 2001a). Entretanto, é necessário enfatizar que diferentemente de todos os Aculeata, a projeção em *D. connubialis* avança muito além da base nuclear, o que assemelha-se mais ao observado nas vespas Parasíticas. Ainda, em Scelionidae, apenas um derivado mitocondrial foi observado e se estende até a extremidade anterior do núcleo (Lino-Neto & Dolder, 2001a). A terminação dos derivados mitocondriais na porção final do flagelo em *D. connubialis* é semelhante ao observado na

maioria dos Aculeata Apidae (Zama et al., 2001, 2004, 2005; Araujo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al. 2009), Sphecidae (Zama et al., 2005) e Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009), nos quais um dos derivados mitocondriais finaliza antes do outro, mas difere de *P. nasuta*, onde os dois derivados mitocondriais terminam juntos (Oliveira et al., 2010).

A principal diferença entre *D. connubialis* dos demais Aculeata estudados é a observação de que os microtúbulos acessórios são os primeiros a finalizarem na porção final do flagelo. Esta é uma característica observada na maioria das vespas Parasíticas (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Brito et al., 2009). Sugerindo que este grupo é filogeneticamente próximo às vespas Parasíticas.

A ocorrência de corpos acessórios como componentes do flagelo é uma característica comum à maioria dos Hymenoptera estudados, somente em Chalcidoidea não foi observado corpos acessórios (Lino-Neto et al., 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Brito et al., 2009), com exceção apenas para *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto et al., 1999). Quando presentes, eles estão sempre interpostos entre o axonema e os derivados mitocondriais, mas podem variar em formato e comprimento. Em *D. connubialis*, eles são longos, excepcionalmente grandes e de formato triangular em corte transversal.

Como observado neste estudo, muitos dos caracteres de *D. connubialis* são similares àqueles descritos para o Bethylidae *P. nasuta*, bem como para os Hymenoptera em geral. Entretanto, *D. connubialis* exibe alguns caracteres que não foram observados em *P. nasuta* e outros em nenhuma outra espécie de Hymenoptera estudada. Por exemplo, a ampla região eletrólúcida que separa a vesícula acrossomal do perforatorium e a profundidade da cavidade da extremidade anterior nuclear, onde o perforatorium está inserido são características descritas pela primeira vez. Já a longa projeção anterior de um dos derivados mitocondriais, a aparente ausência de cristas e de material paracristalino nestas organelas e os microtúbulos acessórios sendo os primeiros a finalizarem na porção final do flagelo, diferem marcadamente *D. connubialis* dos demais Aculeata estudados. Estas características confirmam a análise da morfologia dos espermatozoides de Hymenoptera como uma importante fonte de caracteres úteis para a filogenia do grupo. Entretanto, como apenas duas espécies de Bethylidae foram estudadas até o momento e

tendo em vista a diversidade de espécies encontradas nessa família, é necessário que mais espécies de Bethylidae sejam estudadas, a fim de estabelecer caracteres potenciais para contribuir com futuros estudos filogenéticos.

## 5. Referências Bibliográficas

- Alencar, IDCC & Azevedo, CO (2006). Definition of the *coronatus* species-group (Hymenoptera: Bethylidae, *Dissomphalus*) with description of thirteen new species. *Zootaxa* 1330: 1–26.
- Araújo, VA; Zama, U; Dolder, H; Lino-Neto, J (2005). Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22: 137-141.
- Araújo, VA; Moreira, J; Lino-Neto, J (2009a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron* 40, 719-723.
- Araujo, VA (2009b). Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de Hymenoptera e Hemiptera (Insecta) e suas possíveis contribuições para sistemática. Tese de doutorado. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa. 133p.
- Argaman, Q (1988). A new subfamily of Bethylidae allied to Pristocerinae (Hymenoptera). *Boll. Soc. Entomol. Ital.* 120: 139 -152.
- Báo, SN; Simões, DG & Lino-Neto, J (2004). Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicr. Cytol. Pathol.* 36: 23-28.
- Berland, L (1928). Bethylidae. In: Berland, L. (Ed.) *Fauna de France* 19 – Hyménoptères vespiformes II. Office Central de Faunistique, Paris, pp 96 -137.
- Brito, P; Lino-Neto, J; Dolder, H (2009). Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue Cell* 41: 113-117.
- Carpenter, JM (1999). What do we know about chrysidoid (Hymenoptera) relationships? *Zool Scr.* 28: 215-231.
- Carr, M; Young, JPW & Mayhew, PJ (2010). Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Syst. Evol.* 41: 55-73.
- Cock, MJW (1985). A Review of Biological Control of Pests in the Commonwealth Caribbean and Bermuda up to 1982. Commonwealth Institute of Biological Control, Technical Communication. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough. 9-218 pp.

- Evans, HE (1964). A synopsis of the American Bethylidae (Hymenoptera: Aculeata). Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard University) 132: 1-222.
- Finnamore, AT & Gauld, ID (1995). Bethylidae. In: Hansom, P.E., Gauld, I.D. (Eds.), Hymenoptera da Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, pp. 470-479.
- Fiorillo, BS; Coelho, AM; Lino-Neto, J; Bao SN (2005). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicr. Cytol. Pathol. 37: 75-81.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto, J; Bao, SN (2008). Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). Micron 39: 1271-1280.
- Fiorillo, BS; Zama, U; Lino-Neto, J; Bao, SN (2009). Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). Acta Zool. 89: 1463-1470.
- Gauld, ID & Bolton, B (1988). The Hymenoptera. British Museum (Natural History), London, and Oxford University Press, Oxford , 332 .pp.
- Gaston, KJ (1991). The magnitude of global insect species richness. Conserv. Biol. 5: 283-29.
- Gordh, G & Moczar, L (1990). A catalog of the world Bethylidae (Hymenoptera: Aculeata). Mem. Am. Entomol. 46: 1-364.
- Goulet, H & Hubner, JT (1993). Hymenoptera of the world: An identification guide to families. Research Branch, Agriculture Canada. Centre for Land and Biological Resources Research, Ottawa.
- Gracielle, IMS, Fiorillo, BS, Lino-Neto, J, Bao, SN (2009). Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). Micron.40: 419-425.
- Grimaldi, DA & Engel MS (2005). Evolution of insects. Cambridge, Cambridge Campos, LAO; Lino-Neto, J (Org.). Insetos Sociais: Da Biologia a Aplicaao. 1<sup>a</sup> ed. Viosa-MG: UFV, v. 1, 442 pp.
- Hanson, PE & Gauld, ID (1995). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, UK, xx + 893 pp.
- Krombein, KV (1979). Superfamily Bethyloidea. In: KV Krombein et al. Catalog of Hymenoptera in America North of Mexico. Vol. 2. Smithsonian Institution Press, Washington. 1203-1251.
- Jamieson, BGM; Dallai R & Afzelius BA (1999). Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.

- Lanes, GO & Azevedo, CO (2008). Phylogeny and taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylinidae, Epyrinae). *Insect Systemat. Evol.* 39: 55-85.
- LaSalle, J & Gauld, ID (1992). Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: LaSalle J & Gauld ID. *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, UK. pp 1-26
- Lino-Neto, J; Bao, SN; Dolder, H (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 253-259.
- Lino-Neto, J; Bao SN; Dolder, H (2000a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool (Stockholm)*, 81: 205-211.
- Lino-Neto, J; Bao, SN; Dolder, H (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool Scr.* 30: 89-96.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool. (Stockholm)*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2002). Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34: 124-128.
- Lino-Neto, J; Dolder, H; Mancini, K; Mercati, D; Dallai, R (2008). The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185-193.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Insect. Soc.* 53: 333-338.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H; Dallai, R (2009). Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38: 54-59.
- Moreira, J; Araujo, VA; Bao, SN; Lino-Neto, J (2010). Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron* 41: 187-192.

- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Delabie, J; Dolder, H (2007). Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.* 88: 181-187.
- Mugrabi, DF & Azevedo, CO (2010). Insecta, Hymenoptera, Bethyidae: Range extension and filling gaps in Madagascar. *Check List.* 6:062-063.
- Nagy, CG (1974). A new Bethyid subfamily allied to Protopristocerinae. *Boll. Soc. Entomol. Ital.* 106: 126-130.
- Newman, TM & Quicke DLJ (1999). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.* 8: 197-203.
- Oliveira, CM; Mancini, K; Dolder H; Lino-Neto J (2010). Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyidae). *Tissue Cell* 42: 242-246.
- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS & Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21: 381-402.
- Terayama, M (2003). Phylogenetic systematics of the family Bethyidae (Insecta:Hymenoptera). Part I. Higher classification. Academic Reports. Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics, Tokyo Metropolitan University 26: 1-15.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2001). Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10: 261-270.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2004). Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36: 29-41.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H (2005a). Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.* 52: 122-131.
- Zama, U; Brito, P; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H; Bao, SN (2005b). The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37: 313-321.
- Zama, U; Moreira, J; Bao, SN; Campos, LAO; Dolder, H; Lino-Neto, J (2007). Morphology of Testicular and Post-testicular Spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arth.Struct. & Dev.* 36: 304-316.

## Capítulo 2

### 3.2. Morfologia dos espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem) (Hymenoptera: Bethylidae)

## Resumo

A morfologia dos espermatozoides de insetos é uma importante fonte de caracteres para análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. Neste estudo foram descritas características estruturais e ultra-estruturais dos espermatozoides do Bethylidae *Cephalonomia stephanoderis*. Para isso, machos adultos foram dissecados e suas vesículas seminais processadas seguindo a metodologia de rotina para microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides de *C. stephanoderis* são finos e medem, aproximadamente, 220  $\mu\text{m}$  de comprimento. São constituídos por uma região de cabeça, formada pelo acrossomo e núcleo, e uma região de flagelo constituída pelo axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. O acrossomo é formado pela vesícula acrossomal que envolve um perforatorium paracristalino. Entre a vesícula acrossomal e o perforatorium existe um espaço preenchido por uma matriz de aspecto amorfo. O núcleo é compacto, eletrodenso e mede 9  $\mu\text{m}$ . O axonema tem o padrão microtubular 9+9+2. Os derivados mitocondriais, em corte transversal, são iguais em forma e diâmetro. Eles exibem quatro regiões distintas: duas de material paracristalino, uma de cristas e uma frouxa, localizada entre as duas primeiras. Entre os dois derivados mitocondriais observa-se um material amorfo e eletrodenso. No final do flagelo, os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem. A morfologia básica do flagelo de *C. stephanoderis* é similar aquela de outros Bethylidae estudados. Entretanto, algumas variações são muito particulares desta espécie, como a matriz amorfa localizada entre a vesícula acrossomal e o perforatorium, o material intermitocondrial, o arranjo do material paracristalino, as cristas e o material frouxo nos derivados mitocondriais.

Palavras chaves: Hymenoptera, vespa, espermatozoide, filogenia

## 1. Introdução

A ordem Hymenoptera, com mais de 115 mil espécies descritas e mais de 100 famílias divididas no grupo 'symphyta' e na subordem Apocrita (Triplehorn & Johnson, 2005), constitui um dos mais especiosos grupos de insetos. Os Apocrita dividem-se em Aculeata e Parasítica. A superfamília Chrysidoidea é considerada monofilética e grupo irmão dos demais Aculeata (Brothers & Carpenter, 1993). Chrysidoidea possui três famílias comuns e com grande número de espécies (Bethylidae, Chrysididae, Dryinidae) e quatro raras e menos abundantes (Embolemidae, Sclerogibbidae, Scolebythidae e Aplumariidae) (Fernandez & Sharkey, 2006).

Bethylidae é uma família cosmopolita com aproximadamente 2.400 espécies descritas (Mugrabi & Azevedo, 2010). Em sua maioria, são ectoparasitoides de larvas de lepidópteros e coleópteros. Por isso possuem grande importância como agente controlador de diversas pragas agrícolas (Terayama, 2003). Representantes da família, como *Cephalonomia stephanoderis* Betrem, têm sido utilizados em trabalhos de controle biológico da broca-do-café (CBB) *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), sendo considerada a espécie de parasitóide mais eficiente no controle desta praga.

Ainda existem muitas dúvidas a cerca da filogenia de Bethylidae, incluindo o reconhecimento de algumas subfamílias. A primeira análise filogenética foi apresentada por Evans (1964), baseada em três subfamílias, na qual Bethylinae é grupo irmão de Pristocerinae + Epyrinae. Posteriormente quatro subfamílias são reconhecidas: Bethylinae, Mesitiinae, Pristocerinae e Epyrinae (Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Hubner, 1993; Hanson & Gauld, 1995; Finnamore & Gauld, 1995; Carpenter, 1999), sendo esta última dividida em três tribos (Epyrini, Sclerodermini e Cephalonomiini). Dúvidas sobre o monofiletismo de Epyrinae (Epyrini) foram mencionadas com base na ausência de caracteres apomórficos (Carpenter, 1999; Terayama, 2003). Carr e colaboradores (2010), com base em dados moleculares, sugeriram que Epyrini seja monofilética, mas que Sclerodermini (*stricto sensu*) e Cephalonomiini (Evans, 1964) sejam mais próximas de Mesitiinae do que Epyrini. Este estudo ainda suporta o monofiletismo de Cephalonomiini, conforme descrito por Evans

(1964) e Lanes & Azevedo (2008), embora os dados não esclareçam a monofilia ou parafilia de Sclerodermini (Stricto sensu).

A morfologia dos espermatozoides de insetos é uma importante fonte de caracteres para análises filogenéticas (Baccetti, 1970; Dallai, 1974; Jamieson, 1987; Wheeler et al., 1990; Quicke et al., 1992; Dallai & Afzelius, 1993; Jamieson et al., 1999), que permite a caracterização de famílias, gêneros e até espécies. Em Bethylidae, apenas as espécies *Prorops nasuta* e *Dissomphalus connubilis* tiveram à ultra-estrutura dos espermatozoides descrita (Oliveira et al., 2009, 2010). Neste estudo são descritas características dos espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis*, com o objetivo de aumentar as informações que poderão contribuir para a filogenia desse grupo, assim como dos Hymenoptera em geral.

## **2. Material e Métodos**

Machos adultos de *Cephalonomia stephanoderis* (Ashmead, 1893) foram procedentes de frutos secos de café mantidos no laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **Microscopia de Luz**

Para determinação do tamanho total e do núcleo dos espermatozoides da espécie de *Cephalonomia stephanoderis*, machos adultos foram dissecados, as vesículas seminais foram retiradas e abertas e os espermatozoides extraídos e espalhados sobre lâminas histológicas, fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, por 15 minutos, lavados em água corrente e secos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram analisadas e os espermatozoides fotografados em fotomicroscópio Olympus BX60, equipado com contraste de fase. 50 espermatozoides foram fotografados para serem medidos. Para determinação do tamanho dos núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml, lavadas em água destilada e montadas com sacarose 50%. A análise e o registro fotográfico

foram feitos em microscópio de epifluorescência Olympus BX-60, equipado com filtro de excitação BP360-370 nm e foram fotografados 50 núcleos. Para a morfometria foi utilizado o programa de análise de imagem "Image-Pro Plus", versão 4.5 para Windows 98.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os espécimes tiveram suas vesículas seminais dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 e posteriormente fixadas em solução de glutaraldeído 2.5%, contendo ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e  $\text{CaCl}_2$  5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por cerca de 24 horas. O material foi, então, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, desidratado em série crescente de álcool, infiltrado e, finalmente, incluído em resina Epoxi (Epon 812). Para detecção de proteínas gerais e microtubulares, as vesículas seminais foram removidas e fixadas em solução de glutaraldeído 2.5% e ácido tânico 1%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, acrescido de sacarose 1,5% e  $\text{CaCl}_2$  5 mM, por 5 dias à 4 °C (Dallai and Afzelius, 1990). Após lavagens no mesmo tampão, as vesículas foram contrastadas em solução de acetato de uranila aquoso a 1% por 2 h à temperatura ambiente. Finalmente, elas foram desidratadas em série crescente de álcool e incluídas em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram contrastados com soluções de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 3%.

Todos os materiais foram observados e fotodocumentados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 109) no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa-UFV, Minas Gerais, Brasil.

### 3. Resultados

Os espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis* são longos e finos, medindo cerca de 220  $\mu\text{m}$  de comprimento (Fig. 1A). Eles são constituídos por uma região de cabeça, formada pelo acrossomo e núcleo, e uma região de flagelo, constituída pelo axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Conectando o núcleo ao flagelo encontra-se o adjunto do centríolo.

O acrossomo é formado por uma vesícula acrossomal e um perforatorium. A vesícula acrossomal reveste uma cavidade que contém o perforatorium e uma matriz de aspecto amorfo (Figs 1C-E). Em cortes longitudinais, a vesícula acrossomal tem forma cônica (Fig. 1C), com o lúmen preenchido por um material homogêneo de eletrodensidade mediana (Figs 1C-E). Sua base é justaposta à extremidade anterior do núcleo (Fig. 1C). A superfície externa da vesícula acrossomal é envolta por um material fortemente eletrodenso (Figs 1C-E). Em corte transversal, a vesícula acrossomal é piriforme na região anterior (Fig. 1D), tornando-se oval à medida que se aproxima do núcleo (Fig. 1E), enquanto o perforatorium é circular em toda sua extensão em corte transversal (Figs 1D-F). O perforatorium mostra várias inclusões paracristalinas (Fig. 1D) e sua extremidade posterior é inserida em uma cavidade no ápice do núcleo (Fig. 1F).

O núcleo mede cerca de 9  $\mu\text{m}$  de comprimento e, quando corado com DAPI e examinado em microscopia de fluorescência, mostra-se linear (Fig. 1B). Ele é fortemente eletrodenso, com cromatina homogênea e compacta (Figs 1C, F-H) e, em corte transversal, tem formato oval (Fig. 1H). O núcleo finaliza formando uma projeção delgada que se encaixa na porção anterior do axonema (Fig. 1G).

O adjunto do centríolo inicia adjacente à base do núcleo (Fig. 1G), se estende em paralelo ao axonema e a um dos derivados mitocondriais e termina imediatamente acima do outro derivado mitocondrial. Ele é alongado, compacto, eletrodenso e com a superfície pregueada (Figs 1G, I).

Os derivados mitocondriais são iguais em forma e diâmetro (Figs 2A-C). Eles exibem formato semicircular em corte transversal e chegam a atingir cerca de duas vezes o diâmetro do axonema na região mediana do flagelo (Fig. 2B). Neles são claramente observadas quatro regiões distintas: duas de material

paracristalino (uma proximal e outra distal ao axonema), uma de cristas e uma de material frouxo localizada entre as duas regiões paracristalinas (Figs 2A,B). As cristas mitocondriais são longas e profundas e, em cortes longitudinais, se mostram perpendiculares ao longo do eixo do derivado e com espaços regulares de 23 nm (Fig. 2A). Na finalização do flagelo ambos os derivados terminam aproximadamente juntos (Fig. 2C).

No flagelo de *C. stephanoderis* observa-se um material intermitocondrial eletrondenso que percorre toda a extensão dos derivados mitocondriais em um arranjo que lembra um cordão (Figs 2A, B, C). Este material parece conectado ao axonema (seta branca na Fig. 2B) e interligando um derivado ao outro por uma rede de filamentos perpendicular ao longo do eixo desta estrutura (Fig. 2A, B).

O axonema tem o padrão microtubular 9+9+2, com 9 microtúbulos acessórios, 9 duplas e dois centrais (Fig. 2B, C, D). Na sua região de finalização, os microtúbulos das duplas são os primeiros a finalizarem seguidos pelos centrais e por último os acessórios (Fig. 2D, E, F).

Os corpos acessórios são muito pequenos e de formato irregular (Fig. 2B). Eles são curtos e, no final do flagelo, finalizam antes dos dois derivados mitocondriais (Fig. 2C). Cada corpo acessório mostra uma ponte que se liga ao material intertubular (Fig. 2B) e, possivelmente, conecta o axonema aos derivados mitocondriais (setas pretas na Fig. 2B). O espermatozoide de *C. stephanoderis* está esquematizado na Fig. 3

**Fig. 1.** Fotomicrografias de luz **(A,B)** e eletrônica de transmissão **(C-I)** dos espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis*. **(A)** Contraste de fase de um espermatozoide mostrando região de cabeça (h) e região de flagelo (f). **(B)** Núcleo corado com DAPI. **(C)** Corte longitudinal da região da cabeça mostrando a vesícula acrossomal (av) e a matriz amorfa (asterisco), material eletrodense (seta), núcleo (n). **(D-E)** Cortes transversais da região de cabeça dos espermatozoides. Porção anterior **(D)** e mediana **(E)** do acrossomo mostrando vesícula acrossomal (av), perforatorium (p). Note o material eletrodense que circunda a vesícula (seta). Matriz amorfa (asterisco). **(F)** Região anterior do núcleo (n) mostrando o perforatorium (p) inserido em sua cavidade. **(G)** Corte longitudinal da região posterior do núcleo (n), adjunto do centríolo (ca), axonema (ax). **(H)** Corte transversal do núcleo (n). **(I)** Corte transversal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando axonema (ax), adjunto do centríolo (ca) e um derivado mitocondrial (md). Barras: A = 15  $\mu\text{m}$ ; B = 3  $\mu\text{m}$ ; C = 0,2  $\mu\text{m}$ ; D-I = 0,1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2.** Fotomicrografias eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *C. stephanoderis*. **(A)** Corte longitudinal dos derivados mitocondriais (md) mostrando cristas (setas), material paracristalino (pc), região frouxa (rf) e material intermitocondrial (asterisco). **(B)** Corte transversal da região mediana do flagelo mostrando axonema (ax), dois corpos acessórios (ab), dois derivados mitocondriais (md), material paracristalino (pc), região frouxa (rf), material intermitocondrial (asterisco). Note o material intermitocondrial ancorando o axonema (seta branca). Note também as pontes que ligam os corpos acessórios ao material intertubular (setas pretas). **(C)** Porção flagelar mostrando axonema (ax), com 9 microtúbulos acessórios (am), 9 duplas (dm) e 2 microtúbulos centrais (cm), e a finalização dos dois derivados mitocondriais (md). **(D,F)** Região de finalização do axonema, note em **(E)** que os microtúbulos das duplas (dm) são os primeiros a terminarem. Barras: A-F = 0,1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 3.** Representação esquemática do espermatozoide de *C. stephanoderis*. **(A)** Região de cabeça do espermatozoide mostrando vesícula acrossomal (av), perforatorium (p), núcleo (n). **(B)** Região de transição, núcleo (n), adjunto do centríolo (ca), axonema (ax), derivados mitocondriais (md1, md2), corpos acessórios (ab). **(C)** Região de flagelo, axonema (ax), corpo acessório (ab), derivados mitocondriais (md1, md2).

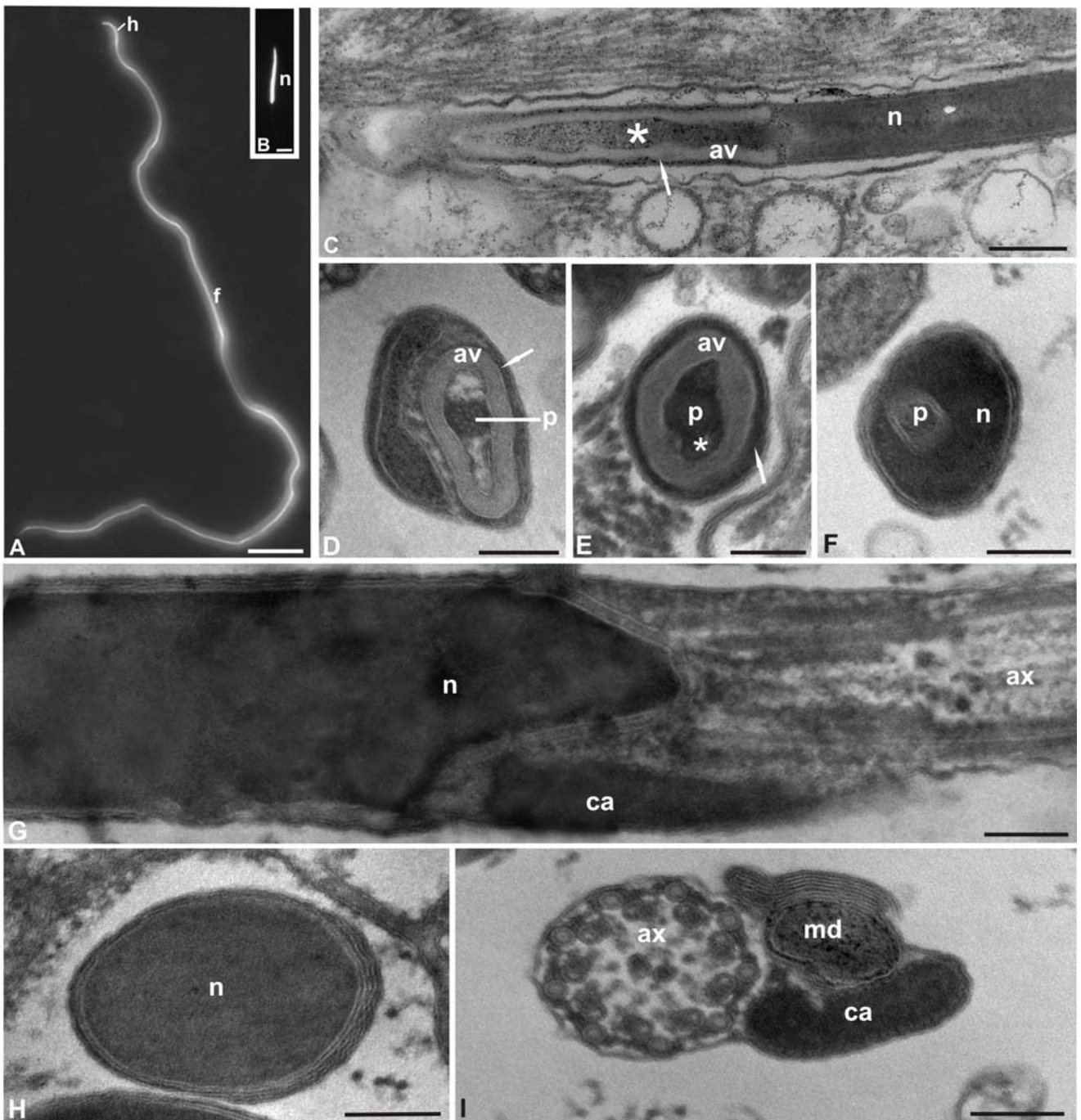


Figura 1

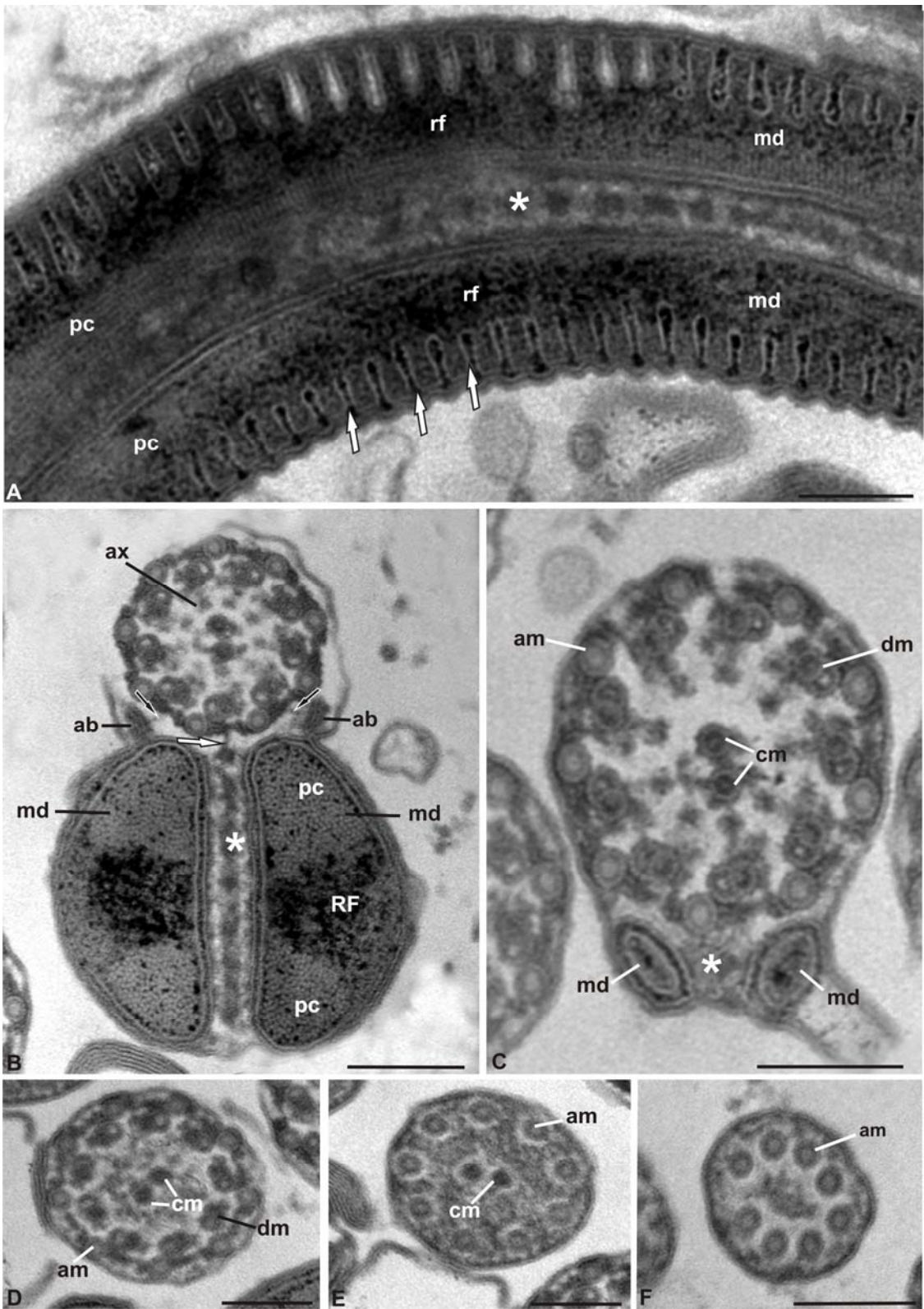
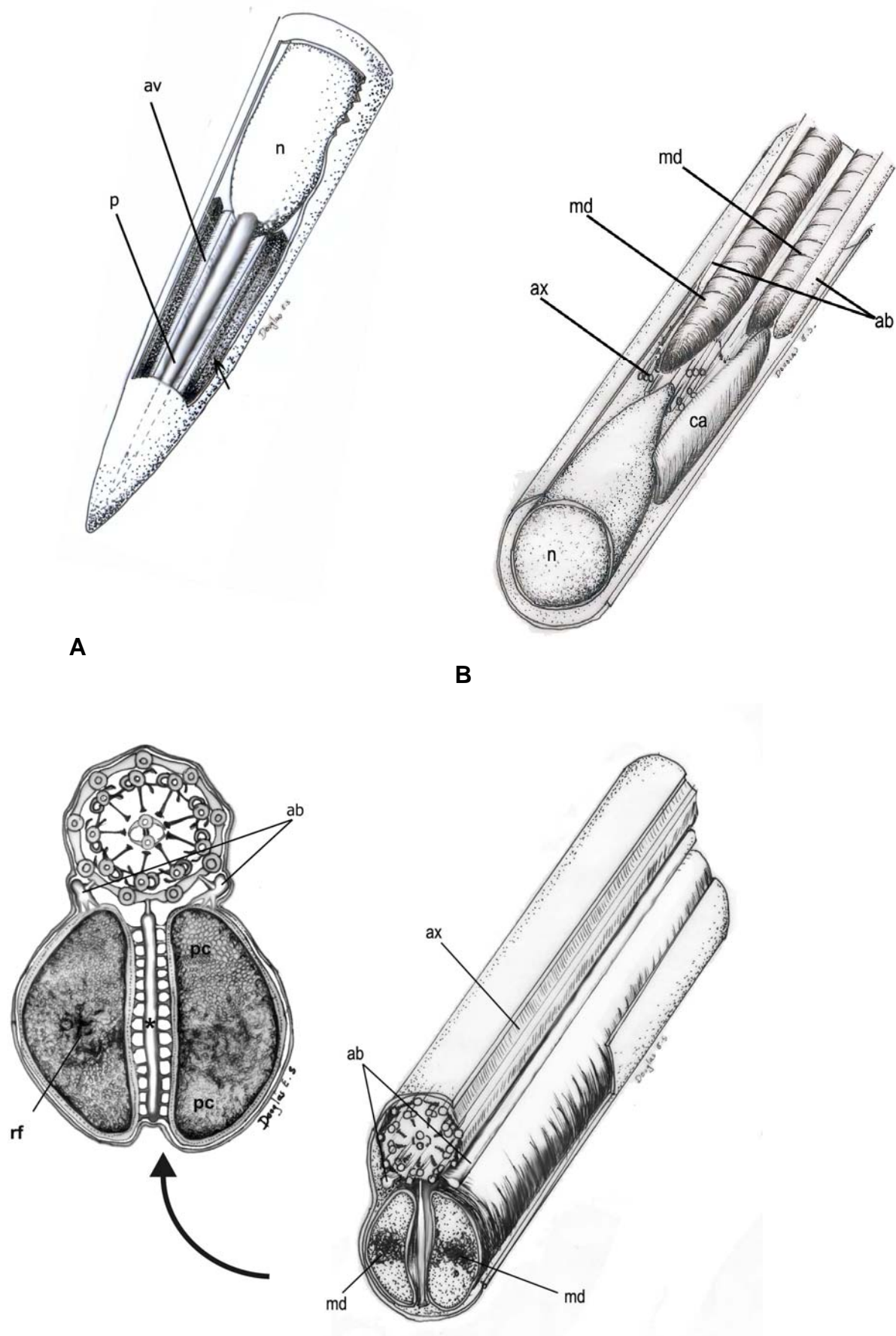


Figura 2



**Figura 3**

#### 4. Discussão

A morfologia básica dos espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis* é similar aquela de outros Hymenoptera, incluindo outros Bethylidae estudados. Entretanto, algumas variações morfológicas são muito particulares desta espécie.

O acrossomo de *C. stephanoderis*, pode ser considerado do tipo comum à maioria dos Hymenoptera, basicamente formado por uma vesícula acrossomal cônica, revestindo um perforatorium, o qual tem sua base inserida em uma cavidade no ápice do núcleo. Entretanto, algumas diferenças podem ser consideradas, como a presença da matriz de aspecto amorfo entre a vesícula e o perforatorium, a qual não tinha sido descrita em Hymenoptera e o material eletrodense revestindo a superfície externa da vesícula acrossomal. Nos Hymenoptera, excepcionalmente, nas vespas Parasíticas é comum encontrar um material extracelular associado ao ápice da cabeça. Nestes organismos, o material é denominado terceira camada e reveste todo o complexo acrossomal e a extremidade anterior do núcleo (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1999; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b, Brito et al., 2009). Ainda, em Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009) e Ichneumonoidea (Quicke et al., 1992), a partir dessa camada irradiam inúmeros filamentos que, provavelmente, correspondem a um glicocálice bastante desenvolvido.

Variações podem ser observadas no formato da vesícula acrossomal, nos diferentes grupos de Hymenoptera. Em corte transversal, elas exibem formato circular, elipsoidal, oval e triangular, dependendo do grupo analisado e da secção ao longo do comprimento do acrossomo. Nas abelhas Meliponini (Zama et al., 2004) e em formigas (Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya et al., 2007), a vesícula acrossomal varia de circular a triangular à medida que se aproxima do núcleo. Em *Apis mellifera* (Cruz-Höfling et al., 1970; Peng et al., 1993), Euglossini (Zama et al., 2005a), Xylocopini (Fiorillo et al., 2005), em Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009), no Sphecidae *Sceliphron fistularium* (Zama et al., 2005b) e nos Bethylidae *P. nasuta* e *D. connubialis* (Oliveira et al.

2009, 2010), o formato da vesícula é oval ou elipsoidal. Já em *Cephalonomia stephanoderis*, ela varia de piriforme a oval em corte transversal.

Nos Hymenoptera, com exceção de alguns Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo, et al., 2008; Brito et al., 2009) o perforatorium aparece como uma estrutura cilíndrica e eletrondensa, com a extremidade posterior inserida no ápice do núcleo. Quando seccionado transversalmente, ele pode ser visto paracristalino, como observado nesta espécie, em *Dissomphalus connubialis* (Oliveira et al., 2009), em alguns Apidae (Báo et al., 2004; Fiorillo et al., 2005, 2009), no Sphecidae *Microstigmus nigrophthalmus* (Zama et al., 2007) e Vespidae *Agelaia vicina* e *Vespa crabro* (Mancini et al., 2006, 2009). Já *Prorops nasuta* (Oliveira et al., 2010), mesmo sendo pertencente a mesma subfamília de *C. stephanoderis* possui perforatorium sem organização paracristalina, como observado nos outros Hymenoptera estudados. É necessário que mais estudos sejam feitos para saber se o perforatorium paracristalino é uma característica compartilhada entre os Bethyridae e, que talvez, tenha sido perdida no gênero *Prorops*.

Em todos os Bethyridae estudados (Oliveira et al., 2009, 2010), assim como em *C. stephanoderis*, o formato do núcleo é oval em corte transversal. O aspecto da cromatina também é semelhante nestas espécies, com a cromatina fortemente eletrondensa e homogeneamente compacta, como descrito para a maioria dos Hymenoptera analisados. Entretanto, em *P. nasuta*, na região basal do núcleo, a cromatina é encontrada em grossos filamentos não compactados (Oliveira et al., 2010). Em Formicidae (Lino-Neto & Dolder, 2002, Moya et al., 2007) e nas abelhas Halictidae (Fiorillo et al., 2005) e Xylocopini (Fiorillo et al., 2009), o núcleo possui cromatina compacta com algumas inclusões ou lacunas elétron-lúcidas. Em outros Apidae (Zama et al., 2004; Fiorillo et al., 2005; Gracielle et al., 2009), o núcleo mostra cromatina pobremente condensada.

A ocorrência do adjunto do centríolo na transição núcleo flagelo é comum nos Hymenoptera. Em Aculeata, incluindo *C. stephanoderis*, ele é localizado adjacente à região posterior do núcleo, estende-se paralelamente às regiões anteriores do axonema e do derivado mitocondrial maior e se assenta sobre a extremidade anterior do derivado mitocondrial menor. Somente o *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Araújo et al., 2009) e as formigas (Lino-

Neto & Dolder, 2002; Moya et al., 2007) constituem exceções. Em *T. albitarse* o adjunto do centríolo inicia lateralmente acima da base do núcleo, se estende paralelamente ao axonema e termina sobre a extremidade anterior dos dois derivados mitocondriais. Já em formigas, ele situa-se abaixo da base nuclear e acima da extremidade anterior dos dois derivados mitocondriais. O formato oval do adjunto do centríolo, em corte transversal, é semelhante ao observado em *P. nasuta*, mas difere de *D. connubialis*, o qual apresenta formato triangular. A superfície pregueada do adjunto do centríolo observada em *C. stephanoderis* parece ser comum para Bethyilidae, visto que todas as outras espécies analisadas exibem esta característica (Oliveira et al., 2009, 2010).

Com relação aos derivados mitocondriais, os espermatozoides de *C. stephanoderis* compartilham várias características com aquelas encontradas em *P. nasuta*, como derivados mitocondriais iguais em formato e área em corte transversal, material paracristalino localizados nos dois derivados mitocondriais, cristas mitocondriais longas e profundas. Derivados mitocondriais iguais em formato e área em corte transversal também foram observados em Formicidae (Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya et al., 2007), Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010) e na maioria dos Chalcidoidea (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008). Em contraste, em muitos outros Hymenoptera, como Apidae (Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Lino-Neto et al., 2000b; Báó et al., 2004; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al., 2009), Sphecidae (Zama et al., 2005b) e Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009) e em algumas vespas Parasíticas da família Eucoilidae e das superfamílias Megalyroidea (Newman e Quicke, 1999, 2000) e Chalcidoidea (Brito et al., 2009), os derivados mitocondriais são assimétricos em diâmetro e comprimento. Ainda, nestes Hymenoptera, com exceção de Chalcidoidea (Brito et al., 2009), somente o derivado mitocondrial maior mostra uma região paracristalina localizada distalmente em relação ao axonema. Entretanto, diferentemente destes, o material paracristalino de *C. stephanoderis* localiza-se em duas regiões em cada um dos derivados, uma proximal e outra distal ao axonema. Já em *P. nasuta*, o material paracristalino ocorre em apenas uma região, nas faces adjacentes dos derivados em uma organização semelhante a uma meia lua (Oliveira, et al., 2010). Nas formigas, este material é também

localizado nos dois derivados mitocondriais, nas regiões adjacentes ao axonema. Em *D. connubialis* (Oliveira, et al., 2009) e em alguns Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009) não foi observado material paracristalino. A região frouxa existente nos derivados mitocondriais de *C. stephanoderis* é uma característica que ainda não tinha sido observada nos Hymenoptera.

Outra característica incomum, ainda não descrita para qualquer outro Hymenoptera é a presença do material intermitocondrial no flagelo dos espermatozoides de *C. stephanoderis*. Como este material parece conectado ao axonema e, ainda, interligar um derivado ao outro, é possível supor que tenha função semelhante à estrutura em forma de âncora situada entre os derivados mitocondriais e o material intertubular do axonema, observada em espécies de Heteroptera (Dolder, 1989; Mercati et al., 2009, ). Segundo Mercati et al. (2009), esta estrutura conecta os derivados mitocondriais ao material intertubular e pode ter a função de manter a posição do axonema durante o batimento flagelar, evitando uma distorção que possa afetar a mobilidade do flagelo. Lino-Neto e colaboradores (1999), estudando espermatozoide de Chalcidoidea, descreveram um material eletrondenso localizado entre o axonema e os dois derivados mitocondriais que eles chamaram de material centro-flagelar. Material semelhante foi também observado nas micrografias eletrônicas do flagelo de alguns Apidae (Zama et al., 2001, 2004, 2005a, Fiorillo, et al., 2005, 2009) e mais recentemente em Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009) e nos outros Bethyidae analisados (Oliveira et al., 2009, 2010), embora, nestes trabalhos, não tenha sido descrito detalhadamente. É sugerido, que o material centro-flagelar seja um remanescente do material intermitocondrial (ver Fig. 2C) e que, talvez, tenha função semelhante.

Os corpos acessórios são estruturas que na maioria dos Hymenoptera estudados são encontrados entre o axonema e os derivados mitocondriais e, geralmente, têm formato irregular em corte transversal, como observado em *C. stephanoderis*. Já em espécies como *D. connubialis* (Oliveira et al., 2009) e em Apidae (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001; Fiorillo et al., 2005, Araujo, 2009), eles exibem claramente formato triangular. Em algumas vespas Parasíticas não foram observados corpos acessórios (Lino-Neto et al., 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Lino-Neto & 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al.,

2009). Os corpos acessórios são notavelmente variados em área e comprimento nas diferentes espécies de Bethylidae analisadas. Em *C. stephanoderis*, aparentemente eles são curtos e bem reduzidos em diâmetro, o que parece ser um dos menores já observados em Hymenoptera. Já *P. nasuta* exhibe corpos acessórios de tamanho mediano (Oliveira et al., 2010), enquanto que em *D. connubialis*, eles são longos e proeminentes quase atingindo o tamanho do adjunto do centríolo na região anterior do flagelo (Oliveira et al., 2009). A função dos corpos acessórios ainda não está esclarecida. Zama et al. (2001) sugerem que eles estejam envolvidos na conexão entre axonema e os derivados mitocondriais. A observação de que cada corpo acessório possui uma ponte que se liga ao material intertubular, conectando o axonema aos derivados mitocondriais no flagelo dos espermatozoides de *C. stephanoderis* (ver Fig. 2B setas pretas), é uma característica que somente agora foi observada entre os Hymenoptera e fortalece a função proposta por estes autores. Este achado suporta, ainda, a possível função do material intermitocondrial na estabilidade do flagelo. É importante notar que axonema, corpos acessórios e derivados mitocondriais, nesta espécie, estão perfeitamente interligados (ver Fig. 2B). É possível, ainda, que estas pontes estejam presentes em praticamente todos os Hymenoptera e que devido à fixação ou micrografias desfavoráveis não tenha sido possível visualizá-las. Se assim for confirmado, que esta estrutura está presente em outros grupos de Hymenoptera ou é comum à maioria dos Hymenoptera, então esta é mais uma característica que pode ser usada para análises taxonômicas e filogenéticas.

De maneira geral, em insetos o axonema apresenta o padrão 9+9+2 microtúbulos e se inicia como centríolo na região anterior do flagelo. No final do flagelo o axonema é desorganizado gradualmente e, em diferentes grupos, a sequência de desorganização dos microtúbulos pode variar consideravelmente. Na maioria dos Aculeata, primeiro terminam o par central, seguido das nove duplas e, por último, os microtúbulos acessórios. Na família Bethylidae, considerada Aculeata, as espécies até agora analisadas mostram que a variação nesta característica é bastante enfática. *Prorops nasuta* (Oliveira et al., 2010) segue o padrão de Aculeata, sendo os acessórios os últimos a finalizarem, porém, estes terminam muito depois em relação aos outros microtúbulos. Em *C. stephanoderis*, os microtúbulos das duplas são os

primeiros a se desorganizarem, em sequência, os centrais e por fim os acessórios. Já em *D. connubialis* (Oliveira et al., 2009), os acessórios são os primeiros a terminarem na porção final do flagelo.

De acordo com as informações acima, a morfologia dos espermatozoides de *C. stephanoderis* demonstrou uma diversidade de informações que certamente poderá ser utilizada para resolver incertezas sobre as relações filogenéticas entre essa família, bem como entre a ordem Hymenoptera em geral.

## 5. Referências Bibliográficas

- Araújo, VA; Zama, U; Dolder, H; Lino-Neto, J (2005). Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae. Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22: 137-141.
- Araújo, VA; Moreira, J; Lino-Neto, J (2009). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). Micron 40, 719-723.
- Baccetti, B (1970). The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: Baccetti, B. Comparative spermatology. New York, Academic Press 169-182 pp.
- Báo, SN; Simões, DG & Lino-Neto, J (2004). Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). J. Submicr. Cytol. Pathol. 36: 23-28.
- Brito, P; Lino-Neto, J; Dolder, H (2009). Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). Tissue Cell 41: 113-117.
- Brothers, DJ & Carpenter, JM (1993). Phylogeny of Aculeata: Chryridoidea and Vespoidea (Hymenoptera). J. Hym. Res. 2: 227:302.
- Carpenter, JM (1999). What do we know about chrysidoid (Hymenoptera) relationships? Zool Scr. 28: 215-231.
- Carr, M; Young, JPW & Mayhew, PJ (2010). Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethyloidea) inferred from 28S and 16S rRNA genes. Insect Syst. Evol. 41: 55-73.
- Cruz-Höfling, MA; Cruz-Landim, C & Kitajima, EW (1970). The fine structure of spermatozoa from the honey bee. An. Acad. Bras. Ciênc. 42: 69-78.
- Dallai, R (1974). Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta apterygota. Pedobiol. 14: 148-156.
- Dallai, R & Afzelius, BA (1993). Development of the accessory tubules of insect sperm flagella. J. Submicr Cytol. Pathol. 25: 499-504.
- Evans, HE (1964). A synopsis of the American Bethyloidea (Hymenoptera: Aculeata). Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard University) 132: 1-222.

- Fernández, F & Sharkey, M (2006). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Bogotá Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, 893 pp.
- Finnamore, AT & Gauld, ID (1995). Bethylidae. In: Hansom, P.E., Gauld, I.D. (Eds.), Hymenoptera da Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, pp. 470-479.
- Fiorillo, BS; Coelho, AM; Lino-Neto, J; Bão SN (2005). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicr. Cytol. Pathol. 37: 75-81.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto, J; Bão, SN (2008). Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). Micron 39: 1271-1280.
- Fiorillo, BS; Zama, U; Lino-Neto, J; Bão, SN (2009). Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). Acta Zool. 89: 1463-1470.
- Gauld, ID & Bolton, B (1988). The Hymenoptera. British Museum (Natural History), London, and Oxford University Press, Oxford , 332 .pp.
- Goulet, H & Hubner, JT (1993). Hymenoptera of the world: An identification guide to families. Research Branch, Agriculture Canada. Centre for Land and Biological Resources Research, Ottawa.
- Gracielle, IMS, Fiorillo, BS, Lino-Neto, J, Bão, SN (2009). Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). Micron.40: 419-425
- Hanson, PE & Gauld, ID (1995). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, UK, xx + 893 pp.
- Jamieson, BGM (1987). The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press. 89-101 pp.
- Jamieson, BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999). Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.
- Lanes, GO & Azevedo, CO (2008). Phylogeny and taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylinidae, Epyrinae). Insect Systemat. Evol. 39: 55-85.
- Lino-Neto, J; Bão, SN; Dolder, H (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 28: 253-259.
- Lino-Neto, J; Bão SN; Dolder, H (2000a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma*

*atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Acta Zool (Stockholm), 81: 205-211.

Lino-Neto, J; Bao, SN; Dolder, H (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. Tissue Cell, 32: 322-327.

Lino-Neto, J & Dolder, H (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. Zool Scr. 30: 89-96.

Lino-Neto, J & Dolder, H (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). Acta Zool. (Stockholm), 82: 159-164.

Lino-Neto, J & Dolder, H (2002). Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). Tissue Cell 34: 124-128.

Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). Insect. Soc. 53: 333-338.

Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H; Dallai, R (2009). Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Vespidae). Arthropod. Struct. Dev. 38: 54-59.

Dolder, MAH (1989). Cytoskeletal Bridges between Organelles in Sperm Flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). J. Ultrastruct And Mol Struct Res. 101: 159-164.

Mercati, D; Giusti, F; Dallai, R. (2009). A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). J. Morphol. 270: 825-833.

Moreira, J; Araujo, VA; Bao, SN; Lino-Neto, J (2010). Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). Micron 41: 187-192.

Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Delabie, J; Dolder, H (2007). Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). Acta Zool. 88: 181-187.

Mugrabi, DF & Azevedo, CO (2010). Insecta, Hymenoptera, Bethyridae: Range extension and filling gaps in Madagascar. Check List. 6:062-063.

Newman, TM & Quicke DLJ (1999). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). J. Hym. Res. 8: 197-203.

- Newman, TM & Quicke DLJ (2000). Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). J. Hym. Res. 9: 62-70.
- Oliveira, CM; Fraga, FB; Brito, P; Gomes, LF & Lino-Neto, J. (2009). Ultrastructural characteristics of *Dissomphalus connubialis* sperm (ashmead, 1893) (Hymenoptera: Bethylidae). XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica e Microanálise.
- Oliveira, CM; Manicini, K; Dolder H; Lino-Neto J (2010). Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethylidae). Tissue Cell 42: 242-246.
- Peng, CYS; Yin, CM & Yin, LRS (1993). Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. Physiol. Entomol. 18: 93-101.
- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS & Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). Zool. Scr. 21: 381-402.
- Terayama, M (2003). Phylogenetic systematics of the family Bethylidae (Insecta:Hymenoptera). Part I. Higher classification. Academic Reports. Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics, Tokyo Metropolitan University 26: 1-15.
- Triplehorn, CA; Johnson, N (2005). Introduction to the Study of Insects. Belmont, California, Thomson Brooks/Cole.
- Wheeler, DE; Crichton, ED; Krutzsch, PH (1990). Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae:Hymenoptera). J. Morphol. 206: 343-350.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2001). Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J. Hym. Res. 10: 261-270.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2004). Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). Tissue Cell 36: 29-41.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H (2005a). Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). Insect. Soc. 52: 122-131.
- Zama, U; Brito, P; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H; Bão, SN (2005b). The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 37: 313-321.

Zama, U; Moreira, J; Bao, SN; Campos, LAO; Dolder, H; Lino-Neto, J (2007).  
Morphology of Testicular and Post-testicular Spermatozoa in *Microstigma*  
*arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera:  
Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. Arth.Struct. &  
Dev. 36: 304-316.

## Capítulo 3

### 3.3. Estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *Apenesia* sp. (Hymenoptera: Bethylidae)

## Resumo

A morfologia dos espermatozoides é uma importante fonte de caracteres que poderá ser utilizada para estudos filogenéticos e taxonômicos em Hymenoptera. O objetivo deste estudo foi descrever a morfologia dos espermatozoides de *Apenesia* sp. (Bethylidae) e comparar com os dados morfológicos de outros Hymenoptera existentes na literatura e desta forma contribuir com a sistemática dessa importante ordem de insetos. Para tanto, nós utilizamos microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides de *Apenesia* sp. medem 80  $\mu\text{m}$  de comprimento. O acrossomo é composto de uma vesícula acrossomal e um perforatorium. A vesícula acrossomal é coberta parcialmente por uma camada extracelular da qual irradiam vários filamentos. O núcleo é compacto, eletrondenso e mede cerca de 10  $\mu\text{m}$  de comprimento. Em cortes transversais, a região anterior do adjunto do centríolo tem formato laminar e a posterior triangular. Ele se estende paralelamente da extremidade posterior do núcleo à anterior de um dos derivados mitocondriais. Os derivados mitocondriais diferem em comprimento: um deles inicia acima da base do núcleo e o outro abaixo do adjunto do centríolo, sendo ambos circulares em cortes transversais. Na região de finalização do flagelo, um dos derivados finaliza primeiro que o outro. Finalmente, na região de terminalização do axonema os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem. A morfologia geral do espermatozoide de *Apenesia* sp. é semelhante a dos outros Bethylidae estudados, mas mostra variações como por exemplo, a presença da camada extracelular cobrindo o acrossomo, característica esta incomum aos Aculeata, e o formato do adjunto do centríolo. Isso mostra que mesmo entre grupos muito próximos, existe diversidade suficiente que certamente é importante para esclarecer as relações filogenéticas entre a família Bethylidae e a ordem Hymenoptera em geral.

**Palavras chaves:** Chrysoidea, morfologia, filogenia, espermatozoide

## 1. Introdução

Os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas. Estes são considerados o grupo mais derivado dentro a ordem Hymenoptera. Aculeata possui 19 famílias distribuídas entre as superfamílias: Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea (LaSalle & Gauld, 1992).

Chrysidoidea é considerada monofilética e grupo irmão dos demais Aculeata (Brothers & Carpenter, 1993), sendo relativamente pequena, com aproximadamente 4000 espécies distribuídas em 7 famílias (Goulet & Hubner, 1993). Este grupo inclui espécies de parasitoides que tem um importante papel ecológico, por serem usados no controle biológico de pragas.

Bethylidae (Chrysidoidea) é uma família cosmopolita constituída por aproximadamente 100 gêneros e 2400 espécies descritas (Mugrabi & Azevedo, 2010) que se alimentam de larvas e pupas de Coleóptera e Lepidoptera, ocorrendo geralmente em situações criptas, como solo, serapilheira, madeira, caule e semente (Evans, 1964; Gauld & Hanson, 1995). Essa família exibe uma diversidade de adaptações morfológicas, de desenvolvimento e comportamento para explorar seus hospedeiros. As características comuns incluem adaptações morfológicas para entrar no habitat do hospedeiro (tamanho pequeno, corpo achatado, cabeça prognata, asas reduzidas) e estratégias, como picadas e envenenamento do hospedeiro, alimentação e ectoparasitismo (Evans, 1964; Hanson & Gauld, 1995).

O gênero *Apenesia* Westwood (1874) tem 171 espécies descritas no mundo, sendo 96 delas da região neotropical com 52 registradas no Brasil (Corrêa & Azevedo, 2006). Os machos exibem um maior número de caracteres taxonômicos em relação às fêmeas, isso faz com que a taxonomia do grupo seja baseada quase que exclusivamente neles (Corrêa & Azevedo, 2006).

Muitos aspectos da sistemática de Bethylidae permanecem não resolvidos. As análises sobre a taxonomia de suas subfamílias não são consensuais (Berland, 1928; Evans, 1964; Nagy, 1974; Argaman, 1988; Gordh & Móczár 1990; Finnamore & Gauld, 1995; Carpenter, 1999; Terayama 2003; Carr et al. 2010). Também existem contradições quanto à monofilia de algumas

tribos e subfamílias (Evans, 1964; Carpenter, 1999; Terayama 2003; Lanes & Azevedo 2008; Carr et al. 2010)

A morfologia dos espermatozoides tornou-se uma importante fonte de caracteres para estudos taxonômicos e filogenéticos (Bacceti, 1970; Dallai, 1974; Jamieson, 1987, Lino-Neto et al., 1999). Em Hymenoptera, a morfologia dos espermatozoides é conhecida em espécies de vários táxons (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000a, 2008; Lino-Neto & Dolder, 2001a, 2002; Zama et al., 2001, 2005; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2008; Brito et al., 2009; Mancini et al., 2006, 2009, Moreira et al., 2010). Em Bethylidae, a ultraestrutura dos espermatozoides é conhecida em espécies dos gêneros *Prorops* e *Cephalonomia* (Epyrinae) e *Dissomphalus* (Pristocerinae) (Oliveira et al., 2009, 2010a, 2010b). Estes estudos têm demonstrado que a diversidade de caracteres dessas células pode contribuir com a filogenia de Bethylidae, bem como da ordem Hymenoptera. Neste aspecto, o presente trabalho descreve a ultraestrutura dos espermatozoides de *Apenesia* sp.

## 2. Material e Métodos

Machos adultos de *Apenesia* sp. foram coletados no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Para captura dos insetos foi utilizado rede entomológica.

### Microscopia de Luz

Para determinação do tamanho total e do núcleo dos espermatozoides da espécie de *Apenesia* sp., machos adultos foram dissecados, as vesículas seminais foram retiradas e abertas e os espermatozoides extraídos e espalhados sobre lâminas histológicas, fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, por 15 minutos, lavados em água corrente e secos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram analisadas e os espermatozoides fotografados em fotomicroscópio Olympus BX60, equipado com contraste de fase. 50 espermatozoides foram

fotografados para serem medidos. Para determinação do tamanho dos núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml, lavadas em água destilada e montadas com sacarose 50%. A análise e o registro fotográfico foram feitos em microscópio de epifluorescência Olympus BX-60, equipado com filtro de excitação BP360-370 nm e foram fotografados 50 núcleos. Para a morfometria foi utilizado o programa de análise de imagem “Image-Pro Plus”, versão 4.5 para Windows 98.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os espécimes tiveram suas vesículas seminais dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 e posteriormente fixadas em solução de glutaraldeído 2.5%, contendo ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por cerca de 24 horas. O material foi, então, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, desidratado em série crescente de álcool, infiltrado e, finalmente, incluído em resina Epoxi (Epon 812). Para detecção de proteínas gerais e microtubulares, as vesículas seminais foram removidas e fixadas em solução de glutaraldeído 2.5% e ácido tânico 1%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, acrescido de sacarose 1,5% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM, por 5 dias à 4 °C (Dallai and Afzelius, 1990). Após lavagens no mesmo tampão, as vesículas foram contrastadas em solução de acetato de uranila aquoso a 1% por 2 h à temperatura ambiente. Finalmente, elas foram desidratadas em série crescente de álcool e incluídas em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram contrastados com soluções de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 3%.

Todos os materiais foram observados e fotodocumentados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 109) no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa-UFV, Minas Gerais, Brasil.

### 3. Resultados

O espermatozoide de *Apenesia* sp. é fino e mede cerca de 80  $\mu\text{m}$  de comprimento. Em microscopia de contraste de fase, a cabeça do espermatozoide é linear enquanto o flagelo aparenta ser ondulado ao longo de toda a sua extensão (Fig.1A). A região de cabeça é formada pelo acrossomo e pelo núcleo, e a região do flagelo por um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Conectando a cabeça ao flagelo, encontra-se um adjunto do centríolo.

O acrossomo é formado por uma vesícula acrossomal cônica e um perforatorium (Fig. 1C). Longitudinalmente, vê-se que aproximadamente dois terços da vesícula acrossomal é revestida por uma camada extracelular de eletrondensidade mediana, da qual irradiam inúmeros filamentos (Fig. 1C). A vesícula acrossomal é oval em cortes transversais em toda sua extensão (Figs 1D,E). O perforatorium é longo e com as extremidades afiladas, denso, compacto e paracristalino (Figs 1C-G). A extremidade posterior do perforatorium é inserida em uma cavidade no ápice do núcleo (Figs 1C, F-G).

O núcleo mede cerca de 13  $\mu\text{m}$  de comprimento (Fig. 1B) e é preenchido por cromatina homogênea e compacta. Tem formato circular em cortes transversais (Fig 1I), tornando-se afilado na região posterior (Figs 1H, J-N).

Tanto o acrossomo quanto o núcleo são revestidos pelos inúmeros filamentos que surgem da camada extracelular. Estes filamentos provavelmente correspondem a um glicocálix bem desenvolvido (figs 1C-G, J-M).

O núcleo está ligado ao flagelo pelo adjunto do centríolo. Esta estrutura é alongada e eletrondensa. Se inicia paralelamente da extremidade posterior do núcleo à anterior de um dos derivados mitocondriais e se estende até a extremidade anterior do outro derivado mitocondrial (Figs 1H, J-M). Em corte transversal, a região anterior do adjunto do centríolo tem formato laminar e envolve a base do núcleo (Fig. 1M) e, em seguida, na região do flagelo, assume formato triangular e com a periferia pregueada (Fig. 2A).

Os derivados mitocondriais diferem em comprimento. Um deles surge primeiro, acima da base do núcleo (Fig. 1H) e segue em paralelo ao longo do

comprimento do flagelo, enquanto o outro surge abaixo do adjunto do centríolo (Fig. 2B). Eles terminam em locais diferentes do flagelo (Figs 2D-F), com o mais longo finalizando antes da desorganização do axonema e do fim de um dos corpos acessórios (Fig. 2F). Os derivados mitocondriais são circulares em cortes transversais (Figs 2A-E). Nos cortes longitudinais dos derivados mitocondriais vê-se que as cristas mitocondriais apresentam espaços regulares de aproximadamente 25 nm e são perpendiculares ao maior eixo dessas estruturas (Fig. 2I). Os derivados mitocondriais não mostram material paracristalino (Figs 2A-E,I).

Os corpos acessórios são grandes e triangulares em cortes transversais (Figs 2A-F). Eles diferem em comprimento, com um deles finalizando junto com o derivado mitocondrial mais curto, enquanto o outro termina após o final do derivado mitocondrial mais longo (Figs. 2E-F).

O axonema tem o arranjo microtubular 9 + 9 + 2 (fig. 2A). Na região de desorganização do axonema, os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem (Figs 2F,G,H). O espermatozoide de *Apenesia* sp. está esquematizado na Fig. 3.

## Legendas das figuras

**Fig. 1.** Fotomicrografias de luz (**A,B**) e eletrônica de transmissão (**D-N**) dos espermatozoides de *Apenesia* sp. (**A**) Contraste de fase de um espermatozóide mostrando região de cabeça (h) e flagelo (f). (**B**) Núcleo (n) corado com DAPI. (**C**) Corte longitudinal da região da cabeça mostrando a camada extracelular (c) com inúmeros filamentos (setas), vesícula acrossomal (av), e perforatorium (p) inserido na extremidade anterior do núcleo (n). (**D-E**) Cortes transversais da região de cabeça dos espermatozoides. (**D**) Porção anterior, (**E**) porção mediana e (**F**) porção posterior da região de cabeça mostrando a camada extracelular (c) com os filamentos (seta), vesícula acrossomal (av), perforatorium (p), núcleo (n). (**G**) Região anterior do núcleo (n) mostrando o perforatorium (p) inserido em sua cavidade. (**H**) Corte longitudinal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando a base do núcleo (n) inserida na porção anterior do axonema (ax). Note a projeção do derivado mitocondrial (md) acima da base do núcleo (n) e o adjunto do centríolo (ca) interposto entre o núcleo (n) e o derivado mitocondrial (md). (**I**) Corte transversal da região mediana e (**J-M**) posterior do núcleo (n), adjunto do centríolo (ca) e um derivado mitocondrial (md). Barras: A = 5  $\mu\text{m}$ ; B = 3  $\mu\text{m}$ ; C-G = 0,1  $\mu\text{m}$ ; H-M = 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2.** Fotomicrografias eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *Apenesia* sp. (**A**) Corte transversal do início do flagelo mostrando, o axonema (ax), com 9 microtúbulos acessórios (am), 9 duplas (dm) e 2 microtúbulos centrais (cm), adjunto do centríolo (ca), corpo acessório (ab) e derivado mitocondrial (md). (**B,C**) região mediana do flagelo mostrando axonema (ax), dois corpos acessórios (ab), dois derivados mitocondriais (md). (**D**) Porção flagelar mostrando axonema (ax), dois corpos acessórios (ab) e um derivado mitocondrial (md). (**E-F**) Região de finalização do flagelo mostrando em (**E**) axonema (ax), um corpo acessório (ab), um derivado mitocondrial. Em (**F**) que os corpos acessórios terminam em alturas diferentes. (**G-H**) Região de finalização do axonema, note que os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem. (**I**) Corte longitudinal de um dos derivados mitocondriais (md) mostrando as cristas (setas) Barras: A-I = 0,1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 3.** Representação esquemática do espermatozoide de *Apenesia* sp. (**A**) Região de cabeça mostrando a camada extracelular (c), perforatorium (p), vesícula acrossomal (av), (núcleo) (n). (**B,C**) Região de transição, núcleo (n), adjunto do centríolo (ca), corpo acessório (ab), derivado mitocondrial (md), axonema (ax). (**D**) Região de flagelo, derivados mitocondriais (md1, md2) axonema (ax), corpo acessório (ab).

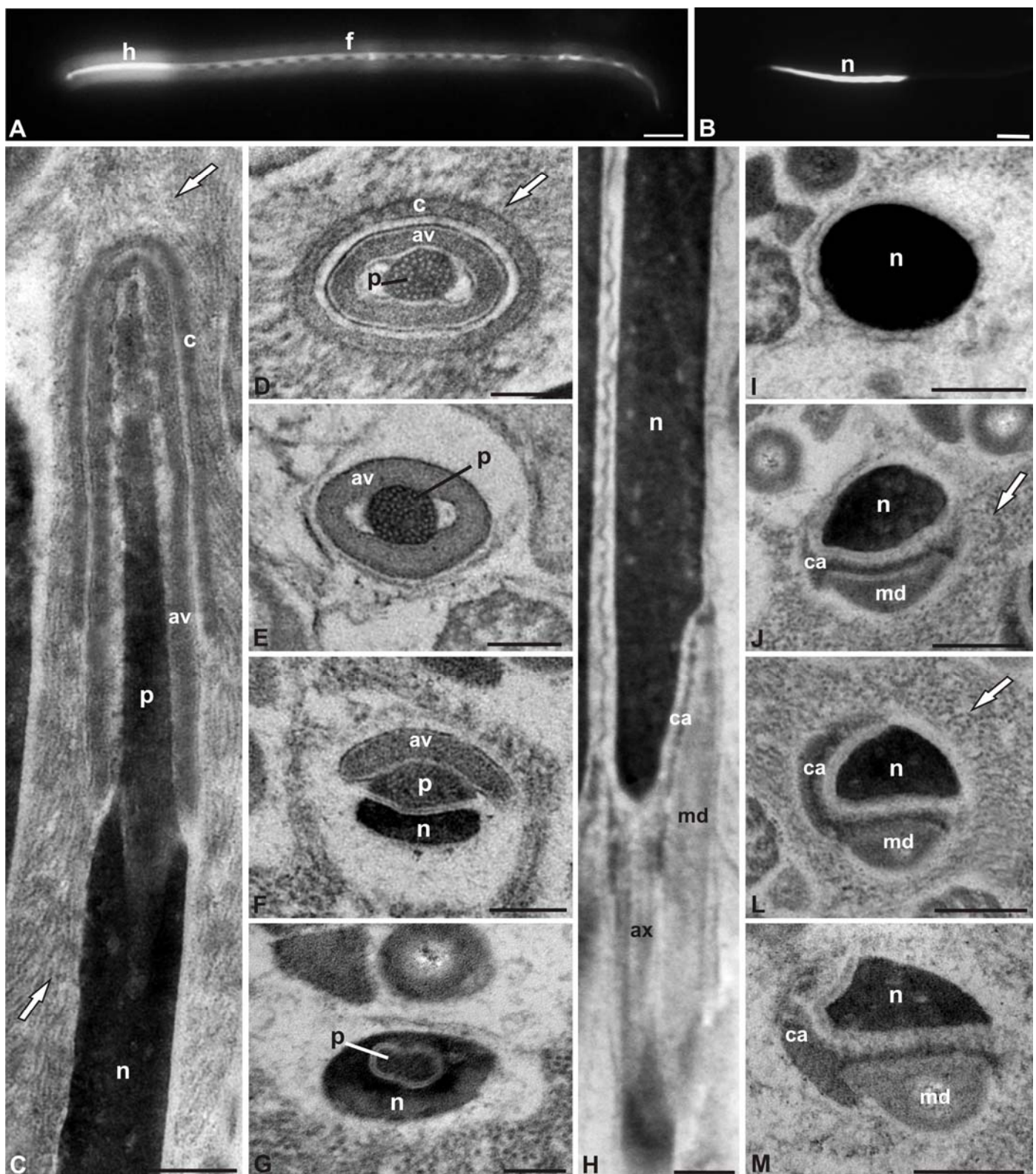


Figura 1

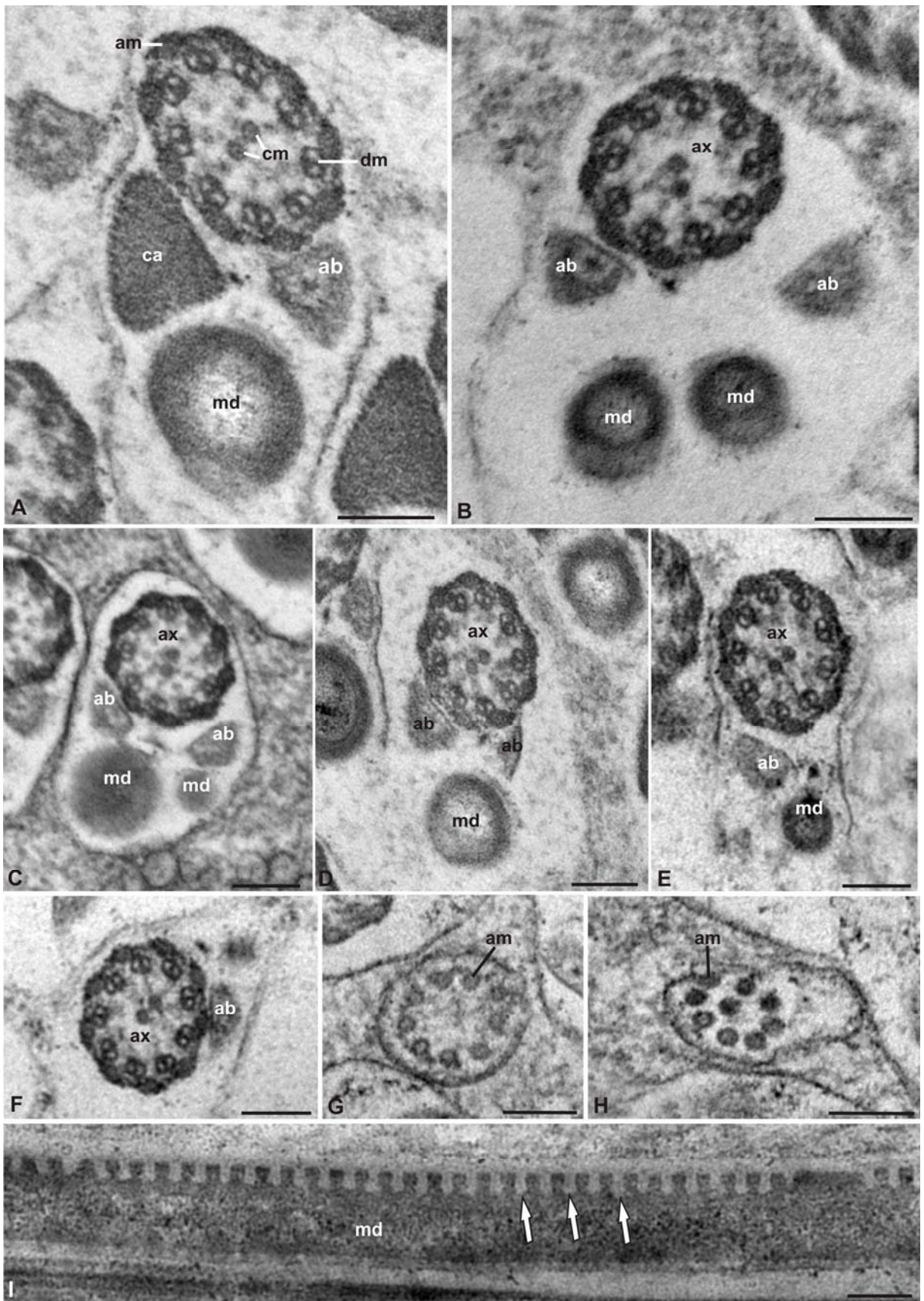
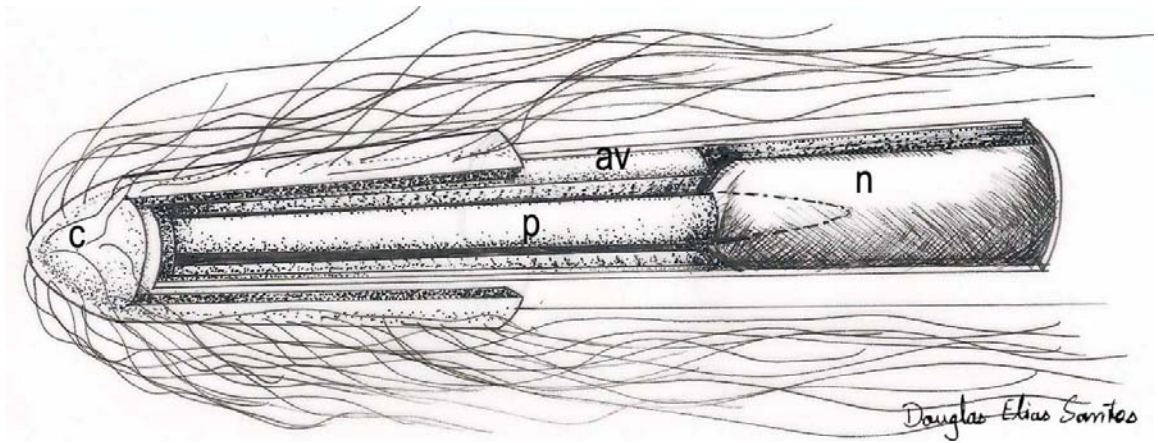
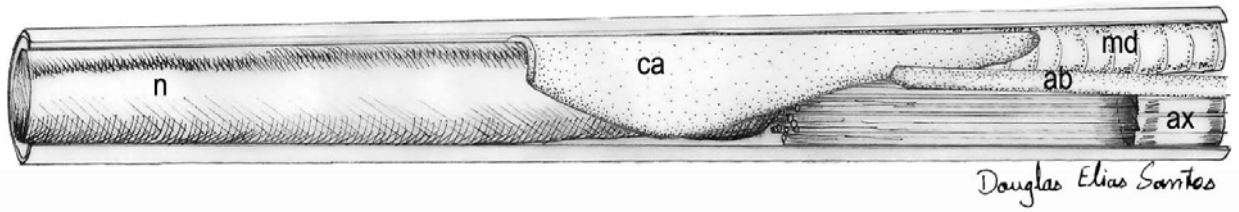


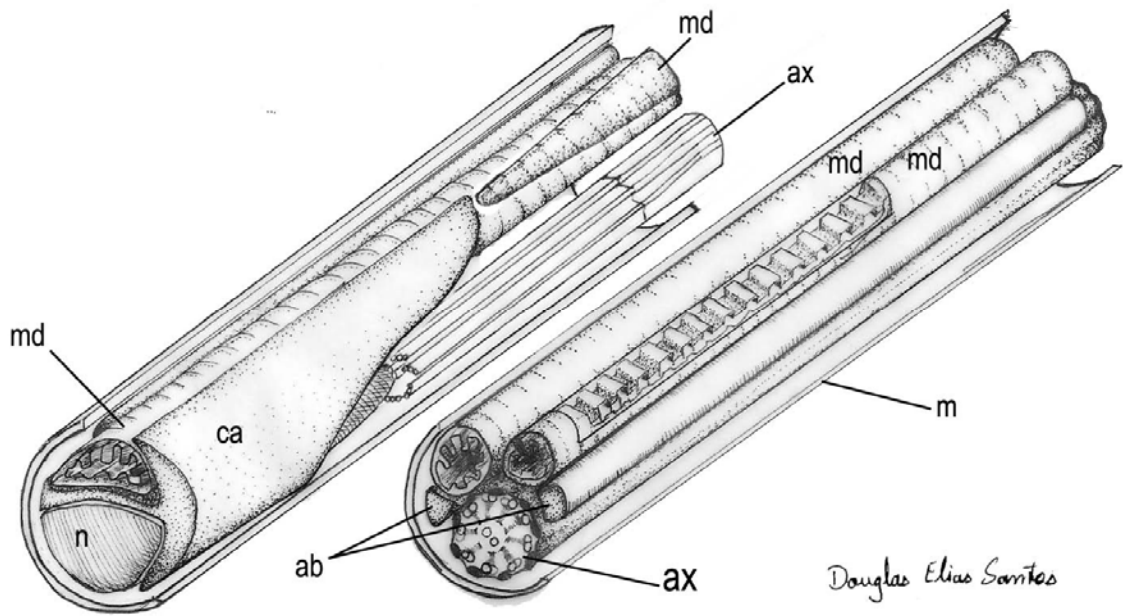
Figura 2



A



B



C

D

Figura 3

#### 4. Discussão

Na família Bethylidae a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides é conhecida somente em duas espécies da subfamília Epyrinae (Oliveira et al., 2010a, 2010b) e uma da subfamília Pristocerinae (Oliveira et al., 2009). A morfologia do espermatozoide de *Apenesia* sp. (Pristocerinae), objeto deste estudo, apresenta diferenças dos espermatozoides dos demais Bethylidae estudados. Essas diferenças são observadas tanto em microscopia de luz quanto em microscopia eletrônica de transmissão, como o comprimento total e o aspecto morfológico dos espermatozoides, e podem contribuir para discriminação e classificação de espécies. O espermatozoide de *Apenesia* sp. mede 80  $\mu\text{m}$  de comprimento, sendo, portanto, o mais curto já observado em Bethylidae. Em *Prorops nasuta* o espermatozoide mede 665  $\mu\text{m}$  (Oliveira et al., 2010a), 130  $\mu\text{m}$  em *Dissomphalus connubialis* (Oliveira et al., 2009) e 220  $\mu\text{m}$  em *Cephalonomia stephanoderis* (dados não publicados). Em todas as espécies de Bethylidae estudadas, incluindo *Apenesia* sp., os espermatozoides são lineares, como na maioria dos Hymenoptera, não apresentando estruturas espiraladas como observados nas vespas parasíticas (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Doder 2001a,b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009). Entretanto, nesta espécie, em microscopia de luz, são observadas aparentes ondulações com intervalos constantes ao longo de todo o flagelo. Já em *P. nasuta* o espermatozoide é linear, mas com uma longa porção delgada (Oliveira et al., 2010a).

O espermatozoide de *Apenesia* sp. tem características ultraestruturais incomuns aos Aculeata. A mais notável é a presença de uma camada extracelular com vários filamentos cobrindo o acrossomo. Esta é uma característica presente na maioria das vespas parasíticas (Newman & Quicke, 1999; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010). Dos Aculeata estudados, somente a espécie *Neochrysis lecointei* que pertence a Chrysididae, considerada grupo irmão de Bethylidae, tem espermatozoide com estrutura extracelular sobre o acrossomo (Brito, 2008). Em *Apenesia* sp. a camada

extracelular cobre somente parte da vesícula acrossomal, enquanto que nas outras espécies de Hymenoptera que têm essa estrutura, ela cobre todo o acrossomo e parte do núcleo. Considerando a condição basal de Chrysoidea e, tendo em vista, que Chrysididae também possui esta característica e, ainda, que nos outros Bethylidae analisados nenhuma estrutura extracelular foi visualizada, é possível que esta seja uma característica plesiomórfica que provavelmente tenha permanecido nestas espécies.

Em *Apenesia* sp., assim como em *D. connubialis* e *C. stephanoderis* a vesícula acrossomal é oval em cortes transversais. Entretanto, nessas espécies, mas não naquela, o formato da vesícula acrossomal varia de oval a elipsoidal e piriforme, respectivamente, dependendo do local em que essa estrutura é seccionada (Oliveira et al 2009; dados não publicados). Já em *P. nasuta*, ela é sempre elipsoidal (Oliveira et al., 2010a).

Nos Bethylidae *Apenesia* sp., assim como *D. connubialis* (Oliveira et al., 2009) e *C. stephanoderis* (dados não publicados), o perforatorium é paracristalino, enquanto que em *P. nasuta* o perforatorium é não paracristalino (Oliveira et al., 2010a). Em todos os Bethylidae estudados o perforatorium é inserido numa cavidade no ápice do núcleo e o núcleo é oval em cortes transversais (Oliveira et al., 2009, 2010a). Com exceção de *P. nasuta*, que apresenta cromatina frouxa na periferia do núcleo (Oliveira et al., 2010a), os demais Bethylidae tem núcleo com cromatina compacta e homogênea (Oliveira et al., 2009, dados não publicados).

O adjunto do centríolo é uma estrutura amplamente conservada nos espermatozoides de Hymenoptera e tem a função de conectar a cabeça com o flagelo (Jamieson, et al., 1999). Nos vários estudos realizados com os espermatozoides de diferentes grupos de Hymenoptera, é claramente perceptível a diversidade ultraestrutural do adjunto do centríolo tanto em forma, tamanho, densidade e localização. Por esta razão, em alguns trabalhos essa estrutura foi equivocadamente interpretada e descrita como um dos derivados mitocondriais (Quicke et al., 1992) ou o núcleo (Chauvin et al., 1988). Em *Apenesia* sp., Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009) e em *D. connubialis* (Bethylidae: Pristocerinae) (Oliveira et al., 2009) o adjunto do centríolo tem sua projeção anterior localizada paralelamente entre as extremidades posterior do núcleo e a anterior de um dos derivados mitocondriais. Em *Apis mellifera* (Lino-

Neto & Dolder, 2000b), Meliponini (Zama et al., 2001, 2004), Euglossini (Zama et al., 2005a), Sphecidae (Zama et al., 2005b) e Halictidae (Fiorillo et al., 2005) estrutura semelhante foi descrita como estrutura lamelar ou material eletrondenso. Análise mais acurada das imagens da região de transição núcleo-flagelo desses trabalhos nos permite admitir que essa estrutura é o adjunto do centríolo. Em *P. nasuta* e *C. stephanoderis* (Bethylidae: Epyrinae) (Oliveira et al., 2009, 2010b) o adjunto do centríolo inicia acima da base núcleo, mas não foi visto, entre este, e um dos derivados mitocondriais. Em *Apenesia* sp. bem como em *D. connubialis* o adjunto do centríolo, em cortes transversais, é triangular e bastante proeminente, enquanto nas espécies de Epyrinae ele é oval. Estas são variações importantes entre as duas subfamílias, o que indica estreita relação filogenética entre os gêneros pertencentes a cada subfamília.

A projeção de um dos derivados mitocondriais acima da base do núcleo é uma característica compartilhada entre vários Hymenoptera. Entretanto, a extensão dessa projeção é variável entre os diferentes grupos e, em Bethylidae, entre as diferentes espécies analisadas. Em *Apenesia* sp., assim como em *P. nasuta* (Oliveira et al., 2010a), Apidae (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al. 2004, 2005b; Fiorillo et al., 2005, 2009), Vespidae (Mancini et al. 2006, 2009) e Sphecidae (Zama et al., 2005b), somente uma curta projeção de um dos derivados avança lateralmente a base do núcleo, enquanto que em *D. connubialis* (Oliveira et al., 2009), *Psilus fuscipennis* (Diapridae) (Quicke et al., 1992), *Trissolcus basalis* e *Telenomus podisi* (Scelionidae) (Lino-Neto et al., 2001a), um dos derivados se estende paralelamente ao núcleo por um comprimento bastante considerável e, nesta última família, somente um derivado mitocondrial foi observado. Em *C. stephanoderis* (Oliveira et al., 2010b), não foi visualizada projeção de um dos derivados acima da base do núcleo. Nas formigas (Lino-Neto e Dolder, 2002; Moya et al., 2007) e em Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000a, Lino-Neto e Dolder, 2001b, Fiorillo et al., 2008), os dois derivados mitocondriais iniciam juntos, imediatamente abaixo do adjunto do centríolo.

A simetria dos derivados mitocondriais em forma e diâmetro em corte transversal é a característica mais evidente compartilhada entre todos os Bethylidae até agora estudados (Oliveira et al., 2009, 2010a, 2010b). Entretanto, variações podem ser observadas nessas organelas, principalmente,

no que diz respeito aos seus componentes (cristas e material paracristalino) e ao formato em corte transversal, nas diferentes subfamílias analisadas. Na subfamília *Pristocerinae*, incluindo *Apenesia sp.*, bem como *D. connubialis* (Oliveira et al., 2009), os derivados mitocondriais são circulares, possuem cristas discretas e aparentemente não apresentam material paracristalino. Estas são características que já foram descritas para algumas vespas Parasíticas (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b). Entretanto nestas espécies, o formato dos derivados varia de oval a circular. Já na subfamília *Epyrinae*, representada por *P. nasuta* (Oliveira et al., 2010a) e *C. stephanoderis* (Oliveira et al., 2010b), os derivados mitocondriais exibem formato oval e semicircular, respectivamente, com cristas profundas, bem desenvolvidas e abundância de material paracristalino em ambos os derivados. Porém, em *P. nasuta*, o material paracristalino ocupa as faces adjacentes dos derivados e as regiões proximais e distais em relação ao axonema, em uma organização semelhante a uma meia-lua. Já em *D. connubialis*, diferente de *P. nasuta*, o material paracristalino é localizado nas regiões proximais e distais em relação ao axonema.

Outra característica que distingue as duas subfamílias é a finalização dos derivados mitocondriais na porção terminal do flagelo. Nas espécies de *Pristocerinae*, os derivados mitocondriais terminam um após o outro, semelhante à maioria dos Hymenoptera estudados: *Apidae* (Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Lino-Neto et al., 2000b; Báó et al., 2004; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al., 2009), *Sphecidae* (Zama et al., 2005b), *Vespidae* (Mancini et al., 2006, 2009), *Formicidae* (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto e Dolder, 2002; Moya et al., 2007), vespas Parasíticas (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b, Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010) e ‘symphyta’ (Lino-Neto et al., 2008). Em quase todos estes Hymenoptera o derivado maior finaliza sempre após o menor, exceção são os *Vespidae* *Vespa cabro* (Mancini et al., 2009) e *Agelaia vicina* (Mancini et al., 2006) e os *Eulophidae* *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica* (Parasítica) (Brito et al., 2009), nos quais o derivado maior finaliza antes do menor. Diferentemente de todos os Hymenoptera, nas espécies de *Epyrinae*, os derivados mitocondriais finalizam juntos na porção terminal do flagelo (Oliveira et al., 2010a, 2010b).

Em *Apenesia* sp. os nove microtúbulos acessórios são os últimos elementos a se desorganizarem na porção final do flagelo, como é comum em Aculeata (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al. 2005; Araújo et al., 2005, Moya, et al. 2007; Fiorilo et al., 2009; Mancini et al., 2006, 2009), diferindo apenas de *D. connubialis* onde esses microtúbulos são os primeiros a finalizarem (Oliveira et al., 2009). Esse fato chama atenção, pois *Apenesia* sp. e *D. connubialis* são classificados na mesma subfamília, *Pristocerinae*. Isso mostra que, mesmo entre grupos muito próximos, a morfologia dos espermatozoides de Hymenoptera é bastante diversificada e, certamente, muito importante para estudos taxonômicos e filogenéticas.

Por fim, a diferença mais marcante entre a espécie analisada neste estudo e os demais Bethylidae analisados é a presença de uma camada extracelular associada ao ápice da cabeça do espermatozoide. Por outro lado, a morfologia do adjunto do centríolo e das estruturas flagelares são muito semelhantes aquelas observadas no flagelo de *D. connubialis*, como: derivados mitocondriais iguais em diâmetro e diferentes em comprimento, cristas mitocondriais discretas, ausência de material paracristalino em ambos os derivados, derivados mitocondriais com formato circular em corte transversal, corpos acessórios proeminentes e de formato triangular em corte transversal. Estas características podem estabelecer apomorfias para a subfamília *Pristocerinae*. Outros estudos morfológicos dos espermatozoides de mais espécies de Bethylidae podem revelar novas diferenças e sinapomorfias que poderão ser utilizadas em análises filogenéticas do grupo, para contribuir com a sistemática de Hymenoptera.

## 5. Referências Bibliográficas

- Araújo, VA; Zama, U; Dolder, H; Lino-Neto, J (2005). Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22: 137-141.
- Argaman, Q (1988). A new subfamily of Bethylidae allied to Pristocerinae (Hymenoptera). Boll. Soc. Entomol. Ital. 120: 139 -152.
- Baccetti, B (1970). The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: Baccetti, B. Comparative spermatology. New York, Academic Press, pp. 169-182.
- Báo, SN; Simões, DG & Lino-Neto, J (2004). Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). J. Submicr. Cytol. Pathol. 36: 23-28.
- Berland, L (1928). Bethylidae. In: Berland, L. (Ed.) Fauna de France 19 – Hyménoptères vespiformes II .Office Central de Faunistique , Paris , pp 96 -137.
- Brito, PVA (2008). Morfologia dos Espermatozoides de *Melittobia hawaiiensis*, Perkins, *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae) e *Neochrysis lecointei*, Ducke (Chrysoidea: Chrysididae), com considerações filogenéticas em Apocrita (Hymenoptera). Tese de doutorado. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 64p.
- Brito, P; Lino-Neto, J; Dolder, H (2009). Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). Tissue Cell 41: 113-117.
- Brothers, DJ & Carpenter, JM (1993). Phylogeny of Aculeata: Chrysoidea and Vespoidea (Hymenoptera). J. Hym. Res. 2: 227:302.
- Carpenter, JM (1999). What do we know about chrysidoid (Hymenoptera) relationships? Zool Scr. 28: 215-231.
- Carr, M; Young, JPW & Mayhew, PJ (2010). Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. Insect Syst. Evol. 41: 55-73.
- Chauvin, G; El Agoze, M; Hamon, C & Huignard, J (1988) Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 17: 359-366.

- Corrêa, MS & Azevedo, CO (2006). O gênero *Apenesia* (Hymenoptera, Bethyilidae) na Mata Atlântica: notas e descrição de sete espécies novas. Rvt. Brasileira de Entomologia 50: 439-449.
- Dallai, R (1974). Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta apterygota. Pedobiol. 14: 148-156.
- Evans, HE (1964). A synopsis of the American Bethyilidae (Hymenoptera: Aculeata). Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard University) 132: 1-222.
- Finnamore, AT & Gauld, ID (1995). Bethyilidae. In: Hansom, P.E., Gauld, I.D. (Eds.), Hymenoptera da Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, pp. 470-479.
- Fiorillo, BS; Coelho, AM; Lino-Neto, J; Bão SN (2005). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicr. Cytol. Pathol. 37: 75-81.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto, J; Bão, SN (2008). Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). Micron 39: 1271-1280.
- Fiorillo, BS; Zama, U; Lino-Neto, J; Bão, SN (2009). Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). Acta Zool. 89: 1463-1470.
- Gauld, ID & Hanson, PE (1995). The structure of Hymenoptera. Larval morphology, p.102-137. In P.E. Hanson, & I.D. Gauld (eds), The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford, Oxford University Press. 893p.
- Gordh, G & Móczár, L (1990). A catalog of the world Bethyilidae (Hymenoptera: Aculeata). Mem. Am. Entomol. 46: 1-364.
- Goulet, H & Hubner, JT (1993). Hymenoptera of the world: An identification guide to families. Research Branch, Agriculture Canada. Centre for Land and Biological Resources Research, Ottawa.
- Gracielle, IMS, Fiorillo, BS, Lino-Neto, J, Bão, SN (2009). Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). Micron.40: 419-425.
- Hanson, PE & Gauld, ID (1995). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, Oxford, UK, xx + 893 pp.
- Jamieson, BGM (1987). The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press. 89-101 pp.
- Jamieson, BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999). Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.

- Lanes, GO & Azevedo, CO (2008). Phylogeny and taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylinidae, Epyrinae). *Insect Systemat. Evol.* 39: 55-85.
- LaSalle, J & Gauld, ID (1992). Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. *In: LaSalle J & Gauld ID. Hymenoptera and Biodiversity.* CAB International, UK. pp 1-26.
- Lino-Neto, J; Bao, SN; Dolder, H (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 253-259.
- Lino-Neto, J; Bao SN; Dolder, H (2000a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool (Stockholm)*, 81: 205-211.
- Lino-Neto, J; Bao, SN; Dolder, H (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool Scr.* 30: 89-96.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool. (Stockholm)*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2002). Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34: 124-128.
- Lino-Neto, J; Dolder, H; Mancini, K; Mercati, D; Dallai, R (2008). The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185-193.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H (2006). Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Insect. Soc.* 53: 333-338.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H; Dallai, R (2009). Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38: 54-59.
- Moreira, J; Araujo, VA; Bao, SN; Lino-Neto, J (2010). Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron* 41: 187-192.

- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Delabie, J; Dolder, H (2007). Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.* 88: 181-187.
- Mugrabi, DF & Azevedo, CO (2010). Insecta, Hymenoptera, Bethylidae: Range extension and filling gaps in Madagascar. *Check List.* 6:062-063.
- Newman, TM & Quicke DLJ (1999). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.* 8: 197-203.
- Oliveira, CM; Fraga, FB; Brito, P; Gomes, LF; Lino-Neto, J (2009). Ultrastructural characteristics of *Dissomphalus connubialis* sperm (ashmead, 1893) (Hymenoptera: Bethylidae). XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica e Microanálise
- Oliveira, CM; Mancini, K; Dolder H; Lino-Neto J (2010a). Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethylidae). *Tissue Cell* 42: 242-246.
- Oliveira, CM; Fraga, FB; Rocha, FAD; Mancini, K; Lino-Neto, J. (2010b) Sperm Flagellum Morphology of *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethylidae). 17th International congress of Microscopy.
- Nagy, CG (1974). A new Bethylid subfamily allied to Protopristocerinae. *Boll. Soc. Entomol. Ital.* 106: 126-130.
- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS; Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21: 381-402.
- Terayama, M (2003). Phylogenetic systematics of the family Bethylidae (Insecta:Hymenoptera). Part I. Higher classification. Academic Reports. Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics, Tokyo Metropolitan University 26: 1-15.
- Wheeler, DE; Crichton, ED; Krutzsch, PH (1990). Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae:Hymenoptera). *J. Morphol.* 206: 343-350.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2001). Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10: 261-270.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2004). Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36: 29-41.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H (2005a). Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.* 52: 122-131.

Zama, U; Brito, P; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H; Báo, SN (2005b).  
The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom  
(Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. J.  
Submicrosc. Cytol. Pathol. 37: 313-321.

#### 4- Conclusões Gerais

- ✓ A descrição morfológica dos espermatozoides de *Dissomphalus connubialis* forneceu caracteres que podem inferir na sistemática de Hymenoptera: (1) medidas morfométricas podem auxiliar estudos taxonômicos. O comprimento e a morfologia dos espermatozoides de *D. connubialis* diferem marcadamente dos espermatozoides do também Bethylidae *Prorops nasuta* (2) a projeção de um dos derivados acima da base do núcleo, derivados mitocondriais com raras cristas e aparente ausência de material paracristalino e, ainda, os microtúbulos acessórios sendo os últimos a desorganizarem na finalização do flagelo, diferem esta espécie de todos os Aculeata. Estes caracteres permitem inferências em nível de subfamília, família ou táxons inferiores.
- ✓ *Cephalonomia stephanoderis* compartilha vários caracteres com *Prorops nasuta*, principalmente no que diz respeito às estruturas flagelares, o que reforça a estreita relação entre essas espécies pertencentes à mesma subfamília. Estas semelhanças permitem estabelecer um padrão para caracterizar os espermatozoides da Subfamília Epyrinae. O material intermitoncondrial observado nos espermatozoides de *Cephalonomia stephanoderis* é uma característica até agora exclusiva desta espécie, o que pode indicar autapomorfia.
- ✓ A camada extracelular associada ao ápice dos espermatozoides, observada nos espermatozoides de *Apenesia* sp. difere enfaticamente esta espécie dos outros Bethylidae analisados, bem como dos Aculeata. A morfologia do flagelo de *Apenesia* sp. é semelhante ao de *Dissomphalus connubialis*, indicando o aspecto morfológico típico do flagelo nestas espécies pertencentes a subfamília Pristocerinae.
- ✓ Derivados mitocondriais iguais em forma e diâmetro parece ser sinapomorfia para Bethylidae, visto que todas as espécies analisadas demonstraram esta característica.

- ✓ Em Bethylidae, a observação de que os microtúbulos acessórios são os primeiros a finalizarem na porção final do flagelo em *Dissomphalus connubialis* e a existência da camada extracelular envolvendo a porção anterior dos espermatozoides em *Apenesia* sp. são características comuns as vespas Parasíticas, sugerindo estreita relação filogenética da família Bethylidae com este grupo.
  
- ✓ A análise dos espermatozoides das três espécies de Bethylidae mostrou grande variação morfológica. Estes caracteres poderão ser utilizados para futuras análises filogenéticas em Hymenoptera (ver tabelas 1 e 2).

Subfamília	Gênero/Espécie	Comprimento total do espermatozoide	Comprimento nuclear	Camada extracelular	Vesícula acrossomal	Perforatorium	Cromatina	Adjunto do centríolo	Referências
Epyrinae	<i>Prorops nasuta</i>	665 µm	17 µm	Ausente	Elipsoidal	Sem organização paracristalina	Compacta com a periferia nuclear basal frouxa	Inicia adjacente à base do núcleo	Oliveira et al., 2010a
Epyrinae	<i>Cephalonomia stephanoderis</i>	220 µm	9 µm	Ausente	Piriforme à oval	Paracristalino	Homogênea e compacta	Inicia adjacente à base do núcleo	Oliveira et al. 2010b
Pristocerinae	<i>Dissomphalus connubialis</i>	130 µm	15 µm	Ausente	Oval a elipsoidal	Paracristalino	Homogênea e compacta	Inicia entre a projeção de um dos derivados mitocondriais e acima da base do núcleo	Oliveira et al., 2009
Pristocerinae	<i>Apenesia sp.</i>	80 µm	13 µm	Presente	Oval	Paracristalino	Homogênea e compacta	Inicia entre a projeção de um dos derivados mitocondriais e acima da base do núcleo	Manuscrito 3

**Tabela 1.** Comparação da morfometria nuclear e total e das estruturas da região de cabeça dos espermatozoides das diferentes espécies de Bethylidae.

Subfamília	Gênero/Espécie	Formato do adjunto do centríolo	Derivados mitocondriais	Formato dos derivados mitocondriais	Cristas mitocondriais	Organização Paracristalina nos derivados mitocondriais	Tamanho dos Corpos acessórios	Finalização do flagelo	Referências
Epyrinae	<i>Prorops nasuta</i>	Oval com periferia pregueada	Inicia na extremidade posterior do núcleo e finalizam juntos	Ovais	Abundantes, grandes e profundas	Presente em ambos os derivados, nas porções adjacentes aos derivados	Médios	Os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem	Oliveira et al., 2010a
Epyrinae	<i>Cephalonomia stephanoderis</i>	Oval com periferia pregueada	Não foi visto associado à base do núcleo e finalizam juntos	Semicirculares	Abundantes, grandes e profundas	Presente em ambos os derivados, nas regiões proximais e distais ao axinema	Pequenos	Os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem	Oliveira et al., 2010b
Pristocerinae	<i>Dissomphalus connubialis</i>	Triangular com periferia pregueada	Inicia bem além base do núcleo e finalizam em alturas diferentes	Circulares	Raras e curtas	Ausência de paracristalino	Grandes	Os microtúbulos acessórios são os primeiros a finalizarem	Oliveira et al. 2009
Pristocerinae	<i>Apenesia sp.</i>	Triangular com periferia pregueada	Inicia acima da base do núcleo e finalizam em alturas diferentes	Circulares	Abundantes e curtas	Ausência de paracristalino	Grandes	Os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem	Manuscrito 3

**Tabela 2.** Comparação das estruturas da região de transição e flagelo dos espermatozoides das diferentes espécies de Bethyidae.