

VINÍCIUS ALBANO ARAÚJO

**MORFOFISIOLOGIA DOS DUCTOS DEFERENTES DURANTE A MATURAÇÃO  
SEXUAL E ASPECTOS DA ESPERMIOGÊNESE EM *Scaptotrigona xanthotricha*  
Moure 1950 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Entomologia, para obtenção do  
título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005**

VINÍCIUS ALBANO ARAÚJO

**MORFOFISIOLOGIA DOS DUCTOS DEFERENTES DURANTE A MATURAÇÃO  
SEXUAL E ASPECTOS DA ESPERMIOGÊNESE EM *Scaptotrigona xanthotricha*  
Moure 1950 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Entomologia, para obtenção do  
título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 01 de julho de 2005

---

Dr. Clóvis Andrade Neves  
(Conselheiro)

---

Dr. Lúcio A. O. Campos  
(Conselheiro)

---

Dr. José Eduardo Serrão

---

Dra. Uyrá Zama

---

José Lino Neto  
(Orientador)

“O essencial é saber ver. Saber ver sem  
estar a pensar. Saber ver quando se vê, E  
nem pensar quando se pensa! Mas isso  
(tristes de nós que trazemos a alma  
vestida!) Isso exige um estudo profundo,  
Uma aprendizagem de desaprender.”  
(Fernando Pessoa)

## Dedicatória

À minha querida irmã,  
Ana Paula Albano Araújo.

## **Agradecimentos**

Ao ensino público e de qualidade, sem o qual dificilmente teria acesso a um curso de pós-graduação. Ao CNPq pelo suporte financeiro ao longo dos últimos anos.

A minha amada mãe pelo seu amor, fonte de força, simplicidade e otimismo que regem minha vida. Meu pai pelo exemplo de honestidade e respeito. À minhas irmãs, Ana Paula, Patrícia e Luciane, pelo elo de cumplicidade e fraternidade que nos une. Ana Paula, em especial, pela companhia diária, pelo exemplo profissional e por tudo que me ensinou, sem você teria sido infinitamente mais difícil! A Leandro Bacci pela amizade e companheirismo. À minha linda Vó Zizinha e demais parentes pelo apoio e carinho.

Aos amigos de Ouro Preto (UFOP) que me acompanham até hoje e que tanta energia positiva me transmitem, em especial à Madu e Sabrina. À minha orientadora durante a graduação, Yasmine Antonini, por ter proporcionado meu ingresso no curso de mestrado.

Ao professor José Lino Neto pela orientação, pelos grandes ensinamentos e exemplo de ética profissional. Sou muito grato por ter aceitado o desafio de me orientar e ter me iniciado no mundo da microscopia, um caminho verdadeiramente sem volta!

Aos meus conselheiros Clóvis Andrade Neves e Lúcio Campos pela sabedoria, simplicidade e por terem participado efetivamente da minha formação. À Dra Uyrá Zama, pela simpatia, competência e por tudo o que me ensinou, mesmo à distância. Sua disponibilidade e eficiência muito contribuíram para o meu trabalho e aprendizado.

Ao laboratório de Biologia Estrutural: aos professores Sérgio, Isabel e Adilson, aos amigos Jane, Polyana, Pedro, Lílian e ao irmão Marcos de Lucca, por terem conseguido conviver comigo nestes dois anos, pela contribuição em meu trabalho e pelos inesquecíveis momentos de amizade. Ao Sr. Alex pelo companheirismo diário e disponibilidade em sempre me ajudar. Aos funcionários do Apiário, Íris e Geraldo por serem sempre tão prestativos.

À professora Silvia Pompolo pela prestatividade em ceder seu laboratório e materiais.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Entomologia, pelo empenho em manter e aprimorar a qualidade do mesmo. À D. Paula por ser tão eficiente e amável. Ao Departamento de Biologia Geral pelo apoio logístico, em especial a Diana.

A todos os meus contemporâneos da Entomologia, em especial: Lucimar, Simone Freitas, Marcy, Claudinei, Cláudia, Romerinho, Ézio, Carina, Leandro, Marcão, Nelza e Ethel, que fizeram estes dois anos ainda mais importantes e inesquecíveis!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. Jamais esquecerei estes anos em Viçosa, não somente pelo título alcançado, mas principalmente pelas pessoas, estas sim, quando dignas e íntegras, valem a pena e ficam para sempre!!!

## **Biografia**

Vinícius Albano Araújo, filho de José Antônio Lage Araújo e Maria José Araújo, nasceu em Itabira, Minas Gerais, em 29 de janeiro de 1981.

Em agosto de 2003, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto-MG. Durante o período de graduação, de 1999 a 2003, foi estagiário do Laboratório de Padrões de Diversidade Animal do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

Em agosto de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a tese em julho de 2005. Neste mesmo mês foi aprovado no curso de Doutorado em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa.

## Conteúdo

<b>Resumo.....</b>	viii
<b>Abstract.....</b>	ix
<b>1. Introdução geral.....</b>	01
1.1. Importância Econômica e Ecológica.....	02
1.2. Sistema Reprodutor Masculino.....	02
1.3. A Espermatogênese em Abelhas.....	04
1.4. Objetivos.....	05
<b>2. Referências bibliográficas.....</b>	06
<b>3. Artigos</b>	
3.1. Destino das espermátides atípicas durante a espermatogênese de <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) .....	10
3.2. Modificações estruturais e ultra-estruturais dos ductos deferentes de <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante o processo de maturação.....	22
3.3. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	39
<b>4. Conclusão Geral.....</b>	54

## Resumo

ARAÚJO, Vinícius Albano, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.  
**Morfofisiologia dos ductos deferentes durante a maturação sexual e aspectos da espermiogênese em machos de *Scaptotrigona xanthotricha* Moure 1950 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** Orientador: José Lino Neto.  
Conselheiros: Clóvis Andrade Neves e Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

Poucos estudos enfatizam os sistemas reprodutores em insetos. Isto resulta em uma carência de informações que possibilitariam estabelecer padrões e relações entre os grupos. Os caracteres morfológicos do sistema reprodutor interno em machos se mostram promissores para estudos taxonômicos e filogenéticos. Além disso, apesar dos Meliponini serem bastante estudados, algumas questões, como as conseqüências da ausência das glândulas acessórias no trato reprodutivo masculino, precisam ser esclarecidas. Nesta tese, descrevemos aspectos estruturais e ultra-estruturais do epitélio dos ductos deferentes de *Scaptotrigona xanthotricha* a fim de identificarmos as principais modificações morfofisiológicas ocorridas nestes ductos durante o processo de maturação sexual dos machos. Para isto, utilizamos técnicas de microscopia de luz e microscopia de eletrônica de transmissão. Os resultados contribuíram para discussão de importantes questões sobre a biologia reprodutiva dos Meliponini, como a formação das espermátides atípicas e a compensação fisiológica da ausência das glândulas acessórias.

## Abstract

ARAÚJO, Vinícius Albano, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005.  
**Morphophysiology of the deferents ducts during sexual maturation and aspects of the spermiogenesis in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure 1950 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** Adviser: José Lino Neto. Committee members: Clóvis Andrade Neves and Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

Few studies emphasize the reproductive systems in insects. This results in an carência of information that could make possible the establishment of patterns and relationships between groups. The morphological characters of the internal reproductive systems in males are promising to taxonomic and phylogenetic studies. Besides, although the Meliponini be a lot studied, some questions stay without answer as the absence of accessory glands in the male reproductive system. In this work we described the structural and ultrastructural features of the epithelium of the deferents ducts of *Scaptotrigona xanthotricha* in order to understand the main morphological modifications of the deferent ducts during the process of sexual maturation. For this we used techniques of light and electron transmission microscopy. The results contributed to the discussion of important questions about the reproductive biology of Meliponini, like the formation of atypical spermatides and the compensação fisiológica da ausência das glândulas acessórias.

## 1. Introdução Geral

A ordem Hymenoptera possui mais de 115.000 espécies descritas, constituindo uma das quatro maiores ordens de insetos. É dividida nas subordens Symphyta e Apocrita (LaSalle & Gauld, 1992), sendo a primeira considerada a mais basal. Os Apocrita compreendem a grande maioria das espécies e se dividem em Aculeata e Parasitica. Recentemente Mello (1999) incluiu, além das abelhas, quatro grandes grupos de vespas como pertencentes aos Apoidea: Heterogynaidae, Ampulicidae, Sphecidae s. str. e Crabronidae. Sendo esta última família considerada grupo-irmão das abelhas. A família Apidae se divide em três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. Esta última compreende 19 tribos, sendo que quatro destas tribos (Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini) são representadas pelas abelhas que possuem corbícula, um alargamento na superfície externa da tíbia posterior das operárias (Michener, 2000).

Dentre as abelhas corbiculadas, a tribo Meliponini constitui o grupo mais diverso com 27 gêneros (Silveira *et al.*, 2002) e centenas de espécies. O número exato de espécies permanece indefinido devido, principalmente, ao grande número de espécies crípticas (Michener, 2000).

As abelhas Meliponini do gênero *Scaptotrigona* apresentam grande diversidade de formas e possuem ampla distribuição na região Neotropical. No Brasil existem 8 espécies descritas, havendo ainda um grande número de espécies não descritas em todas as regiões brasileiras (Silveira *et al.*, 2002). A espécie *Scaptotrigona xanthotricha* tem ocorrência registrada na região sudeste e no estado da Bahia, estando ameaçada de extinção no estado de São Paulo (Mendonça & Lins, 2002).

Apesar das importantes contribuições fornecidas pelos dados morfológicos, comportamentais e moleculares (Alexander, 1991, 1992; Brothers, 1999; Carpenter & Wheller, 1999; Downton & Austin, 1994, 1999; Melo, 1999; Ronquist, 1999; Noll, 2002), ainda existem controvérsias sobre as relações filogenéticas nos Hymenoptera. A subfamília Apinae é considerada um grupo bastante derivado dentro dos Apoidea (Melo, 1999), sendo a tribo Meliponini posicionada como a mais derivada dentro desta subfamília. As relações entre as quatro tribos corbiculadas ainda não foram totalmente esclarecidas (Michener, 1990; Winston & Michener, 1977; Kimsey, 1984; Plant & Paulus, 1987; Sheppard & MacPheron, 1991; Cameron, 1991, 1993; Prentice, 1991; Roig-Alsina & Michener, 1993; Chavarria & Carpenter, 1994; Mardulyn & Cameron, 1999; Koulianos *et al.*, 1999; Cameron & Mardulyn, 2001; Silveira *et al.*, 2002; Noll, 2002). Acredita-se que muitas questões filogenéticas poderão ser resolvidas com análise conjunta de dados moleculares e morfológicos. É importante a inclusão de

novos caracteres como, por exemplo, aqueles do sistema reprodutor interno e dos espermatozoides, os quais possuem natureza mais conservativa por serem menos susceptíveis às condições ambientais.

### **1.1. Importância Econômica e Ecológica dos Meliponini**

A tribo Meliponini possui centenas de espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais do mundo e subtropicais do hemisfério sul (Michener, 2000; Silveira *et al.*, 2002). A maioria das espécies nidifica em cavidades pré-existentes, como ocos de árvores, ninhos abandonados de cupins e formigas, frestas no solo e rochas, entretanto, existem meliponídeos que constroem seus ninhos expostos (Silveira *et al.*, 2002).

Atualmente existe um grande interesse econômico focado, principalmente, no uso de diversas espécies de Meliponini para a prática da meliponicultura. Além disso, estas abelhas muitas vezes são polinizadoras específicas de muitas fanerógamas tropicais (Bawa *et al.*, 1985), sendo consideradas de extrema importância para a manutenção de espécies vegetais nativas (Neff & Simpson, 1993). Diversos estudos têm sido feitos buscando estabelecer relações entre a polinização realizada pelos meliponídeos e a melhoria na produtividade das culturas agrícolas (Michelbacher *et al.*, 1971; Wille, 1976; Wille *et al.*, 1983; O'Toole, 1993).

Várias espécies de Meliponini estão sob risco de extinção ou rápida redução de suas populações naturais (Mendonça & Lins, 2002), sendo apontadas como as principais causas: 1) a introdução e expansão da espécie *Apis mellifera*, a qual compete com grande eficiência por alimento com as espécies nativas (Roubik, 1978, 1980, 1982); 2) redução de habitats naturais, principalmente pela ação do desmatamento desordenado, levando a perda de locais de nidificação e de fontes de alimento (Silveira *et al.*, 2002); e a 3) ação de melieiros que na busca de mel silvestre destroem as colônias de Meliponini, especialmente de espécies que armazenam maior quantidade de mel em seus ninhos.

### **1.2. O Sistema Reprodutor Masculino**

Devido a grande variedade de histórias de vida e padrões ecológicos, os insetos apresentam grande diversidade nos comportamentos de cópula, regulação endócrina, produção de feromônios e nas estruturas anatômicas associadas à reprodução (Borror *et al.*, 1992; Chapman, 1998). Com isso, variações interespecíficas nos sistemas reprodutores podem ocorrer no tamanho ou número das estruturas, na ausência de

alguma delas ou na posição das mesmas ao longo do trato reprodutivo (Adiyodi & Adiyodi, 1975; Grassé, 1982; Chapman, 1998).

Nos insetos o sistema reprodutor dos machos, em geral, é formado por um par de testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e ducto ejaculatório (Chapman, 1998). Os testículos, como nos demais animais, são o local de produção dos espermatozóides. Cada testículo consiste de folículos, onde ocorre o processo espermatogênico. Nos insetos em geral o número de folículos varia entre um e quatro, mas em alguns casos por chegar a 200 por testículo, como na abelha *Apis mellifera*. O número de folículos testiculares constitui uma característica que pode, às vezes, separar famílias dentro da ordem Hymenoptera (Ferreira *et al.*, 2004). Os vasos deferentes ligam os testículos ao ducto ejaculatório. As vesículas seminais são, na grande maioria dos insetos, regiões dilatadas e modificadas dos vasos deferentes e consistem no local onde os espermatozóides ficam estocados antes de serem transferidos para as fêmeas. As glândulas acessórias tornam-se funcionais no princípio da vida adulta dos insetos e suas secreções estão associadas a diversas funções, como por exemplo: maturação e ativação dos espermatozóides, indução e aceleração da oviposição nas fêmeas e a formação do espermatóforo e do “plug” de cópula (Chen, 1984; Gillot, 1988; Raina *et al.*, 1994; Gillot, 2003). No entanto, as glândulas acessórias, presentes na grande maioria dos insetos, estão ausentes nos Meliponini (Kerr, 1948; Dallacqua & Cruz-Landim, 2003).

Estudos histológicos e histoquímicos dos ductos deferentes dos Meliponini podem evidenciar estruturas que possam eventualmente produzir secreções que tenham função semelhante à das glândulas acessórias. Em todas as espécies de insetos, as secreções produzidas pelas células epiteliais ao longo do sistema reprodutor são misturadas aos espermatozóides para formar o sêmem (Gillot, 1988).

### 1.3. A Espermatogênese em Abelhas

Nos insetos, a extremidade mais distal de cada folículo é o germário, local onde as células germinativas se dividem para formar espermatogônias. Estas células germinativas indiferenciadas, conhecidas como espermatogônias primárias sofrem várias mitoses dando origem a um grupo de espermatogônias secundárias. Este grupo de células é então encapsulado por uma célula somática, a célula cística. As células císticas secretam o envelope para a formação do cisto, os espermatocistos, dentro dos quais a espermatogênese ocorre (Báo & Dolder, 1991). Os cistos são formados por clones de células germinativas revestidas por uma camada de células epiteliais não germinativas (Baccetti & Bairati, 1964). As espermatogônias secundárias após duas divisões meióticas dão origem as espermatídes (Lindsley & Tokuyasu, 1980; Oguma & Kurokawa, 1984; Cruz-Landim, 2001). O número de espermatídes por cisto é característico para cada espécie e pode ser expresso como  $2^n$  onde “n” é usualmente igual a 5, 6, 7 ou 8.

Nos Hymenoptera os machos são originados de ovos não fertilizados, portanto, são haplóides e as fêmeas são diplóides, já que estas se originam de ovos fertilizados. Nestes insetos a primeira divisão meiótica é abortiva, não ocorrendo formação do fuso (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b) e nem a separação de material genético. Portanto, o número de cromossomos nos machos de Hymenoptera não muda durante a “meiose” (Kerr, 1969). A segunda divisão meiótica ocorre normalmente, gerando duas espermatídes haplóides com número igual de cromossomos (Cruz-Landim, 2001). Em abelhas, o conteúdo citoplasmático é distribuído de forma desigual entre as duas espermatídes. Uma delas recebe quase todo o citoplasma, ficando a outra apenas com o núcleo e uma quantidade muito reduzida de citoplasma, contendo somente alguns ribossomos (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b; Cruz-Landim *et al.* 1980).

Vários trabalhos têm descrito aspectos da espermatogênese nos Hymenoptera (Meves, 1903, 1907; Meves & Duesberg, 1908; Sanderson & Hall, 1948; Sharma, 1961; Woyke & Skowronek, 1974; Hogge & King, 1975; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980; Cruz-Landim & Beig, 1980b; Cruz-Landim, 2001). Entretanto, ainda permanece incerto o destino das espermatídes com pouco citoplasma originadas na segunda divisão meiótica (Cruz-Landim, 2001).

#### 1.4. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consiste em contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva dos Meliponini, gerando dados que possam esclarecer a espermatogênese e elucidar o funcionamento do sistema reprodutor masculino dessas abelhas na ausência das glândulas acessórias. Acredita-se, ainda, que esses dados possam ser usados em estudos taxonômicos e filogenéticos das abelhas bem como dos Hymenoptera em geral.

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

1. Durante a espermatogênese metade das espermátides formadas possuem uma quantidade muito reduzida de citoplasma, sendo consideradas atípicas. Com isso, pretendemos observar o destino e a viabilidade destas espermátides atípicas durante a espermiogênese em *Scaptotrigona xanthotricha*;
2. Descrever as principais diferenças estruturais dos ductos deferentes de *Scaptotrigona xanthotricha* em machos de diferentes idades, afim de estabelecer relações entre a morfofisiologia destes ductos e o processo de maturação sexual;
3. Estudar a morfologia, a ultraestrutura e a histoquímica da parede das vesículas seminais de machos maduros de *Scaptotrigona xanthotricha*, procurando evidenciar sinais de atividade secretora.

## 2- Referências Bibliográficas

- Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi. 1975. Morphology and cytology of the accessory sex gland in invertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 47: 353-398.
- Alexander, B. 1991. A cladistic analysis of the genus *Apis*. In: D. R. Smith (ed) *Diversity in the genus Apis*. Boulder, CO, Westview Press, pp. 1-28.
- Alexander, B. 1992. An exploratory analysis of cladistic relationship within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*. 1: 25-61.
- Báo SN; Dolder H (1991) Abnormal characteristics observed during spermiogenesis of the RA mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): spermatid cells. *Revista Brasileira de Genética, Brasil*. 14, 287-297.
- Baccetti B, Bairati A (1964) Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinale maschili in *Dacus oleae* Gmel ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera)', *Redia*, 49, 1-29.
- Bawa, K. S; Bullock, S. H; Perry, D. R; Coville, R. E & Grayum, M. H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination system. *American Journal of Botany*. 72: 346-356.
- Borror, D. J., Triplehorn, C. A. & Johnson, N. F. 1992. *An introduction to the study of insects*. Saunders, Harcourt Brace.
- Brothers, D. J. 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Crysoideoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*. 28: 233-249.
- Cameron, S. A. 1991. A new tribal phylogeny of the Apidae inferred from mitochondrial DNA sequences. In: Smith D. R. (ed.). *Diversity of the genus Apis*. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 71-78.
- Cameron, S. A. 1993. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the National Academy Science of United States of America*. 90: 8687-8691.
- Cameron, S. A. & Mardulyn, P. 2001. Multiple data sets suggest independent origins of high eusocial behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). *Systematic Biol.*, 50: 194-214.
- Carpenter, J. M. & Wheller, W. C. 1999. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zoologica Scripta*, 28: 251-260.
- Chen, P. S. 1984. The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Ann. Rev. Entomol.* 29: 233-255.
- Chapman, R. F. 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chavarría, G. & Carpenter, J. M. 1994. "Total Evidence" and the evolution of highly social bees. *Cladistic*. 10: 229-258.
- Cruz-Landim C (2001) Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia*, 91, 183-189.
- Cruz-Landim C, Beig D (1980a) Meiose nos Hymenoptera. *Ciênc. Cult.*, 33, 937-966.

- Cruz-Landim C, Beig D (1980b) An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Invert. Reprod.*, **2**, 271-283.
- Cruz-Landim C, Silva De Moraes RLM (1980) Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrfaciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, **27**, 167-175.
- Cruz-Landim C, Beig D, Silva De Moraes RLM (1980) Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia*, **33**, 1, 1-15.
- Dallacqua, R. P. & C. Cruz-Landim. 2003. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Anat. Hist. Embryol.* **32**: 276-281.
- Dowton, M. & Austin, A. D. 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy Science of United States of America*. **91**: 9911-9915.
- Dowton, M. & Austin, A. D. 1999. Models of analysis for molecular datasets for the reconstruction of basal hymenopteran relationships. *Zoologica Scripta*. **28**: 69-74.
- Ferreira A, Abdalla FC, Kerr WE, Cruz-Landim C (2004) Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* **33**, 569-576.
- Gaston, K. J. 1992. Spatial patterns in the description and richness of the Hymenoptera. In *Hymenoptera and Biodiversity*, ed. J. LaSalle and I. D. Gauld, pp. 277-293. C. A. B. International, UK.
- Gillot, C. 1988. Arthropoda - Insecta. In: *Reproductive Biology of Invertebrates* (K. G. Adiyodi and R.G. Adiyodi eds) New York Wiley. **3**: 319-371.
- Gillot, C. 2003. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.* **48**: 163-184.
- Grasse. D. G. 1982. Ejaculate esterase-6 and initial sperm use by female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **27**: 641-650.
- Hogge MAF, King PE (1975) The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Submicr. Cytol.* **7**, 81-96.
- Kerr, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. Tese de Doutorado. Piracicaba, USP.
- Kerr WE (1969) Some aspects of the evolution of social bee (Apidae). *Evol. Biol.*, **3**, 119.
- Kimsey, L. S. 1984. A reevaluation on the phylogenetic relationships in the Apidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology*. **9**: 435-442.
- Kokwaro, E. D. 1982. Ultrastructure of the male accessory reproductive glands, spermatophore and spermatheca of the tse, glossina morsitans Westwood. In: *The structure and functioning of insect cells*. Society for Insect Cells (Akai, H; R. C. King & Morokoshi, eds). Tokyo: Plenum Publishing Corporation. 53-56.
- Koulianos, S; Schmid-Hempel, R; Roubik, D. W. & Schmid-Hempel, P. 1999. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. *J. Evol. Biol.* **12**: 380-384.
- LaSalle, J. & Gauld, I. D. 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: *J. LaSalle & I. D. Gauld (eds) Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B. International, UK, pp. 1-26.

- Lindsley DL, Tokuyasu KT (1980) Spermatogenesis. In: Ashbumer, M & Wright, TR. Eds. The genetics and biology of *Drosophila*. New York, Academic. V. 2d, p. 225-295.
- Mason, W. R. M. & Huber, J. T. (1993). Order Hymenoptera. In Hymenoptera of the world: A identification guide to families, eds. H. Gouler and J. T. Huber, pp. 4-12. Canada Communication Group, Ottawa, Canada.
- Mardulyn, P. & Cameron, S. A. 1999. The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): a promising nuclear gene for higher level phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12: 168-176.
- Melo, G. A. R. 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *The University of Kansas Science Bulletin*. 14: 1-55.
- Meves F (1903) Über "Richtungskörper bildung" in Hoden von Hymenoptera. *Anat. Anz.*, 24, 1, 29-32
- Meves F (1907) Die spermatocytenteilungen bei der Honigbiene, *Apis mellifera* L., nebst Bemerkungen über Chromatinreduction. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 70, 414-419.
- Meves F, Duesberg J (1908) Die spermatocytenteilungen bei der Hornisse *Vespa crabo*. *Arch. Mikrosk. Anat.* 71, 571-587.
- Michelbacher, A. E; Hurd, P.D. Jr & Linsley, E. G. 1971. Experimental introduction of squash bees (*Peponapis*) to improve yields of squashes, gourds and pumpkins. *Bee World*. 52: 156-166.
- Michener, D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univ. Kansas Sci. Bull.* 54: 75-164.
- Michener, D. 2000. *The bees of the world*. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MA, USA.
- Neff, J. L. & Simpson, B. B. 1993. Bees, pollination systems and plant diversity. In: La Salle, J. & I. D. Gauld (Eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*, CAB International, Wallingford. pp. 143-167.
- Noll, F. B. 2002. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera: Apinae), with special reference to social behavior. *Cladistics*. 18: 137-153.
- Oguma Y, Kurokawa H (1984) The least cell number of first spermatocytes per cyst found in *Drosophila kanekoi*. *Jap. J. Genet.*, Tokio, 59, 263-265.
- O'Toole, C. 1993. Diversity of native bees and agroecosystems. In: La Salle, J. & I. D. Gauld (eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*, CBA International, Wallingford. pp. 160-196.
- Plant, J. D. & Paulus, H. F. 1987. Comparative morphology of the postmentum of bees (Hymenoptera: Apoidea) with special remarks on the evolution of the lorum. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 25: 81-103.
- Prentice, M. 1991. Morphological analysis of the tribes of Apidae. In: Smith D. R. (ed.). *Diversity in the genus Apis*. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 71-78.
- Raina, A. K; T. G. Kingam & J. M. Giebultowicz. 1994. Mating-induced loss of Sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantra dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25: 317-327.
- Roig-Alsina, A. & C. D. Michener. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long tongue bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas. Sci. Bull.* 55: 123-162.

- Ronquist, F. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): the state of the art. *Zoologica Scripta*. 28: 3-11.
- Roubik, D. W. 1978. Competitive interactive between neotropical pollinators and Africanized honey bees. *Science*. 201: 1030-1032.
- Roubik, D. W. 1980. Foraging behaviour of competing Africanized honey bees and stingless bees. *Ecology*. 61: 836-845.
- Roubik, D. W. 1982. Ecological impact of Africanized honeybees on naive neotropical pollinators. In: P. Joisson (ed) *Social insects in the tropics*. Paris, Université Paris-Nord. pp. 233-247.
- Sanderson AR, Hall DW (1948) The cytology of honeybee *Apis mellifera* L. *Nature*, 162 (4105), 34-35.
- Sharma GP, Gupta BL, Kumbkarni CG (1961) Cytology of spermatogenesis in the honeybee, *Apis mellifera* (F.). *J. Royal Microsc.* **79**, 337-351.
- Sheppard, W. S. & McPherson, B. A. 1991. Ribosomal DNA diversity in the Apidae. In: Smith, D. R. (ed.) *Diversity in the genus Apis*. Westview Press, Boulder, CO. pp. 89-102.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A. R. & Almeida, E. A. 2002. *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte. 253pp.
- Wile, A. 1976. Las abejas jicotes del género *Melipona* (Apidae: Meliponini) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 24: 123-147.
- Wille, A; Orozco, E. & Raabe, C. 1983. Polinización del chayote *Sechium edule* (Jacq.) Swartz en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 31: 145-154.
- Winston, M. L. & Michener, C. D. 1977. Dual origin of highly social behavior among bees. *Proceedings of the National Academy Science of United States of America*. 74: 1135-1137.
- Wensler RID, Rempel JG (1962) The morphology of the male and female reproductive systems of the midge, *Chironomous plumosus* L. *Can. J. Zool.* **40**, 199-229.
- Woyke J, Skowronek W (1974) Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee. *J. Apic. Res.* **13**, 183-190.

**3.1.** Araújo, V. A. & Lino-Neto, J. 2005. Destino das espermatídes atípicas durante a espermatogênese de *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera, Apidae). (Será submetido a Apidologie).

## **Destino das espermátides atípicas durante a espermatogênese em *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera, Apidae).**

Vinícius Albano Araújo<sup>1</sup> & José Lino-Neto<sup>2</sup>

**Resumo.** Em abelhas, o conteúdo citoplasmático das espermátides, no final da meiose, é distribuído de forma desigual, sendo que em uma delas o citoplasma é muito reduzido, com poucos ribossomos. Neste trabalho usamos a microscopia de luz para buscar evidências que demonstrem o destino destas células atípicas durante a espermatogênese de *Scaptotrigona xanthotricha*. Os núcleos das espermátides com pouco citoplasma não acompanharam o alongamento dos núcleos das espermátides normais. As espermátides atípicas migram para a periferia dos feixes e são eliminadas durante a espermiogênese juntamente com os restos citoplasmáticos das células que se transformaram em espermatozóides. Técnicas de coloração com DAPI e hematoxilina-eosina demonstraram que as espermátides atípicas são provavelmente fagocitadas pelas células císticas. Sendo assim, metade das espermátides formadas durante o processo espermatogênético não é viável para formação de espermatozóides.

**Palavras-chave:** espermatogênese, Hymenoptera, abelhas sem ferrão.

### **In viability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae).**

**Abstract.** In bees the cytoplasmatic content of the spermatids at the end of meiosis, is distributed in an irregular way and one of them is formed with a much reduced cytoplasm composed only by the nucleus and few ribosomes. In this work we used the light microscopy to look for evidences that demonstrate the destiny of these atypical cells during the spermiogenesis in *Scaptotrigona xanthotricha*. Nuclei of the spermatids with little cytoplasm don't accompanied the elongation of the nuclei of normal cells. The atypical spermatids were migrating to the bundles periphery and were being eliminating during the spermiogenesis together with the cytoplasmatic rests of the cells that were transformed in spermatozoa. Coloration techniques with DAPI and hematoxilina-eosina demonstrated that the atypical spermatids are phagocyted by the cystic cells. Then, half of the spermatids formed during the spermatogenic process aren't viable to be transformed in spermatozoa.

**Keywords:** Spermatogenesis, Hymenoptera, stingless bee

## Introdução

Nos insetos, em geral, as divisões e o desenvolvimento das células germinativas masculinas ocorrem em grupos denominados de cistos. Estes se encontram dentro dos folículos testiculares (Báo & Dolder, 1991) e são formados por clones de células germinativas revestidos por uma camada de células epiteliais não germinativas (Baccetti & Bairati, 1964).

Durante a espermatogênese, as espermatogônias sofrem divisões mitóticas gerando um número de células constante em cada cisto. Estas células, após duas divisões meióticas originam as espermátides (Lindsley & Tokuyasu, 1980; Oguma & Kurokawa, 1984; Cruz-Landim, 2001). O número de espermátides por cisto é característico para cada espécie e pode ser expresso como  $2^n$  onde “n” é usualmente igual a 5, 6, 7 ou 8.

Nos Hymenoptera os machos são originados de ovos não fertilizados, portanto, são haplóides e as fêmeas são diplóides, já que estas se originam de ovos fertilizados. Nestes insetos a primeira divisão meiótica é abortiva, não ocorrendo formação do fuso (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b) e nem a separação de material genético. Portanto, o número de cromossomos nos machos de Hymenoptera não muda durante a “meiose” (Kerr, 1969). A segunda divisão meiótica ocorre normalmente, gerando duas espermátides haplóides com número igual de cromossomos (Cruz-Landim, 2001). Em abelhas, o conteúdo citoplasmático é distribuído de forma desigual entre as duas espermátides. Uma delas recebe quase todo o citoplasma, ficando a outra apenas com o núcleo e uma quantidade muito reduzida de citoplasma, contendo somente alguns ribossomos (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b; Cruz-Landim *et al.* 1980).

Vários trabalhos têm descrito aspectos da espermatogênese nos Hymenoptera (Meves, 1903, 1907; Meves & Duesberg, 1908; Sanderson & Hall, 1948; Sharma, 1961; Woyke & Skowronek, 1974; Hogge & King, 1975; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980; Cruz-Landim & Beig, 1980b; Cruz-Landim, 2001). Entretanto, ainda permanece incerto o destino das espermátides com pouco citoplasma originadas na segunda divisão meiótica (Cruz-Landim, 2001). Hachiohe & Onishi (1952) propuseram que as espermátides carentes de citoplasma são inviáveis. Também foi sugerido que estas células poderiam fundir-se para formar trofócitos (Wensler & Rempel, 1962). Já Kerr & Silveira (1974), considerando o número de espermatozóides por cisto, propuseram que estas espermátides também se desenvolvem em espermatozóides.

Neste trabalho demonstramos que, durante a espermiogênese em *Scaptotrigona xanthotricha*, as espermátides atípicas são eliminadas, não contribuindo na produção dos espermatozóides.

## Material e Métodos

Pupas machos de *Scaptotrigona xanthotricha*, com olho-róseo, olho-marrom e olho preto, foram obtidas de colônias mantidas no Apiário central da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.

As pupas foram dissecadas e os testículos foram fixados em paraformaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. O material foi desidratado em série alcoólica e embebido em Historesin<sup>®</sup>. Cortes semifinos foram corados com hematoxilina-eosina. Algumas destas secções foram coradas por 15 min. com 0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI) em tampão fosfato, e examinadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60), equipados com filtro de excitação BP360-370 nm.

Alguns testículos foram dissecados em tampão fosfato de sódio e transferidos para uma solução corante de orceína-acética (orceína 2% em ácido acético 55%). Após 20 min, os folículos foram colocados sobre lâminas histológicas com uma gota do corante, dissociados com o auxílio de estiletos e cobertos com lamínula, seguindo-se análise em fotomicroscópio Olympus BX-60.

## Resultados

A espermatogênese ocorre dentro dos cistos, os quais se encontram dentro dos folículos testiculares. O processo de maturação dos espermatozóides é sincronizado dentro do mesmo cisto. No entanto, após a segunda divisão meiótica, metade das espermátides apresentam pouco citoplasma e não acompanham o alongamento das espermátides normais.

Em pupas de olho róseo foram observadas espermátides jovens, logo após a segunda divisão meiótica (Fig. 1A). Nesta fase, os núcleos mostram-se esféricos, havendo considerável assimetria entre as espermátides normais, com muito citoplasma e as atípicas (Fig. 1A). Nesta fase é possível observar pontes citoplasmáticas entre duas espermátides originadas do mesmo espermatócito II, sendo que somente na espermátide com citoplasma ocorre o alongamento citoplasmático e formação do axonema e do complexo mitocondrial (Nebenker) (Fig. 1B).

Além disso, cada cisto possui células císticas, que nesta fase têm seu núcleo facilmente distinguido dos núcleos das espermatídes (Fig. 1C). Nas pupas de olho marrom já é possível diferenciar os núcleos dos dois tipos celulares, os das espermatídes normais localizam em um pólo do cisto, começam a se alongar e apresentam uma região clara central maior do que aquela presente nas células atípicas (Fig. 1C). Os núcleos das espermatídes atípicas são menores, mais esféricos e se distribuem pela região mediana do cisto. Em um estágio mais avançado, ainda nestas pupas, os núcleos das espermatídes normais estão mais alongados assumindo um formato fusiforme, entretanto não ocorreram mudanças nos núcleos das espermatídes atípicas (Fig. 1D). Em seguida, os núcleos das espermatídes normais estão ainda mais fusiformes e os das espermatídes atípicas se tornam levemente ovalados (Fig. 1E).

Em pupas de olho preto e corpo não pigmentado os núcleos das espermatídes normais estão alongados e não apresentam mais a área clara observada nas fases anteriores. Enquanto os núcleos das espermatídes atípicas apresentam-se fusiformes, mas alguns estão ovalados, demonstrando que nestes o processo de alongamento não é sincronizado (Fig. 2A). Em cistos de pupas mais velhas, os núcleos das células atípicas apresentam formatos variados, entretanto nenhum deles se alongaram além de fusiformes (Fig. 2B). Em pupas com olhos pretos e broto alar não pigmentado, os núcleos das espermatídes atípicas se encontram próximos a região posterior do cisto e a frente das vesículas citoplasmáticas que serão eliminadas na extremidade posterior dos flagelos (Fig. 2C). Secções transversais dos testículos nesta fase, corados com hematoxilina-eosina (Fig. 2D) e com DAPI (Fig. 2E), evidenciaram a presença dos núcleos das espermatídes atípicas ou fragmentos destes dentro de vesículas nas células císticas. Estes núcleos possuem as mesmas características dos núcleos das espermatídes normais, os quais também foram corados com as mesmas técnicas quando ainda estavam associados aos cistos. Nesta fase, corte transversais dos testículos demonstram que os núcleos das células císticas não são facilmente distinguidos devido à formação de várias vesículas (Fig. D-E).

Em pupas de olhos pretos, corpo e broto alar pigmentados, os núcleos das espermatídes normais já se encontram em seu comprimento final e aqueles das espermatídes atípicas não são mais observados, apenas vesículas de natureza ácida na extremidade posterior do cisto, possivelmente representando fragmentos daqueles núcleos no citoplasma de células císticas (Fig. 3A) e as vesículas citoplasmáticas de células normais também desaparecem nesta fase (Fig. 3B). Cortes longitudinais dos cistos nesta idade, corados com hematoxilina e eosina, demonstra que as vesículas anteriormente numerosas nas células císticas desaparecem e não há mais qualquer

vestígio das espermatídes atípicas (Fig. 3c). Nesta fase, os cistos apresentam apenas as células císticas e os espermatozóides já completaram o alongamento e se transformaram em espermatozóides organizados em feixes (Fig. 3C).

## **Discussão**

A formação de espermatídes com pouco citoplasma após a segunda divisão meiótica já havia sido documentada em várias publicações (Cruz-Landim & Beig 1980a, b; Cruz-Landim & Silva de Moraes 1980; Cruz-Landim *et al.*, 1980). Estes trabalhos demonstraram que estas espermatídes atípicas possuem somente o núcleo e uma pequena quantidade de citoplasma sem qualquer das organelas membranosas comumente encontradas nas células eucarióticas.

Existiam controvérsias quanto à possibilidade das espermatídes atípicas formarem espermatozóides viáveis e quanto ao seu destino. Wensler & Rempel, (1962) sugeriram que estas células podiam fundir-se-iam formando trofócitos. Kerr & Silveira (1974), contando o número de espermatozóides por cistos, propuseram que tanto as espermatídes normais quanto às atípicas se desenvolveriam em espermatozóides. No entanto, a perda da maioria das organelas citoplasmáticas, é forte evidência de que as espermatídes atípicas não são viáveis na formação de espermatozóides. Isto porque, alguns constituintes obrigatórios dos flagelos, como os derivados mitocondriais e acrosomos não seriam formados, já que se formam a partir das mitocôndrias e do complexo de Golgi, respectivamente (Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Hoage & Kessel, 1968; Kerr & Silveira, 1974; Lino-Neto & Dolder, 2000; Woyke & Skowronek, 1974). Isto é corroborado pelo fato dos pares de espermatídes jovens observadas (uma normal e uma atípica) possuírem somente um complexo mitocondrial. Além disso, a observação da seqüência destas células durante a espermatogênese não deixam dúvidas de que as espermatídes atípicas não conseguem acompanhar o alongamento nuclear das normais. Assim como foi demonstrado, outros autores também acreditavam que as espermatídes atípicas fossem inviáveis na formação de espermatozóides (Hachiohe & Onishi 1952; Cruz-Landim 2001). Entretanto, esta última autora não acredita na possibilidade das espermatídes atípicas serem fagocitadas por células císticas.

As colorações com DAPI e Hematoxilina-eosina, utilizadas para evidenciar núcleos, comprovaram que os núcleos das espermatídes atípicas, ou fragmentos destes, após terem migrado para a periferia dos feixes, eram vistos dentro de vesículas no citoplasma das células císticas. Isto sugere que as células císticas

fagocitam, juntamente com os restos citoplasmáticos das espermatídes normais (Jamieson *et al.*, 1999), as espermatídes atípicas.

Este trabalho demonstrou evidências de que as espermatídes atípicas formadas após a segunda divisão meiótica não formam espermatozóides. Sendo que estas células são reabsorvidas por células císticas juntamente com o resto citoplasmático das espermatídes normais.

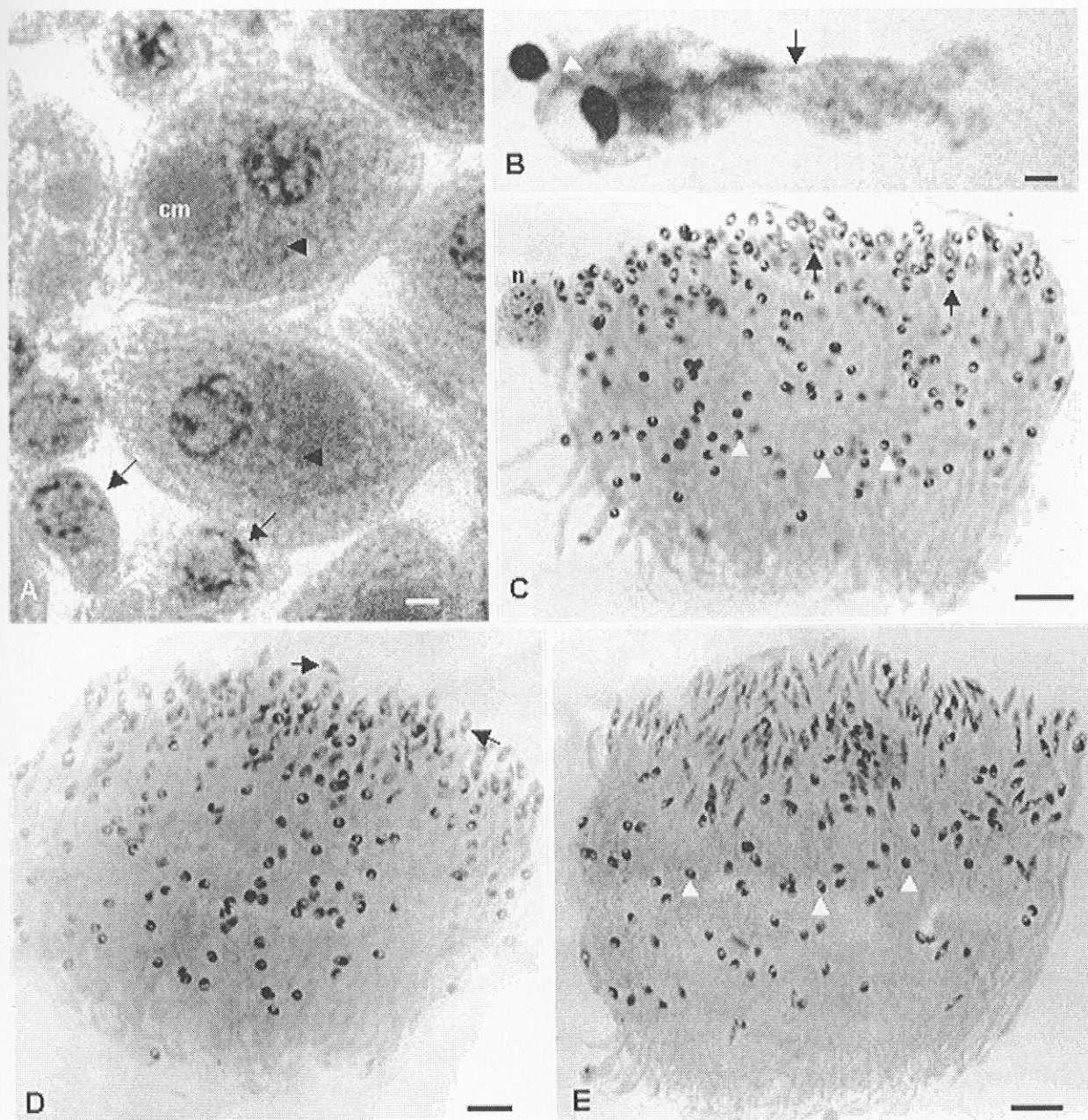
### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Dr. Lúcio A. O. Campos (Departamento de Biologia Geral, UFV) por fornecer os insetos. Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Proc. 133580/2003-2) e FAPEMIG.

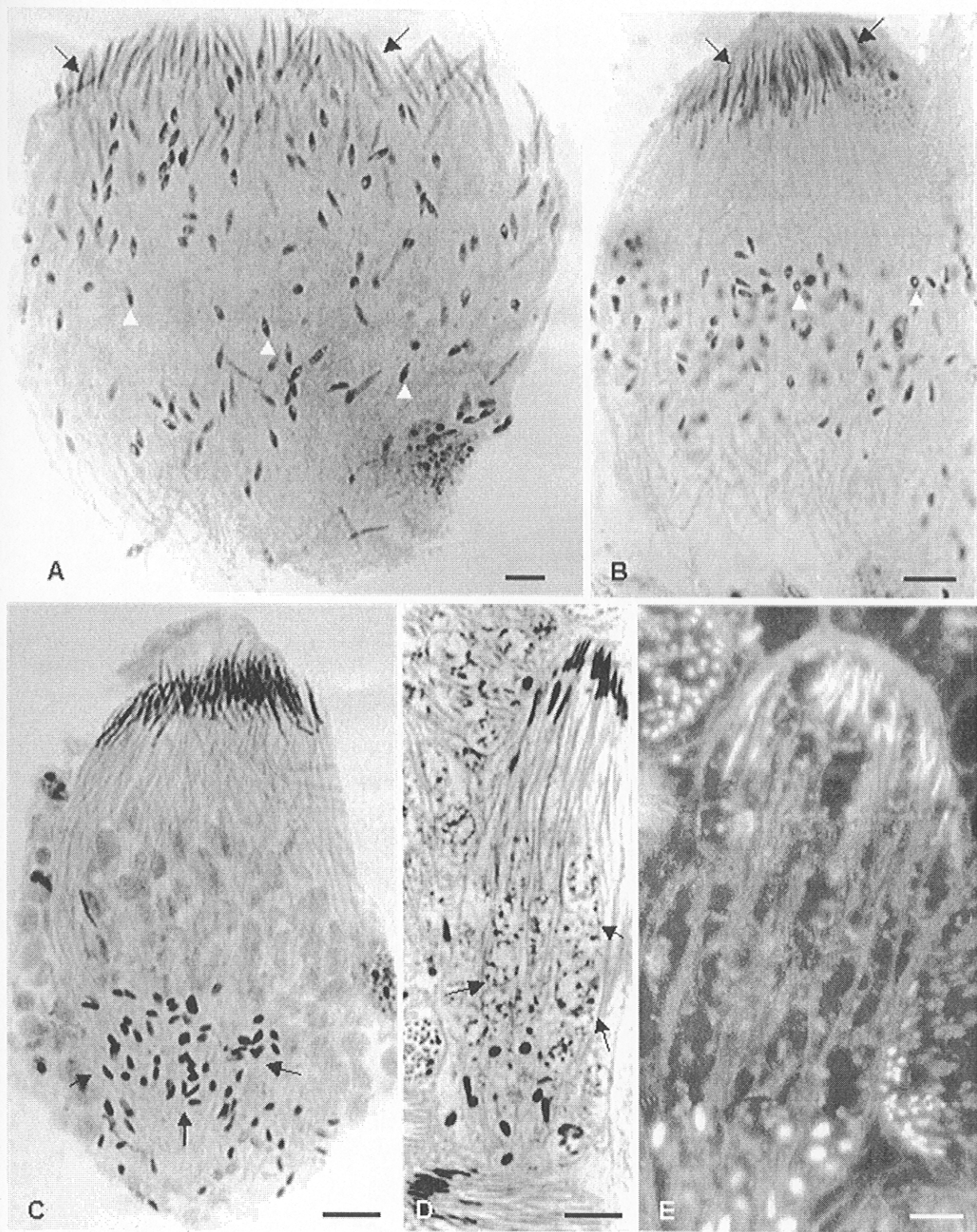
## Referências Bibliográficas

- Báo SN; Dolder H (1991) Abnormal characteristics observed during spermiogenesis of the RA mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): spermatid cells. *Revista Brasileira de Genética, Brasil*, **14**, 287-297.
- Baccetti B, Bairati A (1964) Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinale maschili in *Dacus oleae* Gmel ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera)', *Redia*, **49**, 1-29.
- Cruz-Höfling MA, Cruz-Landim C, Kitajima EW (1970) The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *An. Acad. Bras. Ciên.*, **42**, 69-78.
- Cruz-Landim C (2001) Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia*, **91**, 183-189.
- Cruz-Landim C, Beig D (1980a) Meiose nos Hymenoptera. *Ciênc. Cult.*, **33**, 937-966.
- Cruz-Landim C, Beig D (1980b) An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Invert. Reprod.*, **2**, 271-283.
- Cruz-Landim C, Silva De Moraes RLM (1980) Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, **27**, 167-175.
- Cruz-Landim C, Beig D, Silva De Moraes RLM (1980) Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia*, **33**, 1, 1-15.
- Hachiohe K, Onishi A (1952) On the meiosis of the drone of honey bee (*Apis mellifera*). *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., G.* **3**, 83-87.
- Hoage TR, Kessel, RG (1968) Na electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honeybee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *J. Ultrast. 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, Dallai R, Afzelius BA (1999) Development of the Insect Spermatozoon: Spermatogenesis. In B.Jamieson, R. Dalai & B. Afzelius (eds). *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, Inc., USA, 4-23.
- Kerr WE (1969) Some aspects of the evolution of social bee (Apidae). *Evol. Biol.*, **3**, 119.
- Kerr WE, Silveira V (1974) A note on the formation of honeybee spermatozoa. *J. Apicult. Res.*, **13**, 121-126.
- Lindsley DL, Tokuyasu KT (1980) Spermatogenesis. In: Ashburner, M & Wright, TR. Eds. *The genetics and biology of Drosophila*. New York, Academic. V. 2d, p. 225-295.
- Lino-Neto J, Báo SN, Dolder H (2000) Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue & Cell*, **32**, 322-327.
- Meves F (1903) Über "Richtungskörper bildung" in Hoden von Hymenoptera. *Anat. Anz.*, **24**, **1**, 29-32

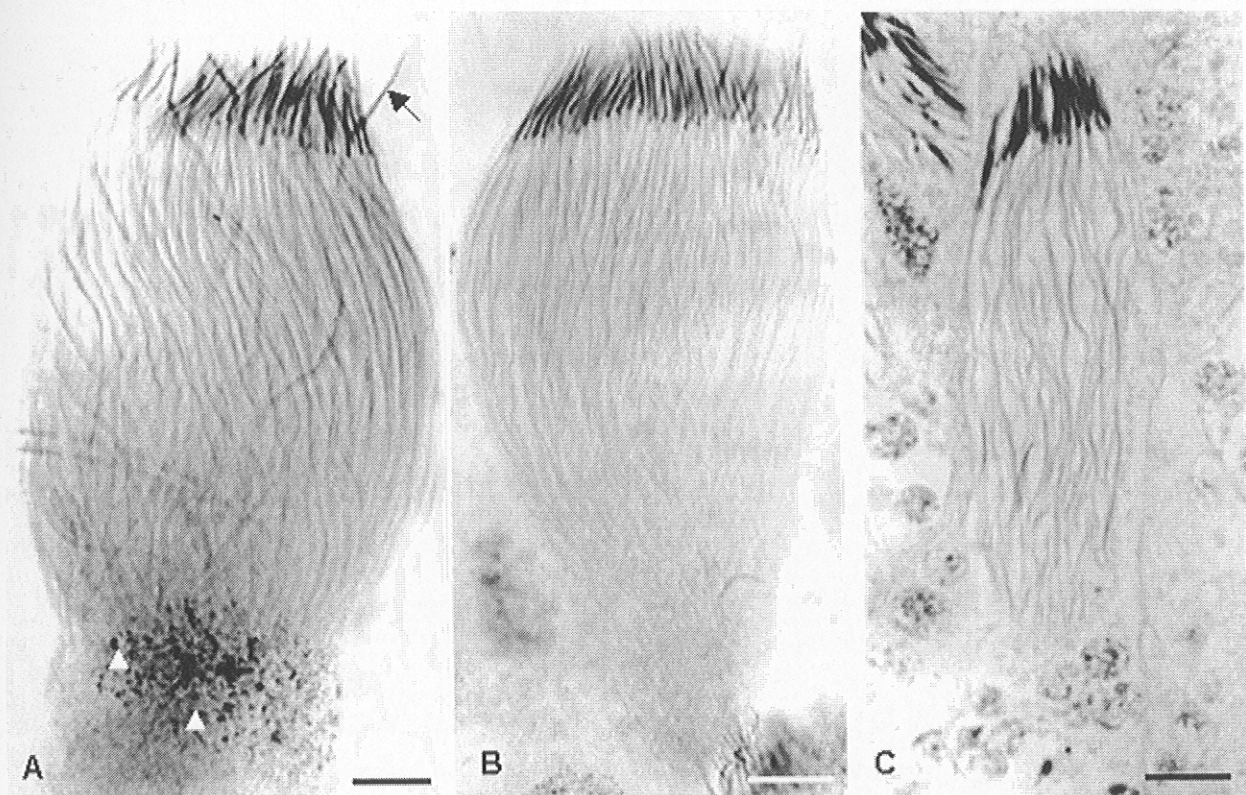
- Meves F (1907) Die spermatocytenteilungen bei der honigbiene, *Apis mellifera* L., nebst Bemerkungen über. Chromatinreduction. Arch. Mikrosk. Anat, **70**, 414-419.
- Meves F, Duesberg J (1908) Die spermatocytenteilungen bei der Hornisse *Vespa crabo*. Arch. Mikrosk. Anat. **71**, 571-587.
- Oguma Y, Kurokawa H (1984) The least cell number of first spermatocytes per cyst found in *Drosophila kanekoi*. Jap. J. Genet., Tokio, **59**, 263-265.
- Sanderson AR, Hall DW (1948) The cytology of honeybee *Apis mellifera* L. Nature, 162 (4105), 34-35.
- Sharma GP, Gupta BL, Kumbkarni CG (1961) Cytology of spermatogenesis in the honeybee, *Apis mellifera* (F.). J. Royal Micros. **79**, 337-351.
- Wensler RID, Rempel JG (1962) The morphology of the male and female reproductive systems of the midge, *Chironomous plumosus* L. Can. J. Zool. Ottawa, **40**, 199-229.
- Woyke J, Skowronek W (1974) Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee. J. Apic. Res. **13**, 183-190.



**Figura 1.** Cistos testiculares de pupas de olhos róseos (A e B) e marrons (C-E) de *S. xanthotricha*. **A-** Cistos logo após a segunda divisão meiótica, mostrando espermatídes normais, com bastante citoplasma (cabeça de seta), e atípicas, praticamente sem citoplasma (setas). Observar, nas primeiras, a presença do complexo mitocondrial (cm). **B-** Duas espermatídes, originadas do mesmo espermatócito II, ligadas por ponte citoplasmática, mostrando o alongamento citoplasmático e a formação do axonema em somente aquela com citoplasma (seta). **C-** Cisto mostrando que, nesta fase, já é possível diferenciar os núcleos dos dois tipos celulares, os das células normais (setas) estão começando a se alongar, possuem uma região clara central maior e se localizam em um pólo do cisto, já aqueles das espermatídes atípicas são menores, mais esféricos e se distribuem pela região mediana do cisto (cabeça de seta). Núcleo da célula cística (n). **D-** Cisto em uma fase imediatamente após aquela da figura anterior. Observe que neste os núcleos das espermatídes normais estão mais alongados, mas ainda não ocorreu alteração nos núcleos das espermatídes atípicas. **E-** Cisto um pouco mais adiantado, mostrando os núcleos das espermatídes normais bem mais fusiformes e os das espermatídes atípicas levemente ovalados. N = núcleo da célula cística; cm = complexo mitocondrial. Barras: 200µm.



**Figura 2.** Cistos de pupas brancas de olho preto. **A-** Nesta fase os núcleos das espermatídes normais estão bastante longos e não apresentam mais a área clara observada naqueles da figura anterior, já os núcleos das células atípicas apresentam-se fusiformes, mas alguns ainda estão levemente ovalados. **B-** Cisto em uma fase logo após a da figura anterior. Observe que os núcleos das células atípicas apresentam formatos variados, mas não foram além de fusiforme. **C-** Nesta fase os núcleos das espermatídes atípicas se encontram próximos à região final do cisto, inclusive a frente das vesículas citoplasmáticas (seta) que serão eliminadas na extremidade posterior dos flagelos. **D-** Corte de testículo corado com hematoxilina e eosina, mostrando alguns núcleos na região final do cisto e várias vesículas citoplasmáticas entre os flagelos (seta). **E-** Cisto semelhante aquele da figura anterior corado com DAPI. Barras: 200µm.



**Figura 3.** Cistos de pupas de olho preto e asa pigmentada. **A-** Os núcleos das espermatídes normais já se encontram em seu comprimento final (seta) e aqueles das espermatídes atípicas não são mais observados, apenas materiais de natureza ácida na extremidade posterior do cisto (cabeças de seta). **B-** Cisto onde não se observa mais nenhum núcleo das células atípicas, bem como vesículas citoplasmáticas das células normais. **C-** Cisto em uma fase correspondente aquela da figura anterior, mas em corte corado pela hemaxilina e eosina. Observe que não há mais qualquer vestígio dos núcleos das espermatídes atípicas. Barras: 200µm.

**3.2.** Araújo, V. A., Zama, U., Neves, C. A., Campos, L. A. O. & Lino-Neto, J. 2005. Modificações estruturais no epitélio dos ductos deferentes de *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a maturação sexual. (Será submetido a Journal of Morphology).

## **Modificações estruturais no epitélio dos ductos deferentes de *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a maturação sexual.**

Vinícius Albano Araújo, Uyrá Zama, Clóvis Andrade Neves, Lúcio Antônio de Oliveira Campos e José Lino-Neto

**Resumo.** A abelha sem ferrão *Scaptotrigona xanthotricha* é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Entretanto, esta espécie está ameaçada de extinção em alguns estados brasileiros, tornando importantes estudos sobre sua biologia reprodutiva. Os ductos deferentes foram investigados através de microscopia de luz durante as fases de pupa e em machos entre zero e 22 dias de vida. O sistema reprodutor em machos desta espécie é formado por um par de testículos, cada um com quatro folículos, e por um par de ductos deferentes. Estes possuem uma região dilatada e modificada, as vesículas seminais. Assim como nos demais meliponídeos, não existem glândulas acessórias no trato reprodutor dos machos. Em pupas olho marrom até machos recém emergidos ocorre secreção pelas células do epitélio das vesículas seminais e dos ductos deferentes pós-vesiculares. Nesta fase o epitélio encontra-se bastante alto composto por células prismáticas. As secreções na vesícula se misturam aos espermatozoides que preenchem as vesículas por volta do quinto dia de vida após a emergência, quando o epitélio da vesícula se torna baixo, com células cúbicas e muitas inclusões na região basal. Após os dez dias de idade os machos podem ser considerados sexualmente maduros, já que as vesículas estão completamente cheias de espermatozoides e os testículos encontram-se quase completamente degenerados. Neste trabalho, foram descritas características estruturais do epitélio dos ductos deferentes e discutido sobre a sua função de suas secreções na biologia reprodutiva dos Meliponídeos durante a maturação sexual.

**Palavras-chave:** morfologia, sistema reprodutor, abelhas sem ferrão e figuras mielínicas.

## **Structural modifications in the deferent ducts epithelium of *xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) during the sexual maturation.**

**Abstract.** The stingless bee *Scaptotrigona xanthotricha* is largely distributed in the tropical and subtropical regions of the world. This specie is threatened of extinction in some Brazilian states doing very important studies about its reproductive biology. The deferent ducts were investigated through light microscopy during the pupae phases until the adult life. The male reproductive system of this specie is formed by a pair of testes, each one with four follicles, and by a pair of deferent ducts that have an expanded and modified region, the seminal vesicles. As well as in the other Meliponini, there are no accessory glands in the male reproductive tract. In the pupae of brown eye until recent emerged males there is secretion in the epithelium of the seminal vesicles and pos-vesicular deferent ducts. In this phase the epithelium is very high and composed for prismatic cells. These secretions in the vesicle mix with the spermatozoa that fill

out the vesicles about the fifth day of life. The vesicle epithelium becomes low, with cubic cells and a lot of inclusions in the cell base. After ten days of life males can be considered sexually matures because seminal vesicles are full of spermatozoa and the testes become almost completely degenerated. In this work were described structural characteristics of the deferent ducts epithelium and was discussed about its function in the reproductive biology of the Meliponini during the sexual maturation.

**Key words:** morphology, reproductive system, stingless bees and myelinic figures.

## Introdução

A tribo Meliponini compreende as chamadas abelhas sem ferrão, distribuídas principalmente nas regiões tropicais do mundo e subtropicais do hemisfério sul (Michener 2000). Esta tribo compreende 27 gêneros, dentre eles *Scaptotrigona*, o qual apresenta 8 espécies descritas e um grande número de espécies crípticas (Silveira *et al.*, 2002).

A maioria dos insetos possui glândulas acessórias no sistema reprodutor dos machos, e suas secreções possuem diversas funções, tais como: maturação e ativação dos espermatozoides, formação do espermatóforo, indução e aceleração da oviposição após a cópula, controle da poligamia e formação do “plug” de cópula (Bishop 1920; Chen 1984; Colleman *et al.*, 1995; Gillot, 2003; Raina *et al.*, 1994; Boosmam 2005). No entanto, estas glândulas estão ausentes nos meliponídeos (Kerr, 1948).

A função das glândulas acessórias pode ser substituída por células secretoras ao longo dos ductos deferentes, embora isto ainda não foi comprovado nos Meliponini estudados (Araújo *et al.*, 2005; Dallacqua & Cruz-landim 2003). Acredita-se que a vesícula seminal não seja somente um órgão passivo de estocagem que de espermatozoides nos meliponídeos. As células do seu epitélio e do epitélio de todo o ducto deferente, podem secretar substâncias que compõem parte do fluido do sêmem, no entanto, esta secreção deve ocorrer em machos antes que eles se tornem sexualmente maduros (Dallacqua & Cruz-Landim, 2003; Araújo *et al.*, 2005).

Muitos trabalhos têm sido feitos sobre a biologia dos meliponídeos, especialmente sobre o comportamento social e determinação de sexo (Moure 1951, 1960; Gauld & Bolton 1988; Roig-Alsina & Michener 1993; Michener, 1990, 2000; Crozier & Pamilo 1996). Entretanto, ainda existem muitas questões não respondidas sobre a biologia reprodutiva deste grupo, algumas das quais poderão ser entendidas acompanhando o processo de maturação sexual destes insetos.

Neste trabalho descrevemos as principais alterações morfológicas dos ductos

deferentes ao longo da maturação sexual em machos de *Scaptotrigona xanthotricha*, afim de fornecer dados que esclareçam a relação morfofisiológica desta região com o processo maturação sexual dos Meliponini.

## **Material e Métodos**

### ***Insetos***

Favos de cria foram retirados de colônias de *Scaptotrigona xanthotricha* mantidas no apiário central da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. As pupas foram retiradas abrindo as células de cria pela extremidade inferior e os machos foram identificados pela presença do par de gonostilus. A idade das pupas e imagos jovens foi determinada de acordo com o padrão de coloração dos olhos e pigmentação do corpo, foram estabelecidas cinco classes: 1) pupa de olho róseo (OR); 2) pupa de olho marrom (OM); 3) pupa de olho preto e corpo sem pigmentação (OPCB); 4) imago com olho preto, corpo pigmentado e asa sem pigmentação (OPAS); e 5) imago com olho preto, corpo e asa pigmentada (OPAP). Para obtenção de adultos, favos de cria foram acondicionados em placas de Petri e colocados em estufa B.O.D a 29°C. As células de cria mais escuras e geralmente mais centrais no favo eram desoperculadas diariamente, para que as abelhas pudessem emergir. Os machos recém emergidos foram marcados com tinta não tóxica para controlar a idade de cada indivíduo. Estes machos foram colocados em uma caixa de madeira contendo operárias de diferentes idades (para alimentar os indivíduos jovens), resina e favos de cria contendo larvas jovens (para serem manipuladas pelas operárias) além de pólen e xarope de sacarose em água 1:1 (para servirem de alimento). As caixas foram mantidas em estufa B.O.D á 29°C. Foram dissecados machos das cinco fases de pupa assinalados e adultos diariamente nas idades entre zero (recém-emergidos) e 22 dias (idade máxima de sobrevivência nas condições experimentais).

### ***Microscopia de Luz***

Os ductos deferentes foram fixados em gluteraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, e pós-fixados em OsO<sub>4</sub> 1%. Em seguida, foram desidratados e embebidos em Histo-resina<sup>®</sup>. Cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e fotografados em um microscópico Olympus CX 31.

## **Histoquímica**

Os ductos deferentes foram fixados em paraformaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, e embebidos em Histo-resina®.

Cortes semifinos foram submetidos aos testes histoquímicos para detecção de proteínas: Mercúrio de Bromofenol [Pearse 1985], polissacarídeos: PAS [Junqueira e Junqueira 1993] e fosfatases: ácida e básica [Bancroft and Stevens, 1996]. Todos os testes foram acompanhados de grupo controle positivo (intestino médio de *Bombus terrestris*).

## **Resultados**

### *Sistema reprodutor masculino: anatomia geral*

O sistema reprodutor de machos de *S. xanthotricha* é formado por um par de testículos, cada um contendo quatro folículos. Durante as fases de pupa até o quinto dia de idade adulta o processo espermatogênico é finalizado e os testículos ainda estão bastante volumosos. De cada folículo testicular desemboca um ducto eferente e estes se fundem formando o ducto deferente. Os ductos deferentes possuem uma região dilatada e modificada, a vesícula seminal. Os ductos deferentes pós-vesiculares se fundem formando o ducto ejaculatório (Fig. 1A). Os espermatozoides deixam os testículos em feixes e quando alcançam as vesículas estes são desorganizados e somente espermatozoides livres são vistos no lúmen das mesmas. Após os espermatozoides migrarem para as vesículas seminais, onde ficarão estocados até o momento de cópula, se inicia o processo de degeneração testicular (Fig. 1B). Portanto, a produção de espermatozoides durante uma fase da vida.

### *Diferenças morfológicas no epitélio dos ductos deferentes ao longo da maturação sexual*

Em pupas de olho rosa e olho marrom as vesículas seminais estão com o lúmen vazio (Fig. 1C). O epitélio é composto por células prismáticas, e os núcleos são grandes, ocupando a porção mediana das células (Fig. 1D). Os núcleos possuem predomínio de cromatina descondensada. Os ductos deferentes pós-vesiculares nestas pupas ainda não apresentam secreções no lúmen. No entanto, nas pupas de olho marrom nota-se a presença de grandes estruturas tipo-vesícula na base das células, e de pequenos grânulos de secreção no ápice (Fig. 1D). As pupas de olho

preto e corpo não pigmentado e pupas de olho preto e broto alar não pigmentado apresentam estas mesmas características, entretanto os lumens dos ductos deferentes pós-vesiculares e das vesículas seminais apresentam secreções (Figs. 1E e F).

Em pupas de olho preto e broto alar pigmentado até indivíduos com dois dias de vida apresentam o epitélio vesicular composto por células prismáticas de núcleos medianos e regulares (Fig. 2A). As estruturas tipo-vesícula, anteriormente presentes na base das células, agora também ocupam o ápice das mesmas formando borbulhas que são destacadas da membrana e secretadas de forma apócrina (Fig. 2A). Estas secreções tipo-vesícula possuem numerosos grânulos em seu interior corados pelo azul de toluidina e preenchem todo o lúmen da vesícula seminal e dos ductos deferentes (Fig. 2A).

Machos com três e quatro dias de vida após a emergência das células de cria possuem o epitélio da vesícula ainda composto por células prismáticas altas, entretanto os núcleos destas células são mais esféricos e menores do que os das fases anteriores (Fig. 2B). As estruturas tipo-vesícula voltam a ocupar a região basal das células com três dias e com quatro dias estas estruturas são substituídas por pequenas inclusões ósmio-positivas (Fig. 2B). O lúmen da vesícula seminal e dos ductos deferentes pós-vesiculares são totalmente preenchidos por grânulos corados pelo azul de toluidina (Fig. 2C).

Os espermatozoides alcançam as vesículas seminais em machos com cinco dias. Nesta fase o epitélio vesicular se encontra mais baixo que nas fases anteriores, sendo composto por células cúbicas com núcleos irregulares ocupando o terço basal (Fig. 2D). O ápice apresenta secreção tipo apócrina (Fig. 3A). Com seis e sete dias de vida, as vesículas seminais já estão completamente preenchidas por espermatozoides (Fig. 3B). O epitélio é baixo e composto por células cúbicas com núcleos esféricos ocupando a porção mediana das células. Nesta fase a base das células possui numerosas e pequenas inclusões tipo-vesícula (Fig. 3B). Os ductos deferentes pós-vesiculares permanecem cheios de secreção (Fig. 3C). Os ductos deferentes pré-vesiculares contêm espermatozoides no lúmen, evidenciando que o processo de migração para as vesículas seminais ainda não está completo (Fig. 3D).

Machos entre oito e dez dias apresentam os núcleos das células epiteliais da vesícula seminal com formato irregular e, às vezes, espremidos por grandes inclusões tipo-vesícula (Figs. 3E e F). Estas inclusões nesta fase são muito numerosas na base da célula (Fig. 3F). Muitos espermatozoides mantêm contato com a borda do epitélio. Os ductos deferentes a partir desta idade mantêm um padrão semelhante, sendo os machos, considerados sexualmente maduros. Isto porque os espermatozoides já

migraram para as vesículas seminais e os testículos já se encontram em processo de degeneração. Nesta fase o epitélio é baixo, os núcleos estão ainda mais espremidos pelas inclusões tipo-vesícula e, às vezes, parece que são englobados pelas mesmas (Fig. 4A). Alguns feixes de espermatozóides entram em contato com a parede do epitélio, formando profundas inserções (Fig. 4C). A quantidade e o tamanho das inclusões tipo-vesícula não se mantêm constantes ao longo da maturação sexual, mas a partir do 10º dia sua ocorrência foi sempre observada. Após o 20º dia observa-se um aumento no número de inclusões tipo-vesícula e muitos espermatozóides em contato com o epitélio (Figs. 4C-D). Os ductos deferentes pós-vesiculares ainda apresentam secreções nos machos sexualmente maduros, como visto em machos com 22 dias (Fig. 4B).

Os testes histoquímicos realizados para evidenciar proteínas (azul de bromofenol) foram negativos para todas as idades. O teste para PAS foi positivo nas fases de pupas olho rosa a pupa de olho preto e broto alar pigmentado, evidenciando a presença de glicogênio na forma de pequenos grânulos de secreção no ápice das vesículas seminais (Fig. 4E). A natureza dessa secreção foi comprovada pela reação positiva com a enzima amilase. A atividade da fosfatase ácida não foi detectada, entretanto em pupas OM, OPCB e OPAS foi evidenciada a atividade da fosfatase alcalina no ápice do epitélio das vesículas seminais. A atividade da fosfatase alcalina coincide com a mesma fase de secreção dos grãos de glicogênio.

## **Discussão**

Segundo Ferreira *et al.*, (2004) o sistema reprodutor de *S. xanthotricha* corresponde ao padrão observado em outros Meliponini, os quais apresentam quatro folículos testiculares encapsulados juntamente com as vesículas seminais, e não possuem glândulas acessórias. O impacto da ausência destas glândulas constitui um das questões não respondidas da biologia reprodutiva das abelhas sem ferrão. Em Meliponini são escassos trabalhos descrevendo as principais modificações morfofisiológicas dos sistemas reprodutores ao longo do processo de maturação sexual. Os espermatozóides em *S. xanthotricha*, assim como ocorre nos demais Apocrita, são liberados em feixes dos testículos e estes são desorganizados quando alcançam as vesículas seminais (Moreira *et al.*, 2004).

Assim como na maioria das abelhas (Dumser, 1980; Heinze & Holldobler 1993; Holldobler, 1985; Boosmam, 2005), em *S. xanthotricha* a espermatogênese ocorre durante a fase de pupa e os machos produzem espermatozóides apenas uma vez

durante a vida. Quando as vesículas seminais se enchem de espermatozóides os testículos entram em processo de degeneração e os machos podem ser considerados sexualmente maduros (Cruz-Landim & Dallacqua 2002; Araújo *et al.*, 2005). Na espécie aqui estudada, os espermatozóides alcançaram as vesículas seminais por volta do quinto dia após a emergência e os testículos estavam quase totalmente degenerados por volta do décimo dia.

A idade na qual os machos de abelhas se encontram sexualmente maduros varia interespecificamente. De acordo com Camargo (1984) em machos haplóides de *Melipona quadrifasciata* os espermatozóides alcançam as vesículas seminais no sétimo dia, mais cedo que em machos diplóides da mesma espécie, nos quais a migração se inicia por volta do nono dia. Os zangões de *Apis mellifera* tornam-se maduros doze dias após a emergência, quando os espermatozóides já migraram para para as vesículas seminais (Snodgrass, 1978). Em *Bombus terrestris* foi verificado que os machos atingem a maturidade sexual, em média, com doze dias (Tasei *et al.*, 1998). Os espermatozóides de *S. xanthotricha* começam a migrar para as vesículas seminais por volta do quinto dia, semelhante ao encontrado em *Melipona mondury*, onde a migração dos espermatozóides se inicia no quarto dia (Maria Augusta Lima Siqueira, informação pessoal).

Algumas características relacionadas ao sucesso de cópula têm sido estudadas em insetos sociais machos (Boomsma, 1996; Bourke & Franks, 1995; Crozier & Page, 1985; Eberhard, 1985; Fjerdingstad, 1997; Holldobler, 1985; Starr, 1984). Em Hymenoptera eussociais os machos têm vida curta e normalmente morrem após uma ou poucas cópulas (Boosmam *et al.*, 2005). Comumente muitos Hymenoptera utilizam as secreções das glândulas acessórias para assegurar fidelidade de cópula da fêmea. As abelhas Meliponini não possuem glândulas acessórias no trato reprodutor dos machos. Entretanto, segundo Araújo *et al.*, (2005) parte do aparelho reprodutor é mantido no trato da fêmea após a cópula, impedindo cópulas subseqüentes, mecanismo similar ao “plug” de cópula usado por machos de meliponídeos (Starr, 1984; Thornhill, 1983; Boosmam *et al.*, 2005).

Em machos maduros as secreções não foram observadas na vesícula seminal, apenas nos ductos deferentes pós-vesiculares. Acredita-se que a composição e viscosidade das secreções, em conjunto, permitem o deslocamento dos espermatozóides através dos ductos (Happ, 1992). Substâncias desta natureza foram também encontradas nas glândulas acessórias de outras abelhas (Blum, 1962; 1967). Provavelmente as secreções ao longo dos ductos deferentes de *S. xanthotricha* tenham função apenas de nutrição e manutenção dos espermatozóides viáveis até cópula, como encontrado para *A. mellifera* (Cruz-Landim & Cruz-Hofling, 1969). Isto

porque a função química de interferir no comportamento reprodutivo da fêmea seria possivelmente, substituída pelo “plug” formado pela retenção do aparelho reprodutor do macho no trato da fêmea após a cópula (Araújo *et al.*, 2005).

Acredita-se que as inclusões ósmio-positivas presentes na base das células epiteliais dos ductos deferentes a partir do oitavo dia não sejam grânulos de secreção devido sua posição e natureza. Segundo Araújo *et al.*, (2005) estas inclusões são figuras mielínicas e podem evidenciar função de espermiófagia pelo epitélio das vesículas seminais, assim como encontrado em indivíduos maduros de *S. xanthotricha* (Araújo *et al.*, 2005), em *Melipona bicolor* (Dallacqua & Cruz Landim, 2003) e na formiga *Camponotus* spp. (Wheeler, 1992). Machos com mais de vinte dias, apresentam os núcleos das células das vesículas seminais com aspecto apoptótico, sugerindo que sugere que este machos podem se tornar incapazes de fecundar após esta idade, possuindo idade mais propícia para tal comportamento entre dez e dezoito dias de idade.

Este trabalho demonstrou que machos de *S. xanthotricha* apresentam grandes modificações morfológicas no epitélio dos ductos deferentes ao longo do processo de maturação sexual. Além disso, permitiu relacionar a idade destes indivíduos com os eventos de espermatogênese, degeneração testicular e maturidade sexual. Como descrito acima, sugerimos que os machos de *S. xanthotricha* atingem a maturidade sexual após o décimo dia de emergência, quando estarão aptos a abandonarem as colônias para possível cópula. Portanto, tentativas de acasalamentos em condições controladas devem ser realizadas com machos a partir dessa idade.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao apoio financeiro do CNPq (Proc. 133580/2003-2, 150296/2003-7) e FAPEMIG.

## Referências Bibliográficas

- Araújo, VA, Zama U, Neves CA, Dolder H, Lino-Neto J (2005) Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science*. *In press*.
- Bancroft JD, Stevens A (1996) *Theory and practice of histological techniques*. 4 ed. Churchill Livingstone: New York, 766p.
- Bishop, GH (1920) Fertilization in the honeybee. I. The male sexual organs: their histological structure and physiological functioning. *J. Exp. Zool.* **31**, 225-265.
- Blum MS, Glowska Z, Tauber III S (1962) Chemistry of the drone honeybee reproductive system. II. Carbohydrates in the reproductive organs and semen. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **55**, 135-139.
- Blum MS, Bumgarner JE, Tauber III S (1967) Composition and possible significance of fatty acids in lipids classes of honeybee serum. *J. Insect. Physiol.* **13**, 1301-1308.
- Boomsma JJ, Ratnieks FLW. 1996. Paternity in eusocial Hymenoptera. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **351**, 947–75
- Bourke AFG, Franks NR. 1995. *Social Evolution in Ants*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. 529 pp.
- Boomsma JJ, Baer B, Heinze J (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 395-420.
- Camargo CA (1984) Spermatozoa numbers and migration to the seminal vesicles in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lep. *J. Api. Res.* **23**, 15-17.
- Chen PS (1984) The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Ann. Rev. Entomol.* **29**, 233-255.
- Colleman S, Drahn B, Petersen G, Stolorov J, Kraus K (1995) A *Drosophila* male accessory gland protein that is a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors is transferred to females during mating. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**, 203-207.
- Crozier RH, Page RE. 1985. On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **18**, 105–150.
- Crozier RH, Pamilo P. 1996. *Evolution of Social Insect Colonies*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 306 pp.

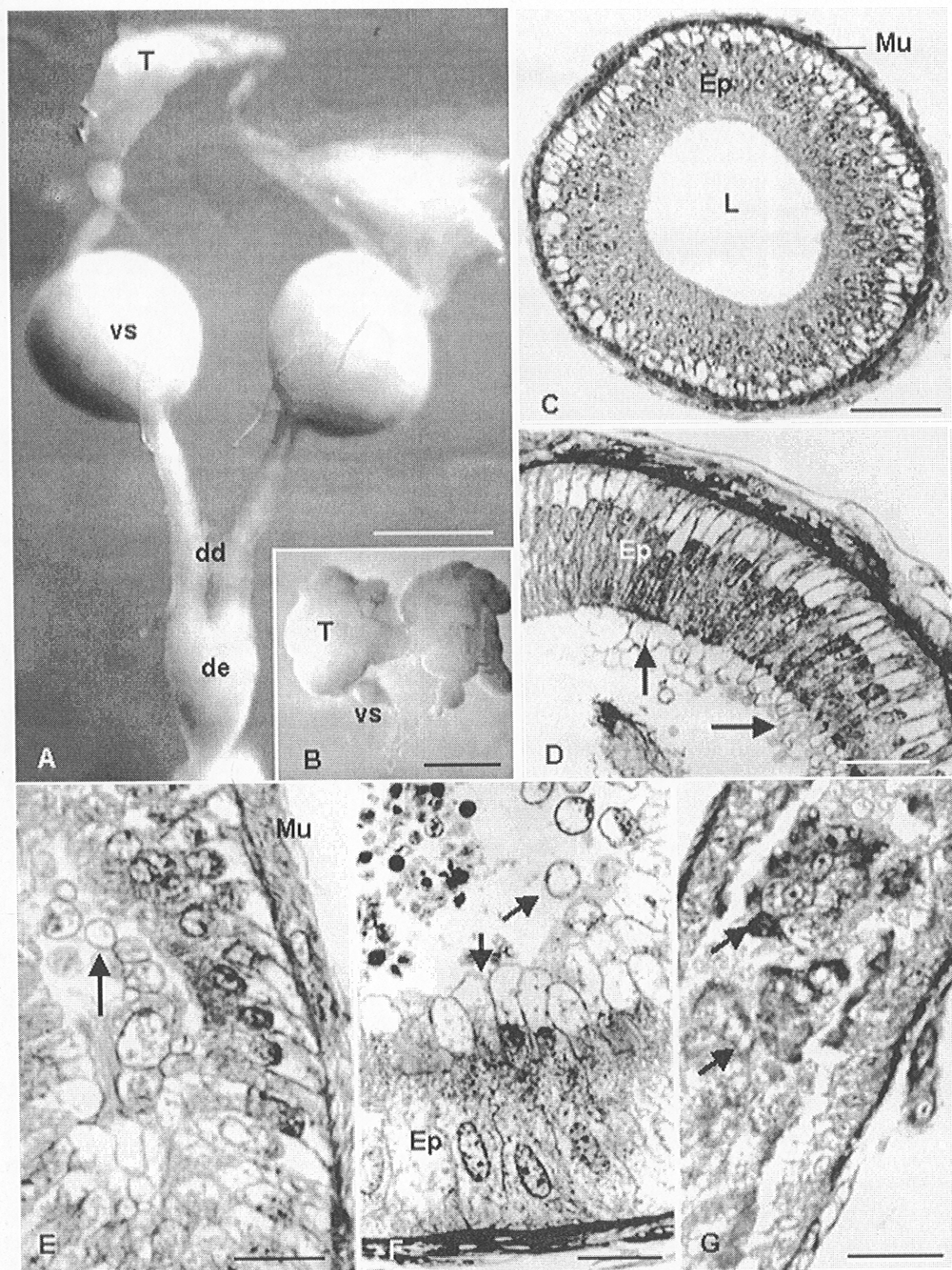
- Cruz-Landim C, Cruz-Hofling MA (1969) Electron microscope observations on honeybee seminal vesicle (*Apis mellifera adansonii*, Hymenoptera, Apidae). *Papéis Avulsos Zool.* (S. Paulo) **14**, 145-151.
- Cruz-Landim C, Dallacqua RP (2002) Testicular reabsorption in adult males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Cytologia.* **67**, 145-151.
- Dallacqua RP, Cruz-Landim C (2003) Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anat. Histol. Embryol.* **32**, 276-281.
- Dumser JB (1980) The regulation of spermatogenesis in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **25**, 341-369.
- Eberhard WG. 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press. 244 pp.
- Fausto AM, Gambellini AR, Taddei AR, Maroli M, Mazzini M (2000) Ultrastructure of the vesicle of *Phlebotomus perniciosus* Newstead (Diptera, Psychodidae). *Tissue Cell.* **32**, 228-237.
- Ferreira A, Abdalla FC, Kerr WE, Cruz-Landim C (2004) Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* **33**, 569-576.
- Fjerdingstad EJ, Boomsma JJ. 1997. Variation in size and sperm content of sexuals in the leafcutter ant *Atta colombica*. *Insectes Soc.* **44**, 209–18
- Gauld ID, Bolton B (1988) *The Hymenoptera*. Oxford, Oxford University.
- Gillott C (2003) Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.* **48**, 163-184.
- Happ GM (1992) Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology.* **37**, 303-320.
- Heinze J, Holldobler B. 1993. Fighting for a harem of queens: physiology of reproduction in *Cardiocondyla* male ants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8412–14.
- Holldobler B, Bartz SH. 1985. Sociobiology of reproduction in ants. See Ref. 65a, pp. 237–57.
- Junqueira LCU, Junqueira MMS (1983) *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Livraria Editora Santos: São Paulo.
- Michener, D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univ. Kansas Sci. Bull.* **54**, 75-164.

- Michener D (2000) *The bees of the world*. Johns Hopkins Univ. Press: Baltimore.
- Moreira J, Zama U, Lino-Neto J (2004) Release, behaviour and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Braz. J. morphol. Sci.* **21**, 185-189.
- Moure JS (1951) Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea). *Dusenía* **5**, 259-286.
- Moure JS (1960) Notes on the types of the neotropical bees described by Fabricius (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomologica* **3**, 97-160.
- Pearse AGE (1985) *Histochemical: Theoretical and Applied*. Churchill Livingstone: Edinburgh.
- Raina AK, Kingam TG, Giebultowicz JM (1994) Mating-induced loss of Sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantra dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **25**, 317-327.
- Roig-Alsina A, Michener CD (1993) Studies of the phylogeny and classification of long tongue bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas. Sci. Bull.* **55**, 123-162.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte.
- Snodgrass RE (1978) *Anatomy of the honeybees*. 3<sup>o</sup> ed., Cornell University Press, Londres, 334p.
- Starr CK. 1984. Sperm competition, kinship and sociality in the aculeate Hymenoptera. In *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, ed. RL Smith, pp. 427-64. London: Academic
- Thornhill R, Alcock J (1983) *The evolution of insect mating systems*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press. 547pp.
- Tasei J, Asano S, Ohtsubo T, Kamomae M, Gotoh T (1998) Relationship between aging, mating and sperm production in captive *Bombus terrestris*. *Journal of Apicultural Research.* **37**, 107-113.
- Viscuso R, Narcisi L, Sottile L (1999) Structure and function of seminal vesicle of Orthoptera Tettigonioidea. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **28**, 169-178.

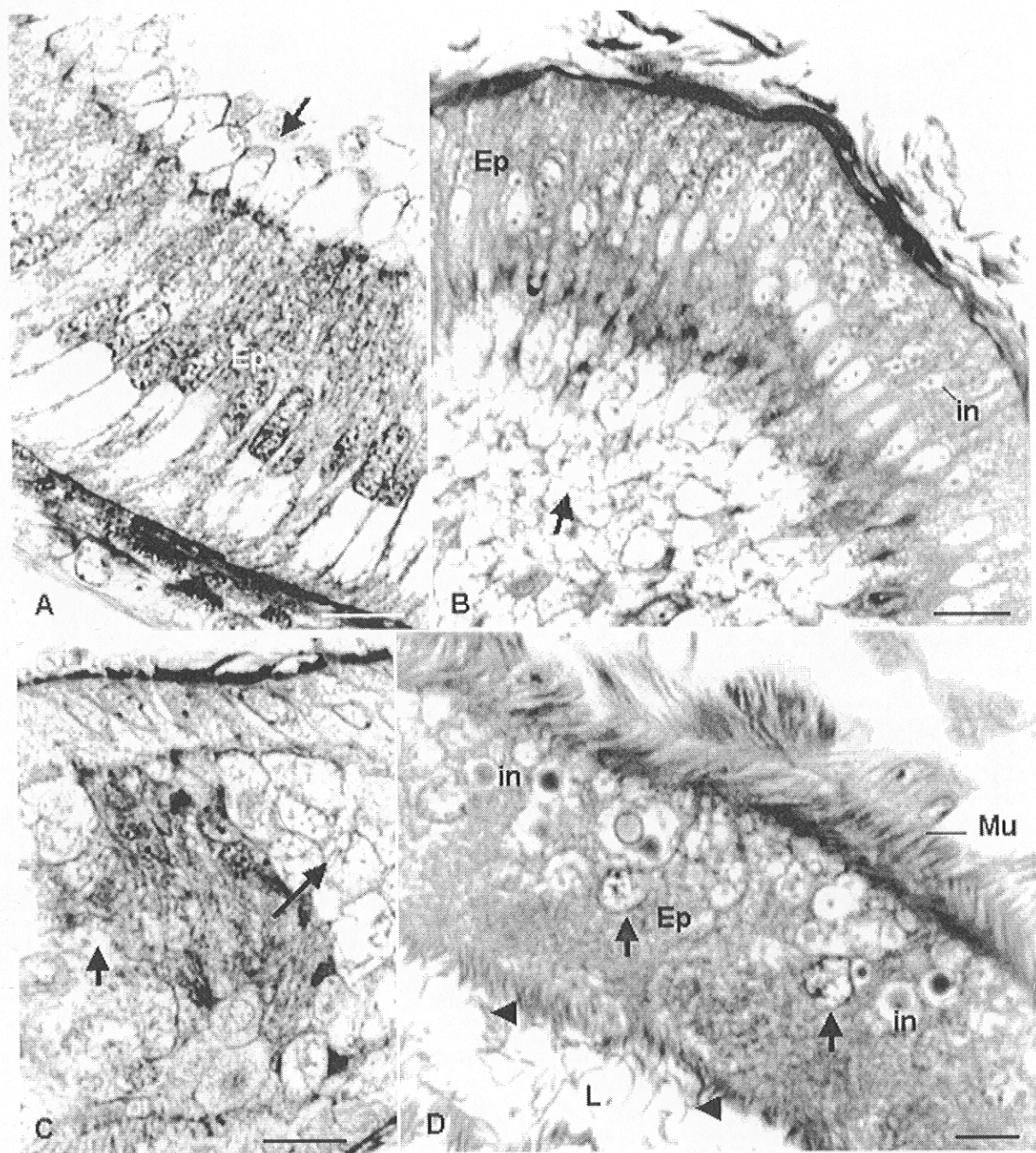
Zama U (2003) Estudo estrutural e ultraestrutural dos espermatozóides nas tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com considerações filogenéticas. PhD thesis. State University of Campinas (UNICAMP), Brazil.

Zama U, Lino-Neto J, Dolder H (2004) Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell*, **36**, 29-41.

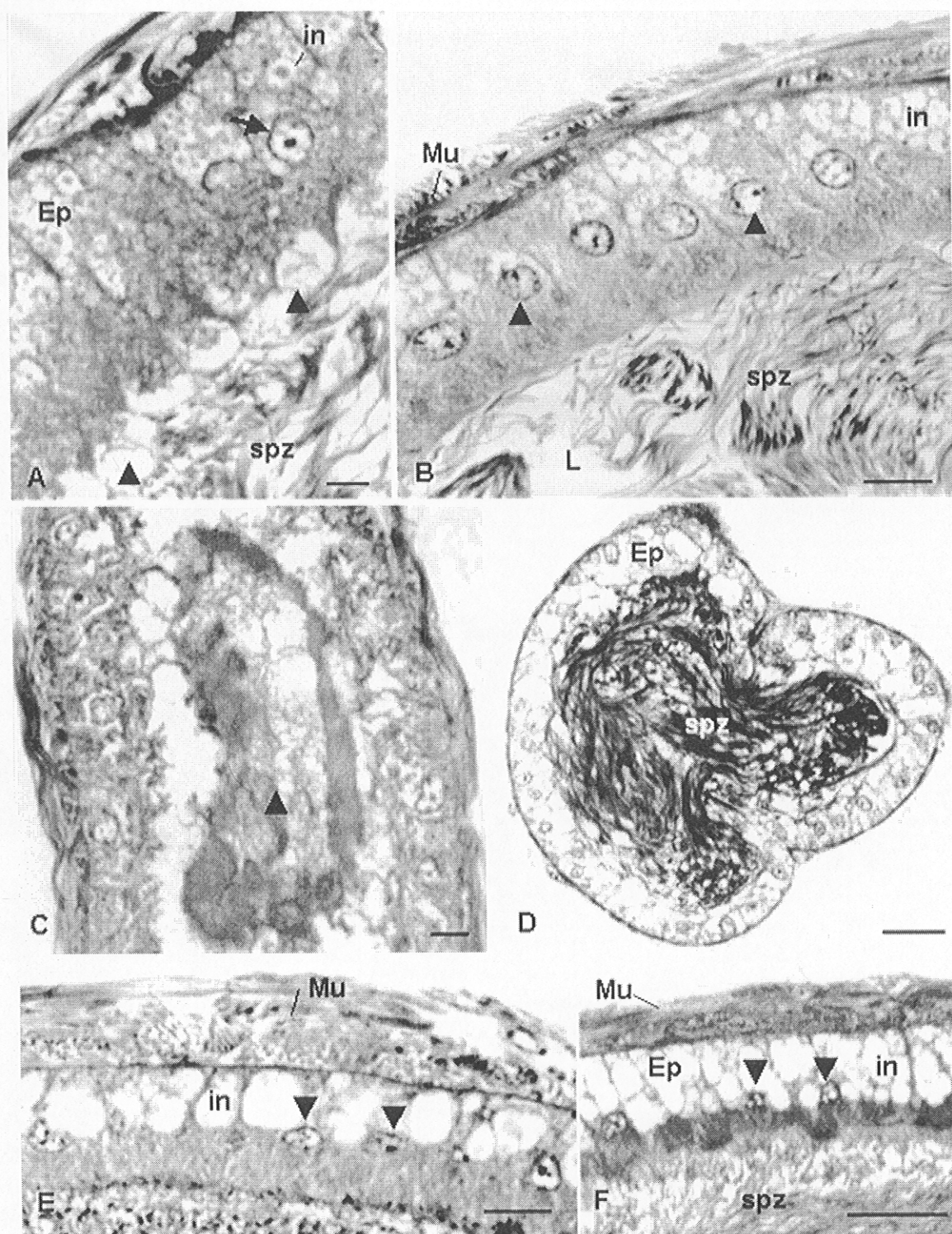
Wheeler DE, Krutzsch PH (1992) Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* **211**, 307-317.



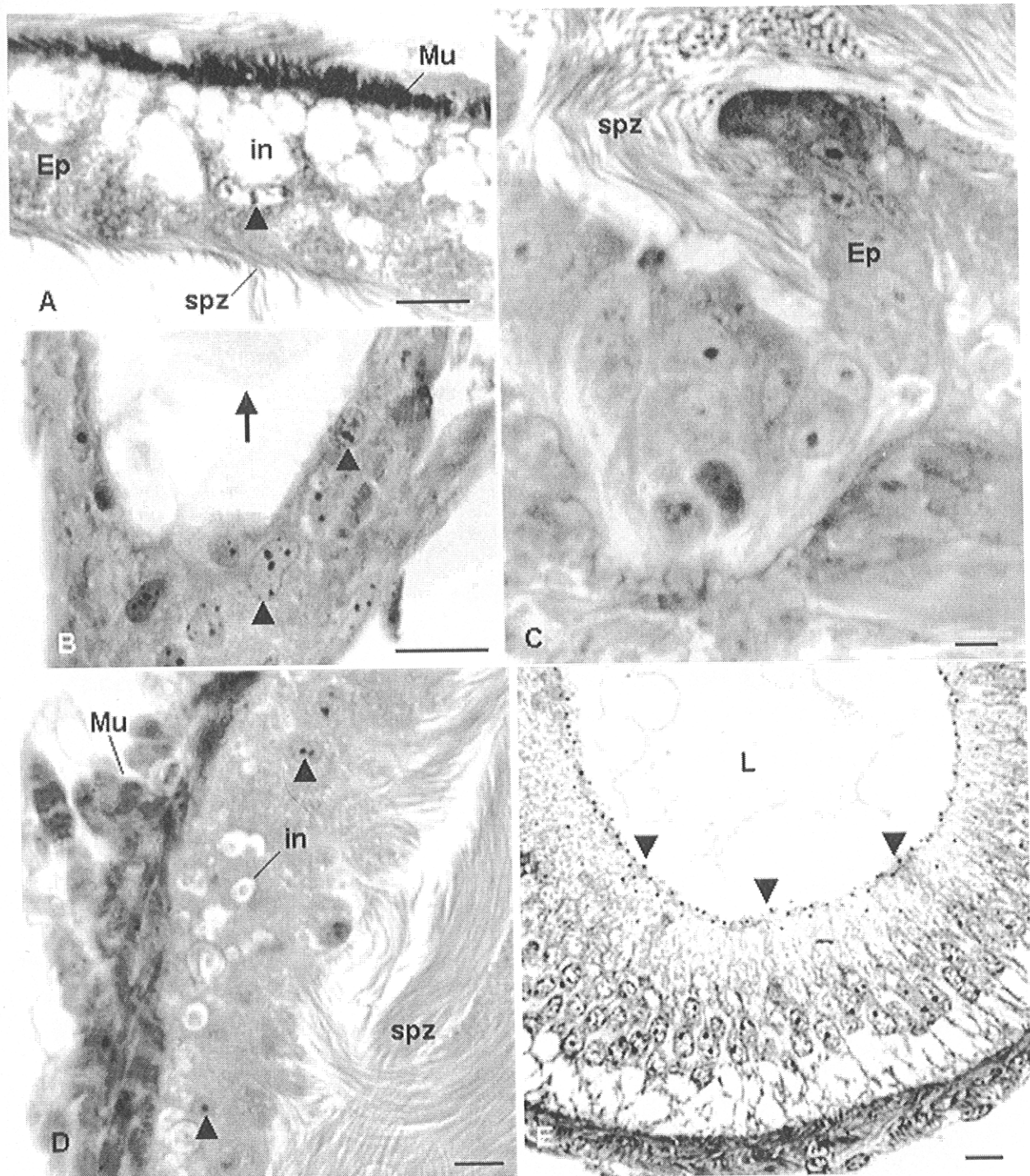
**Figura 1.** Microscopia de luz dos ductos deferentes de *S. xanthotricha*. Sistemas reprodutores em A. Macho maduro mostrando os testículos já degenerados (T), vesículas seminais (vs), ductos deferentes (dd) e ducto ejaculatório (de). B. Pupa de olho preto, nota-se os testículos desenvolvidos (T) e as vesículas seminais vazias (vs). C. Em pupa de olho rosa, mostrando o lúmen da vesícula seminal vazio (L), em D observa-se o epitélio composto por células prismáticas e altas e secreção apócrina (seta). E. Em pupas de olhos pretos e corpo não pigmentado nota-se secreção no lúmen dos ductos deferentes pós-vesiculares (seta) e em F nas vesículas seminais (seta). G. Pupas de olho preto e corpo pigmentado, mostrando a presença de diferentes secreções nos ductos deferentes pós-vesiculares (setas). T = testículo; vs = vesícula seminal; dd = ductos deferentes; de = ducto ejaculatório; L = lúmen; Mu = camada muscular; ep = epitélio. Barras: A e C-G = 500  $\mu$ m; B = 50  $\mu$ m.



**Figura 2.** Microscopia de luz, mostrando cortes transversais das vesículas seminais e dos ductos deferentes pós-vesiculares de *S. xanthotricha*. **A-** Pupa de olho preto e corpo pigmentado, mostrando o epitélio da vesícula seminal (ep) composto por células prismáticas altas e o ápice liberando secreções tipo apócrina (seta). **B-** Machos com três dias de vida, mostrando que nesta fase começa a aparecer inclusões na base do epitélio (in). **C-** Secreções ocupando todo o lúmen dos ductos deferentes pós-vesiculares (seta). **D-** Machos com cinco dias de vida, observa-se que o epitélio torna-se mais baixo composto por células cúbicas, os núcleos ocupam o terço basal (seta) e microvilosidades na borda do epitélio (cabeça de seta). Ep= epitélio; in = inclusões; Mu = músculo; L = lúmen. Barras = 500  $\mu$ m.



**Figura 3.** Microscopia de luz, mostrando cortes transversais dos ductos deferentes de *S. xanthotricha*. **A-** Machos com cinco dias, nota-se presença de espermatozoides na vesícula seminal (spz) e de secreção tipo apócrina no ápice do seu epitélio (cabeça de seta) e os núcleos (seta) e as inclusões (in) na base, em **B** a vesícula já preenchida por espermatozoides (spz); o epitélio toma-se ainda mais baixo, com núcleos esféricos (cabeça de seta) e várias inclusões ocupam a região basal (in). **C-** Ductos deferentes pós-vesiculares mostrando secreções no lúmen (cabeça de seta). **D-** Ducto deferente pré-vesicular, mostrando a migração dos espermatozoides (spz). **E-D-** Machos entre oito e dez dias mostrando que nesta fase os núcleos do epitélio das vesículas seminais (cabeças de setas) são espremidos por grandes e numerosas inclusões (in). Ep= epitélio; in = inclusões; Mu = músculo; L = lúmen; spz = espermatozoides. Barras = 500  $\mu$ m.



**Figura 4.** Microscopia de luz, mostrando cortes transversais dos ductos deferentes de *S. xanthotricha*. **A-** Machos maduros, mostrando que o epitélio da vesícula seminal é baixo (ep) e os núcleos (cabeça de seta) parecem serem englobados por grandes inclusões (in). **B-** Ductos deferentes pós-vesiculares em machos com 22 dias, mostrando que nesta idade ainda há secreção no lúmen dos ductos (seta) e os núcleos do epitélio estão com aspecto de apoptose (cabeça de seta). **C-** Ainda nesta fase, alguns feixes de espermatozoides (spz) são vistos formando profundas inserções no epitélio das vesículas seminais (ep). **D-** Machos com mais de 20 dias mostrando que os núcleos das células epiteliais dos ductos deferentes apresentam aspecto de apoptose (cabeça de seta) a região basal do epitélio possui muitas inclusões (in). **E-** Pupas de olho preto, mostrando que o teste de PAS para detecção de glicogênio (cabeça de seta) foi positivo no epitélio da vesícula seminal nesta fase. Ep= epitélio; in = inclusões; Mu = músculo; spz = espermatozoides. Barras = 500  $\mu$ m.

**3.3.** Araújo, V. A., Zama, U., Neves, C. A., Dolder, H. & Lino-Neto, J. 2005. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Brazilian Journal Morphological Sciences. *In press*.

## **Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).**

Vinícius Albano Araújo, Uyrá Zama, Clóvis Andrade Neves, Heidi Dolder and José Lino-Neto

**Abstract.** The reproductive system of the Meliponini male may be distinguished from that of other bees by the absence of accessories glands. We hypothesized that other cells of the reproductive tract have taken over their secretory function. In this study, we investigate the structure, ultrastructure and histochemistry of the seminal vesicle in mature males of the stingless bee *Scaptotrigona xanthotricha* in search of a possible secretory activity. The simple cubical epithelium has many vesicular inclusions in its basal region. However, these inclusions are not typical of secretory vesicles. On the contrary, they contain membranous structures similar to myelinic figures. Also, some spermatozoa are observed next to these inclusions and the basal membrane, which suggests a spermiophagic activity. Despite the fact that spermatozoa of the seminal vesicle are immersed in a diffuse material, we conclude that, the epithelial cells of this organ of the mature male show no morphological evidence of a secretory function.

**Key words:** morphology, reproductive system, stingless bees and myelinic figures.

### **Introduction**

Generally, the male reproductive system of bees, as in most insects, is made up of a pair of testes connected to an aedeagus by the genital ducts. These are partially differentiated into seminal vesicles and frequently associated to accessories glands. Despite of this model, morphophysiological studies that compare the reproductive apparatus in different bee families including sperm ultra structure suggest that these furnish sufficient variations to support a systematical analysis for this group [2,4,7,12,17,19-22,25,32,34,40,43-47].

Most insects have accessories glands emptying into their reproductive tracts and their secretions act as chemical signs that can affect the females in various ways. For example, they can make up the spermatophore, which induces and accelerates oviposition, controlling polygamy and forming a mating plug [8,14-15,25,27,28,37,38]. However, these glands are lacking in meliponini [25].

The seminal vesicles in bees are usually the principal sites of spermatozoa storage after their transference from the testes as spermatodesmata bundles [34]. As the males become sexually mature, the spermatozoa bundles are released and only

free spermatozoa were found, completely occupying the seminal vesicle [34]. The seminal vesicle in many insects does not appear to produce secretions. However, in some cases, such as in Orthoptera, the epithelium has a typical secretory cell ultrastructure, and its product substitutes that of the accessory glands [16,24]. Considering the Meliponini bees, only one species, *Melipona bicolor bicolor*, has been investigated as to the details of the reproductive tract ducts (including the seminal vesicle) [21].

In this study we examine the histology and ultrastructure of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* and its response to some histochemical treatments to obtain a better understanding of the functional significance of this structure in the reproductive biology of Meliponini bees.

## **Material and Methods**

Eight sexually mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* were used, obtained from colonies maintained in the Central Apiary of the Federal University of Viçosa, MG, Brazil. The males were collected from clusters formed near their colony, following the typical behavior for its species during its reproductive period, whereby they can be identified as sexually mature males.

### ***Light Microscopy***

The seminal vesicles were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub>. The pieces were dehydrated and embedded in Histoiresin<sup>®</sup>. Semi-thin sections were stained with toluidine blue and photographed.

To reveal the nucleus, some of these preparations were stained for 15 min. with 0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in sodium phosphate buffer saline. They were examined with an epifluorescence microscope (Olympus, BX-60), with a BP360-370nm excitation filter.

### ***Histochemistry***

The seminal vesicles were fixed in 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and embedded in Histoiresin<sup>®</sup>.

Semi-thin sections were submitted to histochemical tests for the detection of proteins: Mercury Bromophenol Blue [36], polysaccharides: PAS [29], alkaline and acid phosphatase [6]: For these two last methods, sections were incubated for 6 hours in 0.32% sodium  $\beta$ -glicerophosphate and 2% lead nitrate in 0.05 M sodium acetate buffer at pH 5. Next, they were treated in 1% ammonium sulfide, washed and counter stained with hematoxylin. To test for alkaline phosphatase activity, sections were incubated for 6 hours in 0.5% sodium  $\beta$ -glicerophosphate, 1% lead nitrate, 0.025% manganese chloride in 0.05% veronal buffer at pH 9.2. The sections were then treated in a 2% cobalt nitrate solution, washed, immersed in 1% ammonium sulfide and counter stained with hematoxylin. The methods to show phosphatase activity were adapted from Gomori's method [6]. A control group accompanied all the tests.

### ***Transmission Electron Microscopy (TEM)***

The seminal vesicles were fixed for 3h in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid, 3% sucrose and 5 mM  $\text{CaCl}_2$  in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. The materials were post-fixed in 1%  $\text{OsO}_4$ , dehydrated in acetone and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with 0.1% uranyl acetate and 0.01% lead citrate and were observed in a Zeiss Leo 906 transmission electron microscope.

## **Results**

The internal reproductive system of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* is characterized by a pair of degenerated testes extremely reduced in volume and by a pair of deferent ducts that empty into the ejaculatory duct. In the deferent duct, a region proximal to the testis expands to form the seminal vesicle. The seminal vesicles have a spherical shape and measure about 450  $\mu\text{m}$  in diameter (Fig. 1A). The seminal vesicle did not vary among the sample of males investigated. It is made up of an external wall with a simple epithelium on the basement membrane, followed by a muscle sheath. The lumen contains free swimming spermatozoa (Figs. 1 A-B).

### ***Seminal vesicle epithelium***

In mature males, the seminal vesicle epithelium is thin and composed of a monolayer of cubical cells (Figs. 1B; 2A) on a thick basement membrane (Figs. 2C, 3A, C). These epithelial cells are polarized and the luminal surface is differentiated into microvilli-like projections (asterisk in Figs. 2A, 4B and arrows in Fig. 4C), frequently

observed contacting the spermatozoa (Figs. 2A, D, 4C). This epithelium also presents specialized junctions that are desmosome-like (square in Figs. 2C, 3A, 4B). Junctions are more evident at the membrane interdigitations where septate junctions were identified (Fig. 3D).

The apical third portion of the epithelial cell is especially rich in mitochondria with an electron dense matrix and deep cristae (Figs. 2A,C,D, 4B,C). The middle and basal third portions present the usual cellular organelles, including some mitochondria, the nucleus and prominent inclusions (see Figs. 2B, 3A,B, 4A,C,D).

The nucleus is observed in the middle portion and varies from circular to irregular in shape, and sometimes it seems to be slightly compressed by the inclusions (Figs. 1B, 2A, C, 3C, 4B). The nuclear location and shape are clearly observed with DAPI staining (arrowheads in the Fig. 1C). The vesicular-like inclusions occupy the middle and the basal portions of the cell, generally below the nucleus, and can be clearly distinguished in both light (Figs. 1A-B, 4A) and electron micrographs (2A-D, 3A-C, 4B).

The origin of these inclusions is unclear. However, the bigger inclusions seem to increase by the association and fusion of smaller ones (asterisks in the Fig. 2C). The inclusions vary in size (Figs. 2A, C), and sometimes occupy most of the cytoplasm (Figs. 2D). The inclusion content also varies in aspect; light microscopy shows an opaque heterogeneous content (Figs. 1B, 4A). TEM reveals inclusions containing loose filaments varying to multilayer myelin-like figures (Figs. 3A-C), and frequently presents dense corpuscles and spermatozoa (arrows in the Figs. 3A-B). The histochemical tests applied to reveal proteins, carbohydrates and phosphatase activity were negative for the contents of the inclusions, however this content was osmium-positive. The histochemical test for proteins was negative for the inclusions although it stained other cellular features such as nuclei and cytoplasm. PAS staining for carbohydrates was positive for the brush border, for example, but did not indicate the presence of carbohydrates in the inclusions. Acid phosphatase and DAPI staining also did not mark these structures and only osmium gave a strong positive reaction.

The muscular sheath is thick, consisting in voluminous fibers, which can be observed simultaneously sectioned along their longitudinal and transverse axes (Figs. 1A-B, 2A-C, 3A). Beyond the muscular sheath is a conjunctive capsule, surrounding the organ (Figs. 2A-B).

### ***The lumen***

The luminal region is full of spermatozoa (Figs. 1A-C, 4D) immersed in an electron dense material. In the mature male, the majority of the spermatozoa is free swimming,

and can be observed sectioned at different levels (see the numerical sequence in Fig. 4D). However, some sperm bundles can eventually be seen in depressions of the epithelium (Figs. 4A-B). The greater thickness of the light micrograph shows the thickness of these bundles (Fig.4A). These bundles form deep insertions that remain external to the epithelial cell, separated by the plasma membrane (arrow, Fig. 4B).

## Discussion

The male reproductive system of *S. xanthotricha* is similar to that observed in other Meliponini [21,25]. According to Ferreira *et al.* [25], the male reproductive apparatus in bees (51 species representing 6 families) can be classified in at least four patterns, i.e. Types I, II, III and IV. The Type IV is present exclusively in the Meliponini, and is characterized by the absence of accessory glands and by the large seminal vesicles that have a much wider diameter than the deferent duct [25]. This type also has four follicles (called seminiferous tubules, according to the authors) per testis and the seminal vesicles form globular units that are encapsulated by the scrotal membrane [25]. Within the Meliponini, the reproductive apparatuses follow a basic pattern, but have small species-specific variations such as in the dimension of their structures. The degenerating testis found in the specimens investigated showed that they were sexually mature and that these species, as occurs in most social insects [11,23], produce spermatozoa only once, during their sexual maturation.

In the insects, the accessory glands have an important role in reproductive processes. Some functions have been attributed to their secretions, e.g. the spermatophore formation; spermatozoa maturation and activation; induction and acceleration of oviposition; control of polygamy and mating plug formation [1,8,14-15,28,37]. Male bumble bees deposit mating plugs, which effectively prevent intromission by subsequent males and demotivate queens to continue sexual activity [3]. Similar mating plugs occur in fire ants [33] and most likely in fungus-growing ants [5]. Since male sandflies lack male accessory reproductive glands, the plug is presumably produced by the seminal vesicles [24]. In Meliponini, the reproductive tract of the male, left behind after copulation, acts as a mating plug. This means that there is no necessity of accessory glands and their secretions to impede future matings.

Various kinds of secretions are produced by the epithelial cells along the reproductive tract and are mixed with the spermatozoa to form semen [27]. Nonetheless, the epithelial cells of the seminal vesicle in mature males of *S. xanthotricha*, as in the *Melipona bicolor* [21], do not present the morphological features of secretory cells. This feature has been found in some insect groups where the

vesicular epithelium has an ultrastructure typical of a secretory cell, and its products support functions typical of the accessory glands [13,16,18,26,30-31,38-39]. Therefore, in *S. xanthotricha*, as in *Melipona bicolor* [21], the amorphous material in which the spermatozoa are immersed may be produced by cells of other regions of the vas deferens, or even by the seminal vesicle during the previous phase of sexual maturation.

According to some researchers, an association between the mating plug and monoandry of the queens suggests that the males control copulation [11, 41, 42]. Therefore the retaining of the male reproductive tracts by the female could be considered a secondary development pattern for males to control mating.

The prominent inclusions observed in the Meliponini, *S. xanthotricha* and *M. bicolor* [21] are very similar to those observed in ants *Camponotus* spp. [47]. However, in these ants the inclusions are smaller and disposed at random in the cells. Various characteristics observed indicate that these inclusions are not secretory vesicles, for example: (1) these inclusions, specially in bees, are located at the basal region of the cell, below the nuclear site, while secretory vesicles are smaller and, in general, occur in larger number above the nucleus, near the cellular apices; and (2) the inclusions' content does not respond positively the histochemical tests applied, which would reveal proteins and carbohydrates, substances commonly found in accessory glands of other bees [9-10]. These findings suggest that in Meliponini, the seminal vesicles of mature males do not substitute the accessory glands but only serve to store spermatozoa until mating occurs.

However, the inclusions were contrasted by osmium tetroxide, which revealed their lipid composition and, at the transmission electron microscope, a membranous organization, similar to myelin figures was found. The presence of these myelin figures is frequently interpreted as resulting from autophagy in elderly cell and/or spermiophagy [21,43,47]. We believe that our observations in *S. xanthotricha* corroborate this hypothesis, by the presence of granular electron-dense material and spermatozoa inside these inclusions. However, we could not detect the acid phosphatase activity, which would be indicative of enzymatic digestion (lysosomes), nor DAPI staining which would show the presence of sperm in larger numbers. Cruz-Landim and Dallacqua [20] also reported the occurrence of numerous myelin figures in the testis of *M. bicolor* during testicular degeneration. Since the seminal vesicle at sexual maturity is in its final stages of activity, the presence of large deposits is not unusual and efficient lysosomal activity is probably no longer necessary.

The abundance of mitochondria in the apical portion of the epithelium of the seminal vesicles indicates a high metabolic activity for these cells, especially in this

portion of the cell. This pattern was also found in *M. bicolor* [21], *Apis mellifera* [17] and *Camponotus* [47] and, according to the above authors, the abundance of this organelle is related, among other functions, to the regulation of lumen pH.

The absence of secretory activity in the seminal vesicle of sexually mature Meliponini adults has been reported only in *M. bicolor* [21], a finding that was corroborated by this research in another Meliponini, to which histochemical support for the results has been added.

### **Acknowledgments**

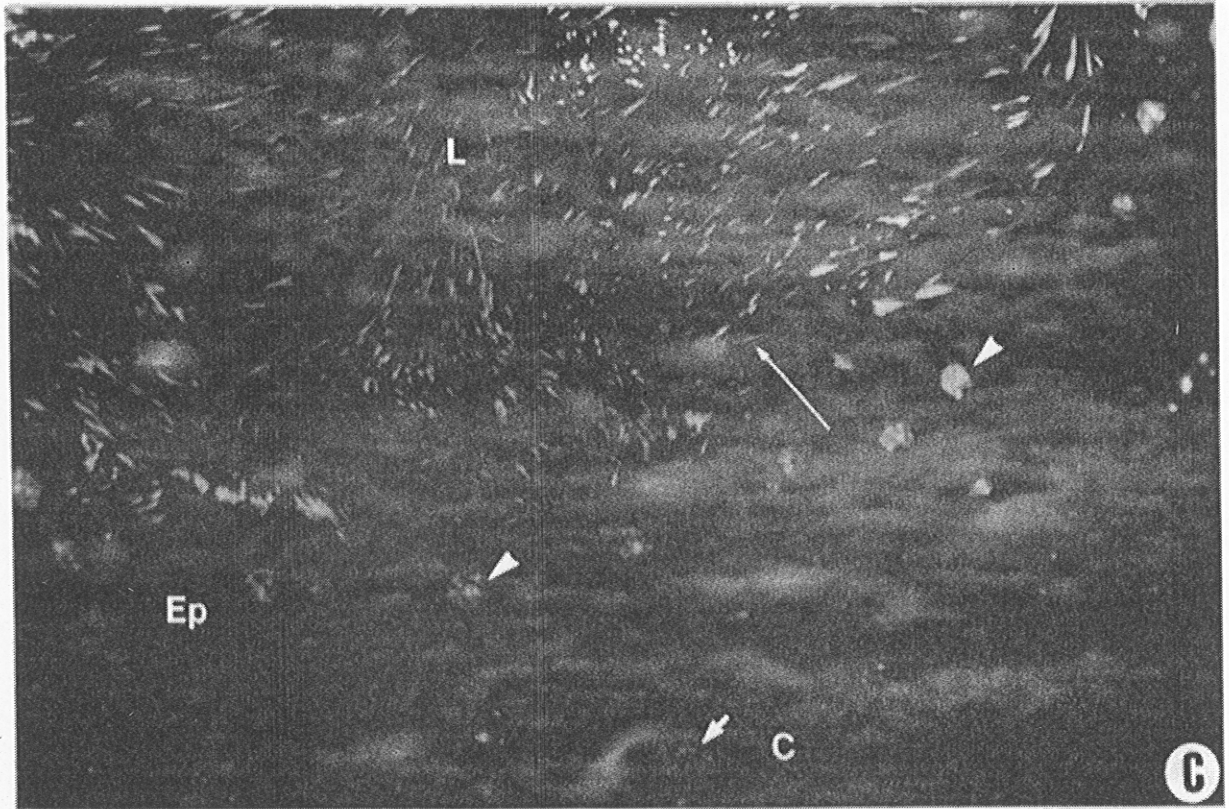
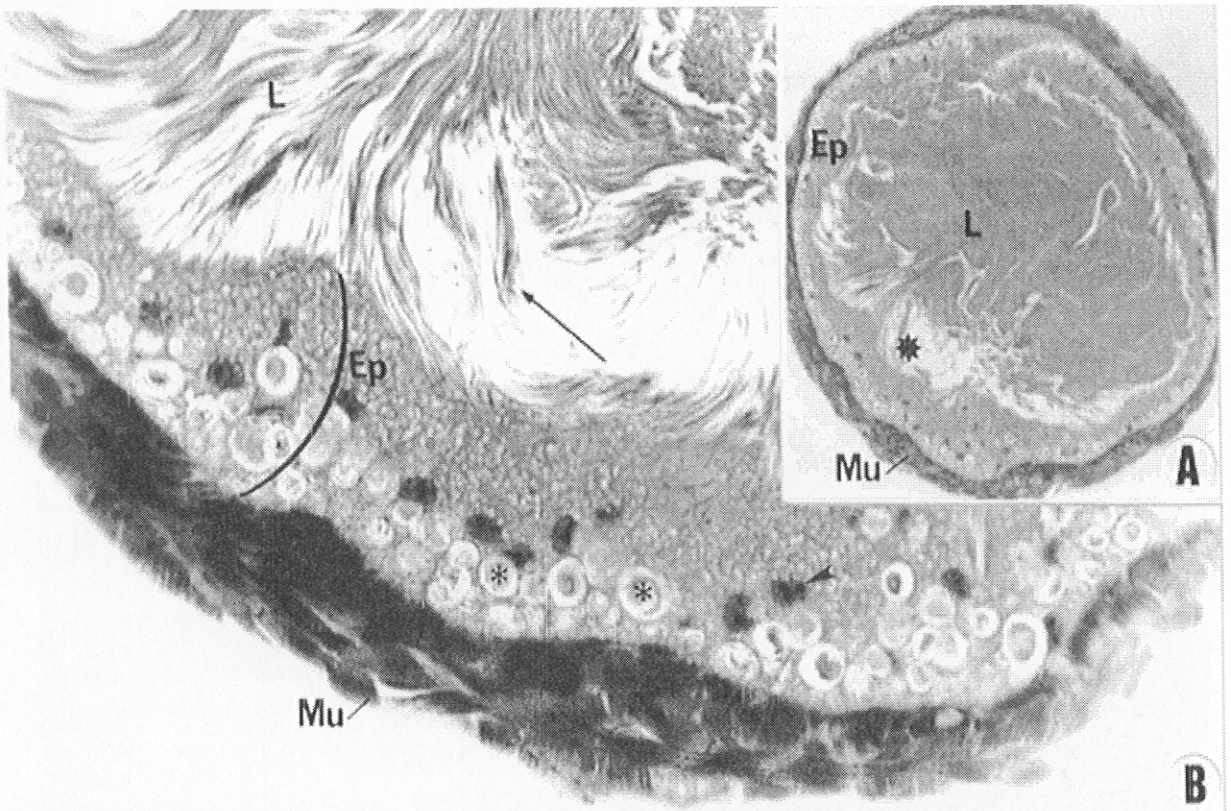
The authors thank Dr. Lúcio A. O. Campos (Department of General Biology, UFV) for supplying the insects. This work was supported by CNPq (Proc. 133580/2003-2, 150296/2003-7) and FAPESP (Proc. 2003/09354-8).

## References

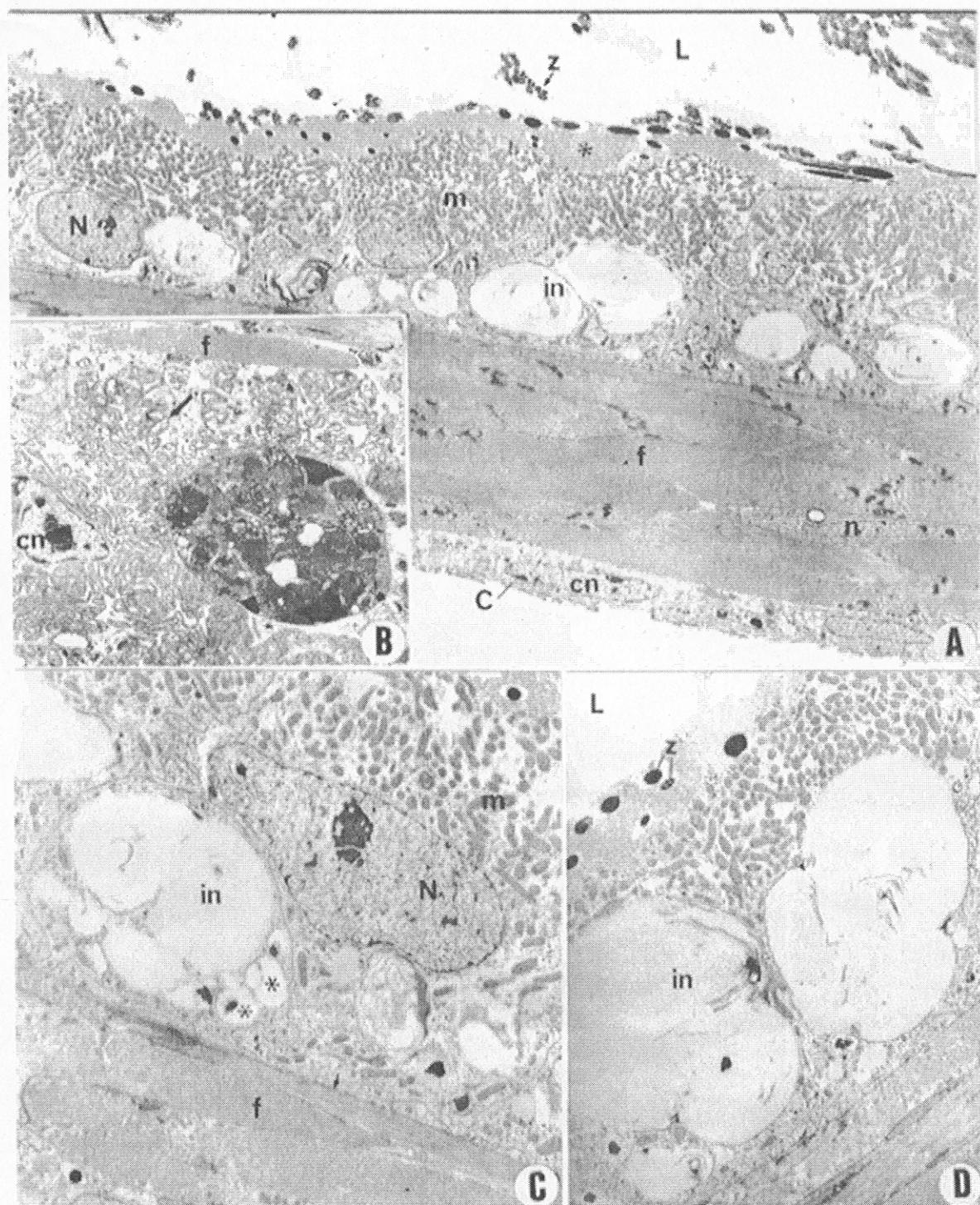
1. Allard D, Gobin B, Ito F, Tsuji K, Billen J (2002) Sperm transfer in the Japanese queenless ant *Diacamma* sp. (Hymenoptera: *Formicidae*). *Neth. J. Zool.* **52**, 77-86.
2. Baer B, Schmid-Hempel P (1999) Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumblebee. *Nature.* **397**, 151-154.
3. Baer B, Maile R, Schmid-Hempel P, Morgan ED, Jones GR (2000) Chemistry of a mating plug in bumblebees. *J. Chem. Ecol.* **26**, 1869-75.
4. Baer B, Schmid-Hempel P, Høeg JT, Boomsma JJ (2003) Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insect. Soc.* **50**, 101-108.
5. Baer B, Boomsma JJ (2004) Male reproductive investment and queen mating frequency in fungus growing ants. *Behav.Ecol.* **15**, 426-32.
6. Bancroft JD, Stevens A (1996) *Theory and practice of histological techniques*. 4 ed. Churchill Livingstone: New York, 766p.
7. Báo SN, Gonçalves-Simões D, Lino-Neto J (2004) Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener & Moures 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **36**, 23-28
8. Bishop, GH (1920) Fertilization in the honeybee. I. The male sexual organs: their histological structure and physiological functioning. *J. Exp. Zool.* **31**, 225-265.
9. Blum MS, Głowska Z, Tauber III S (1962) Chemistry of the drone honeybee reproductive system. II. Carbohydrates in the reproductive organs and semen. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **55**, 135-139.
10. Blum MS, Bumgarner JE, Tauber III S (1967) Composition and possible significance of fatty acids in lipid classes of honeybee serum. *J. Insect. Physiol.* **13**, 1301-1308.
11. Boomsma JJ, Baer B, Heinze J (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 395-420.
12. Camargo CA (1984) Spermatozoa numbers and migration to the seminal vesicles in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lep. *J. Api. Res.* **23**, 15-17.
13. Cantacuzene AM (1972) Recherches morphologiques sur les glandes annexes males orthopteres. IV. Ultrastructure de la vesicle seminale de *Locusta migratoria migratoides*. L. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* **14**, 389-410.
14. Chen PS (1984) The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Ann. Rev. Entomol.* **29**, 233-255.
15. Coleman S, Drahn B, Petersen G, Stolorov J, Kraus K (1995) A Drosophila male accessory gland protein that is a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors is transferred to females during mating. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**, 203-207.
16. Couche CA, Gillot C (1988) Development of secretory activity in the seminal vesicle of the male migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **17**, 51-61.

17. Cruz-Landim C, Cruz-Hofling MA (1969) Electron microscope observations on honeybee seminal vesicle (*Apis mellifera adansonii*, Hymenoptera, Apidae). *Papéis Avulsos Zool.* (S. Paulo) **14**, 145-151.
18. Cruz-Landim C, Ferreira A (1977) Spermatophore formation in *Conocephalus saltator* (Saussure) (Orthoptera: Conocephalidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **6**, 97-104.
19. Cruz-Landim C (2001) Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia Sér. Zool.* 183-189.
20. Cruz-Landim C, Dallacqua RP (2002) Testicular reabsorption in adult males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Cytologia.* **67**, 145-151.
21. Dallacqua RP, Cruz-Landim C (2003) Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anat. Histol. Embryol.* **32**, 276-281.
22. Duchateau MJ, Marien J (1995) Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Insect. Soc.* **42**, 255-266.
23. Dumser JB (1980) The regulation of spermatogenesis in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **25**, 341-369.
24. Fausto AM, Gambellini AR, Taddei AR, Maroli M, Mazzini M (2000) Ultrastructure of the vesicle of *Phlebotomus perniciosus* Newstead (Diptera, Psychodidae). *Tissue Cell.* **32**, 228-237.
25. Ferreira A, Abdalla FC, Kerr WE, Cruz-Landim C (2004) Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* **33**, 569-576.
26. Gillot, C, Friedel T (1976) Development of accessory reproductive glands and its control by the corpus allatum in adult male *Melonoplus sanguinipes*. *J. Insect Physiol.* **22**, 365-372.
27. Gillot, C (1988) Arthropoda - Insecta. In: *Reproductive Biology of Invertebrates* (K. G. Adiyodi and R.G. Adiyodi eds) New York Wiley. **3**, 319-371.
28. Gillott C (2003) Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.* **48**, 163-184.
29. Junqueira LCU, Junqueira MMS (1983) *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Livraria Editora Santos: São Paulo.
30. Kokwaro ED (1982) Ultrastructure of the male accessory reproductive glands, spermatophore and spermatheca of the tse, glossina morsitans Westwood. In: *The structure and functioning of insect cells*. Society for Insects Cells (Akai, H; R. C. King & Morokoshi, eds). Tokyo: Plenum Publishing Corporation. 53-56.
31. Lai-Fook J (1982) The vasa deferentia of the male reproductive system of *Calpododes ethlius* (Hesperidae, Lepidoptera). *Can. J. Zool.* **60**, 1172-1183.
32. Lino-Neto J, Bão SN, Dolder H (2000) Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell.* **32**, 322-327.
33. Mikheyev AS (2003) Evidence for mating plugs in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Insectes Soc.* **50**, 401-2.

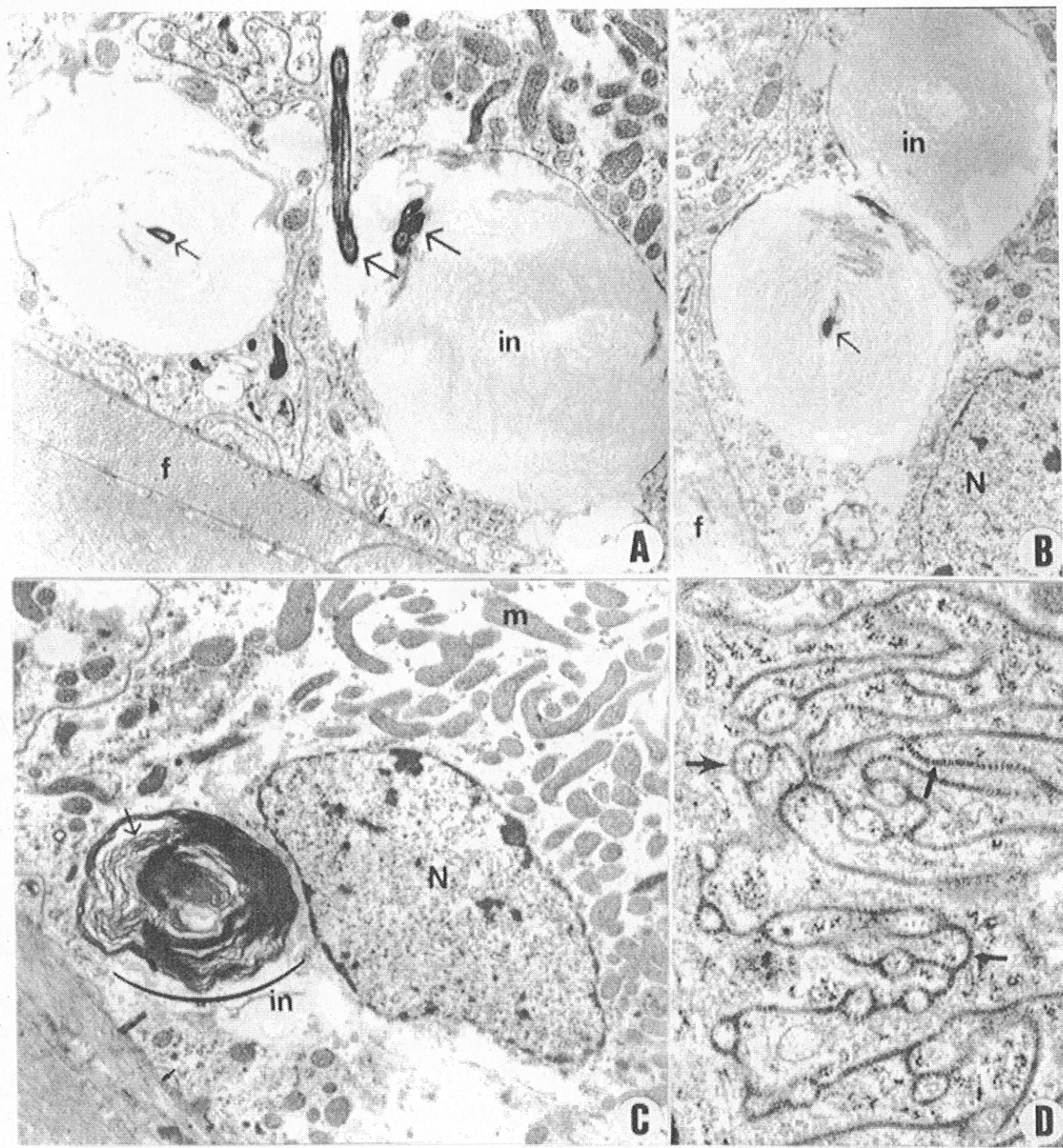
34. Moreira J, Zama U, Lino-Neto J (2004) Release, behaviour and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Braz. J. morphol. Sci.* **21**, 185-189.
35. Paxton RJ (2000) Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. *Insectes Soc.* **47**, 63-69.
36. Pearse AGE (1985) *Histochemical: Theoretical and Applied*. Churchill Livingstone: Edinburgh.
37. Raina AK, Kingam TG, Giebultowicz JM (1994) Mating-induced loss of Sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantra dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **25**, 317-327.
38. Riemann JG (1973) Ultrastructure of the ejaculatory duct region producing the male housefly accessory material. *J. Insect Physiol.* **19**, 213-223.
39. Riemann, JG, Thorson BJ (1976) Ultrastructure of the vasa deferentia of the mediteranian flour moth. *J. Morphol.* **149**, 483-506.
40. Roig-Alsina A, Michener CD (1993) Studies of the phylogeny and classification of long tongue bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas. Sci. Bull.* **55**, 123-162.
41. Starr CK (1984) Sperm competition, kinship and sociality in the aculeate Hymenoptera. In *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, ed. RL Smith, pp. 427-64. London: Academic.
42. Thornhill R, Alcock J (1983) *The evolution of insect mating systems*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press. 547pp.
43. Viscuso R, Narcisi L, Sottile L (1999) Structure and function of seminal vesicle of Orthoptera Tettigonioidea. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **28**, 169-178.
44. 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.
45. Zama U, Lino-Neto J, Dolder H (2004) Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell.* **36**, 29-41.
46. Zama U, Lino-Neto J, Melo SM, Campos LAO, Dolder H (2005) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.* **52**, (2). (*in press*).
47. Wheeler DE, Krutzsch PH (1992) Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* **211**, 307-317.



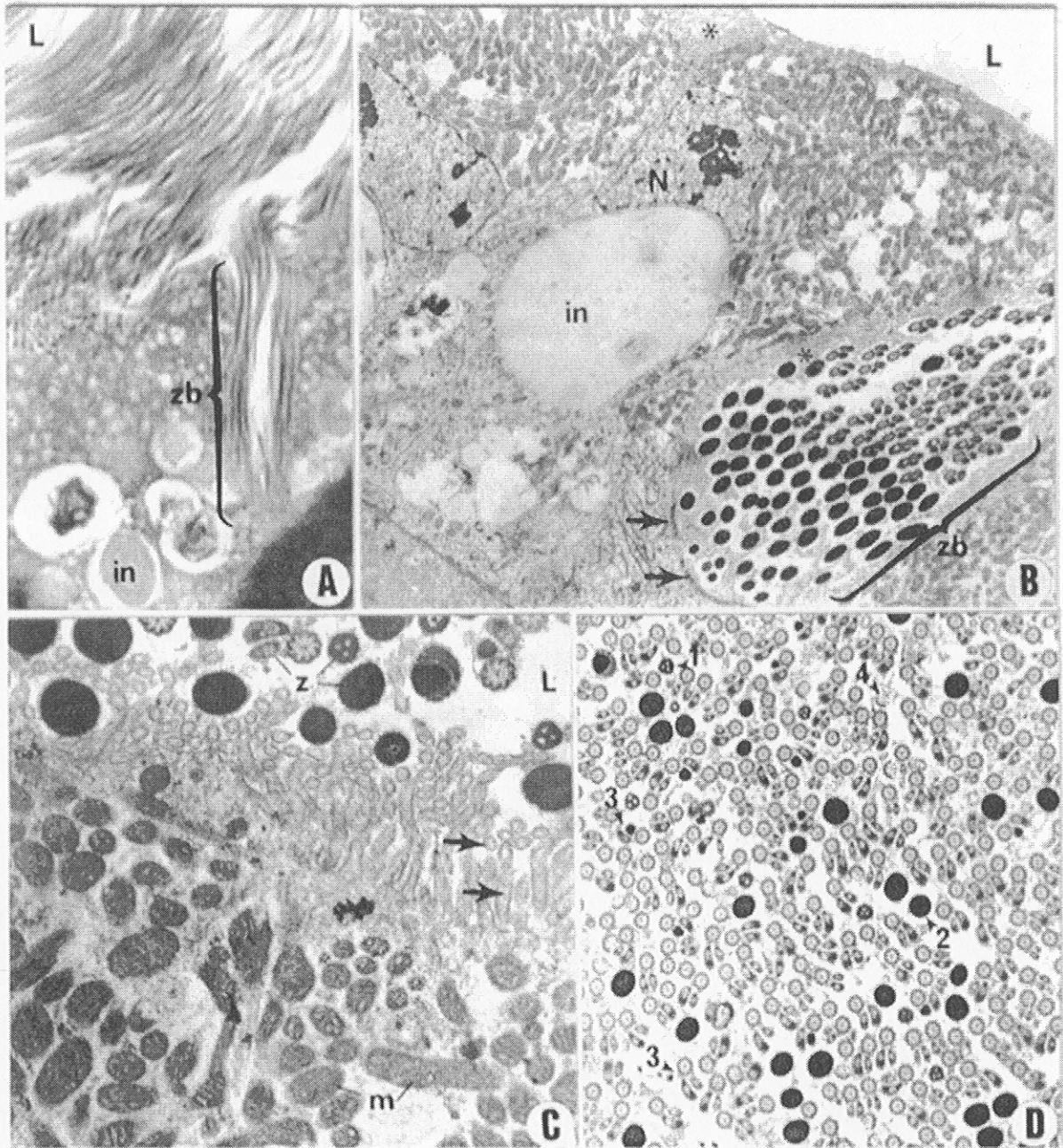
**Figure 1:** A-B. Light microscopy of seminal vesicle showing the luminal region (L) fulfilled of sperm (arrow), the epithelium (Ep) and the muscular sheath (Mu). The asterisks indicate the epithelial inclusions and the arrowhead indicates the nucleus. Bar scale: (A) 28  $\mu\text{m}$ ; (B) 6.40  $\mu\text{m}$ . C. Fluorescence Microscopy of the same region observed in Fig. B, showing the nucleus DAPI stained. See the sperm nucleus (arrow) in lumen (L), the epithelial nucleus (arrowheads) and the nucleus (short arrow) of the cells of the conjunctive capsule (C). (Ep) Epithelial region. Bar scale: 6.40  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2:** A. The ultrastructure of the seminal vesicle. See the lumen (L) containing sperm (z) next to microvilli projections (asterisk); the epithelial cells presents the nucleus (N), some inclusions (in); the muscular sheath is constituted by muscular cells (f) (see their nucleus, n). (C) Conjunctive capsule with a prominent nucleus (cn). Bar scale: 1.30  $\mu\text{m}$ . B. Electron microscopy of the conjunctive capsule. See the membrane-like structures (arrow) and the nucleus of a conjunctive cell (cn), externally to muscular cell (f). Bar scale: 1.56  $\mu\text{m}$ . C-D. Electron microscopy of the epithelium. The Fig. C, indicate the fusion of smaller inclusions (asterisks) to form the bigger one (in), and the Fig. D shows these inclusions occupying most of cytoplasm. The square indicates a hemidesmosomes adjacent to basement membrane (arrow). (N) nucleus; (f) muscular cell, (L) lumen; (z) spermatozoa. Bar scale: (C) 0.68  $\mu\text{m}$ , (D) 0.80  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3: A-B.** The ultrastructure of the epithelial inclusions (in) containing a dense structures and altered sperm cells (arrows) suggesting the spermiophagy. In A, the squares indicate the like-desmosomes attached to basement membrane (short arrow) and the arrowhead indicates the septate junction. (N) Nucleus; (f) muscular cell. Bar scale: (A) 0.35  $\mu\text{m}$ , (B) 0.50  $\mu\text{m}$ . **C.** The membranous content (arrow) of the inclusion (in) as a myelin figure. (N) Nucleus, (m) mitochondria, (thin arrow) basement membrane. Bar scale: 0.40  $\mu\text{m}$ . **D.** The ultrastructure of the septate junction (arrow). Bar scale: 0.17  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4:** A-B. Light and Electron micrographs, respectively, showing the sperm bundle (zb) inserted between epithelial cells. Observe in fig. B, the plasmatic membrane of the epithelial cell (arrows) and some microvilli (asterisk) besides to the sperm bundle. The square indicates a like-desmosomes. (L) Lumen; (in) inclusions; (N) nucleus. Bar scale: (A) 2.40  $\mu\text{m}$ , (B) 0.80  $\mu\text{m}$ . C. The ultrastructure of the apical region showing the abundance of mitochondria (m) and the microvilli sectioned in transverse and longitudinal orientations (arrows). (L) Lumen, (z) sperm cells. Bars scale: 0.20  $\mu\text{m}$ . D. Transverse sections at different levels of sperm cells in the luminal region. See the acrosome (1), the nucleus (2), the flagellum (3) and the posterior tip of axoneme (4). Bar scale: 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Conclusões Gerais

- Metade das espermatídes formadas após as duas divisões somáticas apresenta pouco citoplasma e não acompanham o alongamento nuclear das células normais. Estas espermatídes atípicas não são viáveis na formação de espermatozóides e são fagocitadas pelas células císticas.
- Os machos de *S. xanthotricha* tornam-se sexualmente maduros por volta do décimo dia de vida, idade na qual as vesículas seminais já estão cheias de espermatozóides e os testículos quase totalmente degenerados.
- Os ductos deferentes pós-vesiculares apresentaram sinais morfológicos de atividade secretora durante a maturação sexual. Estas secreções podem substituir, em parte, as funções das secreções das glândulas acessórias.
- As vesículas seminais de machos sexualmente maduros de *S. xanthotricha* não apresentaram características de atividade secretora. Essa atividade pode ser evidenciada em fases que antecedem a maturidade sexual ou em outras regiões ao longo dos ductos deferentes.