

VINÍCIUS ALBANO ARAÚJO

**CARACTERES MORFOLÓGICOS DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO
E DOS ESPERMATOZÓIDES DE HYMENOPTERA E HEMIPTERA (INSECTA)
E SUAS POSSÍVEIS CONTRIBUIÇÕES PARA A SISTEMÁTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

VINÍCIUS ALBANO ARAÚJO

**CARACTERES MORFOLÓGICOS DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO
E DOS ESPERMATOZÓIDES DE HYMENOPTERA E HEMIPTERA (INSECTA)
E SUAS POSSÍVEIS CONTRIBUIÇÕES PARA A SISTEMÁTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 17 de março de 2009.

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-Orientador)

Prof. Sérgio Luis P. da Matta
(Co-Orientador)

Prof. Gustavo Ferreira Martins

Prof^a. Karina Carvalho Mancini

Prof. José Lino Neto
Orientador

“Se sua trajetória de vida é diferenciada e inspiradora,
Isto é um convite.
Pessoal e intransferível.”
Keep Walking Club

“... em especial aos que de alguma forma vendem
sonhos por meio da sua inteligência, crítica,
sensibilidade, generosidade, amabilidade. Os
vendedores de sonhos são frequentemente estranhos
no ninho social. São anormais. Pois o normal é
chafurdar na lama do individualismo, do egocentrismo,
do personalismo. O seu legado será inesquecível...”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, pelo ensino público e de qualidade. Ao governo brasileiro (CNPq) por financiar meus estudos ao longo dos últimos sete anos.

Ao meu orientador durante o mestrado e doutorado, José Lino Neto, pela confiança, grandes ensinamentos, otimismo e oportunidades concedidas.

Ao co-orientador e amigo, Clóvis Andrade Neves, pelo exemplo de Educador, um verdadeiro mestre que sempre me incentivou. Ao Prof. Sérgio da Matta por todo apoio, principalmente na reta final. Aos demais membros da banca, Karina Mancini e Gustavo Ferreira Martins, pelas sugestões e críticas ao trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFV, em especial, Prof. Raul Guedes, pela competência e amizade. Aos professores do Programa, principalmente, Prof. José Eduardo Serrão e Prof^a. Terezinha Della Lucia pela confiança e oportunidades. Ao DBA e DBG, Rosângela, Zé Chico, Dona Paula, Miriam e Diana. Aos professores e estudantes da Biologia Estrutural.

À Prof^a. Sônia Bão, um grande exemplo profissional, e toda sua equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, pelas acolhidas e disponibilidade dos equipamentos, em especial, Bruno Fiorillo e Shélida!

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pela estrutura, em especial, à Cláudia por toda confiança e valiosos ensinamentos.

Ao Sr. Alex Behring, por ser um amigo tão fiel e verdadeiro e por estar sempre disposto a me ajudar! Aos honrosos membros do Qualis A Cilada's International Group Research: Lilian, Jane, Mariana, Sabrina, Madu, Sirlene, Katiane, Léo, Dani, João Paulo, Sílvia, Luana, Simone, Riviane, Felipe Freitas e Alípio (membro do antigo e exonerado Alípio's Group) pela amizade, discussões e momentos extra-acadêmicos diferenciados e fundamentais!

Ao projeto Nadar UFV-DEF, em especial ao professor Henrique Freitas. Bete Bola pelo carinho e momentos de atletismo.

À Yasmine Antonini, amiga e orientadora durante a graduação, pela qual carrego um grande carinho e admiração. Aos amigos republicanos de Ouro Preto que se fazem presentes sempre em minha vida. Aos amigos das Repúblicas de Viçosa, em especial, Lele, Ju e Camilo! A todos os amigos da Entomologia e de Viçosa em geral, por terem contribuído para que eu vivesse dias tão felizes nesta inesquecível cidade!

Minha amada mãe por ser a pessoa que mais acredita em mim e por ter me ensinado a sempre deixar as portas abertas para sorte entrar! Meu pai pelo esforço e orgulho em me ver seguir em frente! Minhas amadas irmãs, Paula, Tiça e Lu, e cunhados Jenner e Leandro por fazerem a nossa família ser tão especial e por todo elo de amor e energia que nos une. Em especial, minha irmã Ana Paula, por ter dividido todos os momentos da minha vida e me ajudado a construir essa etapa. Ao meu pequenino e amado sobrinho Gustavo, fonte de inspiração e renovação! Ao Vô Cruz, Vó Zizinha, Tia Alci, Tia Beth e toda família materna pelo carinho!

Sempre sonhei em estudar e achava que isso bastaria para me tornar alguém diferenciado. Hoje, após vinte e três anos de vida estudantil percebo que foram as pessoas com as quais convivi as principais fontes do meu conhecimento. A sabedoria que quero possuir não provém somente de teorias ou padrões científicos, mas principalmente da importância em retribuir para o meu país todo o investimento na minha formação. Acredito que a Educação é o melhor atalho para um novo Brasil de oportunidades iguais, de Ordem e Progresso! Para isso, não basta sermos professores e pesquisadores, é necessário, essencialmente, sermos Mestres!

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.

Cursou toda sua vida estudantil na rede pública de ensino, e em agosto de 2003, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Ecologia, pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Durante o período de graduação foi professor de alfabetização de funcionários, monitor de Zoologia dos Invertebrados e estagiário do Laboratório de Padrões de Diversidade Animal.

Em julho de 2005 concluiu o mestrado em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Nesta mesma instituição iniciou o curso de Doutorado em Entomologia, defendendo a tese em março de 2009. Durante os últimos sete anos foi bolsista do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e obteve, deste mesmo órgão de fomento, concessão de uma bolsa de Pós-Doutorado para vigência em março de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. Introdução Geral	01
1.1. Sistemática em Insetos: A evolução do pensamento filogenético.....	01
1.2. Ordem Hymenoptera	09
1.3. Ordem Hemiptera.....	14
1.3.1. Subordem Heteroptera: Pentatomorpha.....	16
1.3.2. Subordem Auchenorrhyncha.....	17
1.4. Morfologia do sistema reprodutor masculino em insetos.....	18
1.5. Caracteres estruturais e ultra-estruturais dos espermatozóides.....	20
1.6. Referências Bibliográficas.....	23
2. Objetivos	35
3. Artigos	36
3.1. Capítulo 1: Structure and ultrastructure of the spermatozoa of <i>Trypoxylon</i> <i>(Trypargilum) albitarse</i> Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae).....	36
3.2. Capítulo 2: Ultra-estrutura dos espermatozóides em duas espécies de abelhas solitárias com ênfase nos caracteres sinapomórficos compartilhados na família Apidae.....	51
3.3. Capítulo 3: Morphology of the male reproductive system of the <i>Polistes versicolor</i> <i>versicolor</i> (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae: Polistini): with phylogenetic considerations....	70
3.4. Capítulo 4: Morfologia do sistema reprodutor masculino em duas espécies de abelhas solitárias (Hymenoptera, Apidae).....	85
3.5. Capítulo 5: Caracterização ultra-estrutural dos espermatozóides de <i>Aethalion</i> <i>reticulatum</i> Linnaeus, 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae).....	100
3.6. Capítulo 6: Espermatozóides polimórficos em <i>Largus rufipennis</i> Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae).....	116
4. Conclusão Geral	132

RESUMO

ARAÚJO, Vinícius Albano, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009.
Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozóides de Hymenoptera e Hemiptera (Insecta) e suas possíveis contribuições para a sistemática. Orientador: José Lino Neto. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Sérgio Luís Pinto da Matta.

Os insetos constituem os organismos mais diversos na Terra, sendo seu sucesso adaptativo atribuído a longevidade de suas linhagens, ao número de espécies, à diversidade de suas adaptações, sua biomassa e seu impacto ecológico. Devido à grande variedade de histórias de vida e padrões ecológicos, os insetos apresentam grande diversidade no comportamento de cópula e nas estruturas morfológicas associadas à reprodução. As variações interespecíficas em tais estruturas têm gerado caracteres capazes de suportar análises filogenéticas. A inclusão de novos caracteres, aliados aos caracteres morfológicos comumente utilizados, visam contribuir para a sistemática de vários grupos de insetos que ainda não possuem uma filogenia totalmente aceita. Além disso, trabalhos envolvendo sistemas reprodutores e espermatozóides auxiliam no entendimento da biologia reprodutiva, como as diferentes estratégias de cópula e a competição de espermatozóides. Nesta tese, descrevemos a morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozóides em espécies das ordens Hymenoptera e Hemiptera. Para isso, utilizamos técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados apontam caracteres que suportam inferências na sistemática e que auxiliam no entendimento da biologia reprodutiva das espécies estudadas. Alguns caracteres sinapomórficos para os espermatozóides dos Apoidea sustentam um padrão típico para a família Apidae e outros caracterizam espécies do seu grupo irmão Crabronidae. Dentre os Hemiptera, a ultra-estrutura dos espermatozóides mostra-se promissora na resolução do parafiletismo da subordem Auchenorrhyncha. Além disso, a produção de espermatozóides polimórficos na

subordem Heteroptera gera importantes discussões acerca das estratégias reprodutivas e do fenômeno de competição de espermatozoides. Caracteres extraídos da morfologia dos sistemas reprodutores como: (1) anatomia geral; (2) número de espermatozoides por cisto e (3) histologia do sistema reprodutor; indicam diferenças interespecíficas capazes de agrupar espécies ou outros táxons superiores proximamente relacionados. Dessa forma, neste trabalho, observamos que novos caracteres derivados dos espermatozoides sustentam o uso dessas células em análises cladísticas (espermiocladística) e apontam os caracteres da morfologia do sistema reprodutor com potenciais para a sistemática dos insetos.

ABSTRACT

ARAÚJO, Vinícius Albano, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009.

Morphological characters of the male reproductive system and spermatozoa of the Hymenoptera and Hemiptera (Insecta) and their possible contributions to the systematics. Adviser: José Lino Neto. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves and Sérgio Luís Pinto da Matta.

The insects comprise the group of the most diverse organisms on Earth, being their adaptive success attributed to their lineages longevity, their species number, their adaptations diversity, their biomass and their ecological impact. Due to a large variety of life history and ecology patterns, the insects present large diversity of coupling behaviour and morphological structures associated to the reproduction. The interspecific variation in such structures generates data that could support phylogenetic analyses. The inclusion of new traits, allied to morphological traits commonly used, can improve the systematic analysis of several insect groups that do not have yet a totally acceptable phylogeny. Furthermore, works regarding the reproductive systems and spermatozoa can help understanding the reproductive biology such as the mating strategy differences and sperm competition. In this work, we described the morphology of the male reproductive system and the spermatozoa of the some species of the orders Hymenoptera and Hemiptera using the light and the transmission electron microscopies. The results point to characters that support inferences in the systematics that can help the understanding of the reproductive biology of the studied species. Some synapomorphic traits for the Apoidea spermatozoa support a typical pattern of the family Apidae and others are commonly find in the species of its sister group Crabronidae. Among the Hemiptera, the ultrastructure of the spermatozoa shows to be promising in the elucidation paraphyletism of the suborder Auchenorrhyncha. Moreover, the production of polymorphic spermatozoa in the suborder Heteroptera generates important discussions concerning on the reproductive strategies and on the sperm

competition. Characters extracted from the morphology of the reproductive systems such as (1) the general anatomy; (2) the number of spermatozoa per cyst, and (3) the histology of the reproductive system show interspecific differences that allow grouping species or other superior taxa closely related. Thus, in this work, we have observed that new characters derived from the spermatozoa can be useful in cladistic analyses (spermiocladistic) and indicate the reproductive system as a potential for the insect systematics.

1. Introdução Geral

1.1. A evolução do pensamento filogenético: Sistemática em Insetos

A evolução ao longo de milhões de anos gerou uma grande diversidade de espécies e a classe Insecta compreende os mais diversos organismos na história de vida da Terra, fornecendo profundos “*insights*” dentro da teoria evolutiva. As principais características atribuídas ao grande sucesso evolutivo dos insetos são a longevidade de suas linhagens, o número de espécies, a diversidade de suas adaptações, sua biomassa e, por conseguinte, seu impacto ecológico. O grande desafio dos entomologistas sistematas é reconstruir a história evolutiva e explicar o sucesso adaptativo dos insetos em uma esfera de existência de cerca de 400 milhões de anos (Grimaldi & Engel, 2005). Cerca de um milhão de espécies de insetos já foram descritas e estimativas apontam que o número real de espécies atuais é de aproximadamente cinco milhões (Gaston, 1991).

Ao longo dos últimos anos, vários trabalhos têm sido feitos envolvendo aspectos da sistemática de insetos com o objetivo de reconstruir a filogenia desse grupo (Hamilton, 1981; Carpenter, 1982; Carver et al., 1991; Alexander, 1992; Brothers & Carpenter, 1993; Deitz & Dietrich, 1993; Hanson & Gauld, 1995; Brothers, 1999; Kristensen, 1999; Melo, 1999; Wheeler et al., 2001; Li et al., 2005). Tais trabalhos têm identificado várias linhagens de insetos e registrado eventos de sucesso adaptativo e extinções. Os estudos filogenéticos também fornecem interpretações dos padrões evolutivos e permitem previsões.

O naturalista inglês Charles Darwin (1809-1882) é reconhecido como o arquiteto do pensamento evolutivo. Entretanto, as primeiras idéias evolutivas, ainda que simplistas, datam da Grécia Antiga. Aristóteles (384-322 a.C), além de fundamentar a argumentação lógica, sumarizou as informações de várias espécies

animais no livro *Historia Animalia*. Também na Grécia Antiga surgiu a árvore *Porphiriana*, com as primeiras idéias de identificação dicotômica e de classificação hierárquica. Durante a queda do Império Romano (378-410 d.C) todas as observações e documentos sobre o mundo natural foram condenados a inquisição, na chamada Idade Escura. O pensamento sobre sistemática foi modificado e a árvore *Porphiriana* do conhecimento foi alterada e expandida dentro da *Scala Naturae*, representando uma hierarquia imutável que refletia a perfeição Divina. Poucos livros sobreviveram ao colapso Romano e volumes como o *Seven Liberal Arts* formaram o fundamento do pensamento científico durante séculos (Burke, 1985). Durante as Cruzadas do século XI vários textos gregos foram redescobertos e suas idéias expandidas pelas arábias e Índia. Durante dois séculos, monges transcreveram textos para o latim e os divulgaram pelas escolas da Europa (Burke, 1985), difundindo o conhecimento e, principalmente, as idéias de Aristóteles.

Novas descobertas do mundo natural foram feitas com o desenvolvimento do microscópio em 1600. Nesta época as primeiras escolas começaram a focar os estudos com insetos e produziram importantes livros. Alguns dos mais significativos foram, *Historia Insectorum Generalis* (Swammerdam, 1685) e *Historia Insectorum* (Ray, 1710), sendo que este último estabeleceu uma nova era na classificação dos insetos.

O maior impulsionador da ciência da sistemática foi o botânico sueco Karl Linnaeus (1707-1778). Linnaeus, seguindo os pressupostos de Aristóteles, agrupou características generalizadas dentro de gêneros e os caracteres mais distinguíveis de um indivíduo dentro de um epíteto específico. Dessa forma, Linnaeus foi o primeiro sistemata a categorizar o mundo biológico dentro de um sistema hierárquico binominal. Após seu trabalho, as discussões foram focadas em identificar um único ou uma fonte de caracteres que produzissem uma classificação natural. Para Linnaeus, o número e a estrutura das asas dos insetos serviam para

nomear as ordens, como: Aptera (sem asa), Diptera (uma par de asas), Hymenoptera (dois pares de asas membranosas) e Neuroptera (asas com muitas nervuras). Linnaeus descreveu cerca de 3.000 espécies de insetos. Johann C. Fabricius (1745-1808), estudante de Linnaeus, descreveu 9.776 espécies e é considerado o primeiro especialista em entomologia e o mais original taxonomista de insetos. Em sua principal obra, *Philosophia Entomologica* (Fabricius, 1778), ele reconheceu importantes caracteres, principalmente das partes bucais e da genitália de insetos machos.

O entomologista francês Pierre A. Latreille (1762-1833) foi contemporâneo e impulsionou as idéias de Fabricius (Geoffroy Saint-Hilaire et al., 1833; Dupuis, 1974). Latreille recebeu uma educação formal e tornou-se padre. Entretanto, durante as investigações civis da Revolução Francesa ele foi condenado para execução e feito prisioneiro. Na prisão Latreille identificou uma nova espécie de besouro, *Necrobia ruficollis*, e com a ajuda de dois naturalistas foi considerado entomologista e liberado. Em seu mais notável trabalho, *Précis des Caractères Génériques des Insectes* (Latreille, 1796), ele atentou para uma classificação natural dos Arthropoda e delimitou dentro de cada ordem o que hoje seriam as famílias. Durante todo o século XVIII várias predições das classificações modernas foram feitas, variando do pensamento criacionista às idéias evolucionárias.

Grandes contribuições para os debates sobre classificação vieram com a publicação da série de 44 volumes por Georges L. Leclerc, Comte de Buffon (1707-1788). Influenciado pelas leis físicas de Isaac Newton, Buffon trabalhou na produção da *Classification of Natural Classes*, baseada em caracteres da morfologia funcional. Sua coleção animal corresponde aos primeiros depósitos do Museu Nacional de História Natural da França. Apesar de não se interessar pelos métodos sistemáticos do seu contemporâneo Linnaeus, as discussões de Leclerc geraram algumas das mais críticas idéias sobre o pensamento evolutivo. O francês

Georges L.C.F.D. Cuvier (1769-1832) também trabalhou a classificação segundo leis funcionais e definiu os caracteres que formam grupos naturais como adaptativos. Ele reconheceu os fósseis como documentação de organismos extintos, apesar de acreditar na constante criação Divina. O Museu Nacional de História Natural da França serviu de laboratório para Etienne Geoffroy St. Hilaire (1772-1844), que desenvolveu o conceito de homologia, e para Jean Baptiste P.A.M. de Lamarck (1744-1829), que reformulou o conceito de homologia e aplicou a ele as idéias de descendência com modificações.

Paralelos aos estudos sobre homologias e classificações, naturalistas e geólogos britânicos realizavam várias descobertas sobre a Terra e sua diversidade. Charles Lyell (1797-1875) revelou que a Terra era muito antiga e que depósitos de várias camadas de sedimentos e erosão formam as camadas estratigráficas onde os fósseis são depositados. Uma síntese dos padrões geológicos foi publicada em três volumes no *Principles of Geology* (Lyell, 1830) que influenciou fortemente outros cientistas britânicos. Entre eles Charles Darwin (1809-1882) e Alfred Wallace (1823-1913), cujas idéias sobre as mudanças evolutivas através da seleção natural são descritas no livro *The origin of species* (Darwin, 1859). A teoria e o mecanismo da seleção natural explicam os padrões vistos no registro fóssil, variações entre as espécies, distribuição de organismos, as similaridades embriológicas e a natureza hierárquica da vida. A teoria de Darwin não modificou a prática da sistemática, mas forneceu um arcabouço teórico sobre a diversidade de espécies. De fato, a teoria da seleção natural explica mudanças anagênicas ou a evolução de caracteres particulares, não a origem ou a formação de novas espécies (Darwin, 1859). Esta, por sua vez, se tornou a principal questão biológica do século XX e os entomologistas tiveram um impacto substancial nas discussões.

De 1905 a 1920 Thomas Morgan estudou o gênero *Drosophila* e recebeu o prêmio Nobel por descobrir importantes fenômenos genéticos da mutação. Em

1920, os geneticistas R. Fisher, J.B.S. Haldane e S. Wright apontaram a mutação como a causa biológica das mudanças evolutivas e a seleção natural seria a força impulsionadora do processo, surgindo a “Nova síntese” que unia a genética e a sistemática. Os trabalhos de Morgan também impulsionaram o sistemata Theodosius Dobzhansky, que aplicou os estudos com variedades selvagens de *Drosophila* em questões de variação genética na natureza e formação de espécies (Dobzhansky, 1937). No Museu de História Natural da América, Ernst Mayr conduzindo experimentos com sistemática de aves, propôs a idéia de alopatria, em que espécies evoluem do isolamento geográfico (Mayr, 1942). Outro cientista do Museu Americano, George G. Simpson, concluiu que as mudanças graduais observadas no registro fóssil podem ser explicadas por pequenas mudanças genéticas, adicionando uma perspectiva geológica à Síntese Moderna.

Entre 1940 e 1960 os biólogos preocupavam-se principalmente com os mecanismos de mudança evolutiva e a sistemática não obteve grandes avanços. Entretanto, o geneticista Alfred Sturtevant trabalhou durante anos com sistemática de *Drosophila* (Sturtevant, 1942) e usou métodos de classificação que foi a base para os trabalhos do grande sistemata de insetos Willi Henning. O artigo de Sturtevant não obteve muita repercussão na época, talvez porque tenha sido publicado no mesmo ano da obra clássica *Systematics and Origin of Species* (Mayr, 1942).

Nas décadas de 1950 e 1960 os estudos com sistemática retomaram força com o objetivo de reconstruir as relações entre os táxons. Nessa época surgiu a escola de taxonomia numérica ou fenética, desenvolvida pelos entomologistas Robert Sokal e Charles D. Michener e pelo microbiologista Peter Sneath. A escola fenética adotou um método para agrupar os organismos baseado na similaridade, com o objetivo de fazer uma classificação lógica e com uma metodologia que removesse a subjetividade (Michener & Sokal, 1957; Sokal & Sneath, 1963; Sneath & Sokal,

1973). A escola fenética tinha a vantagem de oferecer uma metodologia testável e com mínimos critérios científicos. Entretanto, o valor preditivo das classificações fenéticas era muito baixo, tornando os padrões evolutivos obscuros. Isto porque era baseada em medidas de dissimilaridade e não nas relações entre os táxons. O principal problema para o uso da fenética é que os biólogos se interessam por filogenia e isso requer classificações que reflitam as relações genealógicas e naturais. Um método que mede a similaridade fenética é falho em distinguir similaridade evolutiva (resultado de descendência) de convergência e de paralelismo. Atualmente, algumas análises fenéticas são erroneamente usadas para obter o que se acredita ser relações genealógicas, principalmente em grupos de microrganismos.

Paralelo ao desenvolvimento da escola fenética, outra resposta bem aceita ao Neo-Darwinismo foi proposta pelo alemão Willi Hennig (1913-1976). Este sistemata de Diptera fundamentou sua proposta dentro do princípio de que a filogenia pode ser reconstruída e que todas as classificações deveriam ser baseadas no padrão de genealogia de descendência, gerando classificações evolutivas e naturais, semelhante às idéias de Darwin. Hennig estabeleceu um rigoroso método para análises das relações filogenéticas, a escola cladística (Hennig, 1965, 1966). A idéia básica da cladística foi estabelecer um sistema de classificação filogenética que funcionasse como um sistema geral de referência para a biologia. Em seus pressupostos, se as classificações refletem a filogenia, então todos os táxons classificados necessariamente precisam ser monofiléticos. Grupos parafiléticos e polifiléticos não são aceitos como táxons sustentáveis na hierarquia de classificação (Farris, 1974). Grupos monofiléticos são naturais porque contêm o ancestral comum e todas as suas espécies descendentes. Grupos parafiléticos contêm o ancestral comum e algumas, mas não todas espécies descendentes. Os mais problemáticos dos grupos são os polifiléticos, os quais contêm alguns dos

descendentes de um ancestral comum, mas não o próprio ancestral comum do grupo.

Para a escola cladística, entre o mosaico de caracteres de um organismo, somente aqueles que são derivados e compartilhados com outras espécies são informativos para filogenia. Hennig (1965, 1966, 1981) notou que para propor uma reconstrução filogenética existem dois tipos de similaridades de caracteres a serem avaliadas: as apomorfias, que são similaridades que surgem em um ancestral comum mais recente, ou uma característica recentemente evoluída, “derivada”, que surge somente em um grupo de espécies proximamente relacionadas; e as plesiomorfias que são características que surgiram em um ancestral comum distante, ou característica “basal”. O uso dos termos “derivada” e “primitivo” ou “basal” é controverso porque eles implicam em uma escala de perfeição ou adaptação. Plesiomorfia e apomorfia são também termos relativos, por exemplo, asas são uma plesiomorfia para borboletas, mas uma apomorfia para os insetos pterygota.

O reconhecimento dos grupos monofiléticos foi baseado principalmente nas apomorfias compartilhadas (sinapomorfias) e não nas plesiomorfias compartilhadas (simplesiomorfias). Táxons baseados em plesiomorfias podem produzir somente grupos parafiléticos. Um grupo é monofilético se ele é caracterizado por possuir sinapomorfias, caracteres derivados compartilhados pelos membros do grupo. Já os grupos polifiléticos são frequentemente baseados em caracteres convergentes que são superficialmente similares e não uma derivação evolutiva comum. Os insetos sugadores, por exemplo, representam uma assembléia polifilética, já que o desenvolvimento das partes bucais surgiu várias vezes em diferentes configurações. A presença de uma apomorfia em uma única espécie e não em outras proximamente relacionadas não é informativo das relações porque não identifica o táxon com nenhuma outra linhagem, trata-se de uma autapomorfia. Para

Hennig (1981), o próximo passo foi estabelecer como definir se um carácter é apomórfico ou plesiomórfico. O método mais amplamente aceito é o de determinação da polaridade do carácter por comparação com o grupo externo. Linhagens proximamente relacionadas dentro de um grupo em estudo e que compartilham caracteres com um ancestral comum recente (o grupo externo) compartilham plesiomorfias; características que são únicas dentro do grupo interno são apomorfias (Hennig, 1981). Outros métodos menos usados para definir polaridade envolvem ontogenia e desenvolvimento, frequência de caracteres e paleontologia.

Atualmente, a reconstrução da filogenia é baseada em teste de congruência entre identidades topológicas que são, preferencialmente, homologias morfológicas, comportamentais ou moleculares (Grimaldi & Engel, 2005). As homologias observadas são analisadas cladisticamente, divididas em apomorfias e plesiomorfias para formar um padrão hierárquico, um cladograma. O cladograma é um tipo muito geral de árvore filogenética que indica somente relações relativas e não as relações entre ancestral-descendente. Um cladograma que incorpora o registro fóssil e a escala de tempo geológica é considerado uma filogenia (Smith, 1994) e os padrões de mudanças em caracteres individuais podem ser interpretados. Existem vários modelos computacionais para reconstrução da filogenia, elaborados para resolver problemas particulares de análises baseadas em caracteres específicos (proteínas, morfologia, sequências de DNA). Embora a análise de dados morfológicos “tradicionais” e/ou moleculares tenha resolvido muitas questões sistemáticas de vários grupos de insetos, ainda existem em vários táxons, várias questões filogenéticas não elucidadas. Novos caracteres estão sendo usados e inferidos nas análises como, por exemplo, aqueles obtidos em estudos morfológicos do sistema reprodutor interno e dos espermatozoides (Baccetti & Dallai, 1978; Sivinski, 1984; Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999).

1.2. Ordem Hymenoptera

As ordens Hymenoptera, Lepidoptera e Coleoptera compreendem as quatro maiores e mais diversas ordens de insetos. Os Hymenoptera se diferem dos demais insetos por possuírem uma complexa mistura de caracteres basais e numerosas autapomorfias, o que dificulta definir a qual grupo eles são mais proximamente relacionados. As evidências atuais indicam que os holometábolos são divididos em duas principais linhagens: Coleoptera + Neuropterida e os Panorpida. Os Hymenoptera são relacionados aos Panorpida, hipótese sustentada por caracteres morfológicos (Königsmann, 1976; Kristensen, 1981, 1991, 1995, 1999) e moleculares (Whiting et al., 1997; Wheeler et al., 2001).

Os primeiros Hymenoptera, reconhecidos pelo padrão de venação das asas, datam do Triássico, na região da Austrália, Ásia central e África (Riek, 1955; Rasnitsyn, 1964, 1969; Schluter, 2000). Diferentemente de outros holometábolos basais, os Hymenoptera são considerados relativamente recentes, e desde o fim do Triássico esses insetos apresentaram intensa radiação, sendo atribuído o sucesso adaptativo principalmente ao bauplan estrutural e funcional. Estudos de levantamento e estimativa de riqueza em escala global apontam os Hymenoptera como a ordem mais diversa (Kristensen, 1999; Grissel, 1999), ultrapassando os Coleoptera, até então considerada a ordem com o maior número de espécies. Atualmente existem cerca de 125.000 espécies de Hymenoptera descritas, entretanto até as estimativas mais conservadoras apontam que o número real seja entre 600.000 a 1.200.000 espécies (Gaston, 1991; Grissel, 1999; Austin & Dowton, 2000a).

As espécies de Hymenoptera podem apresentar hábito fitófago, entomófago ou uma combinação de ambos. Ainda, os entomófagos podem ser predadores ou parasitóides com uma grande variedade de hábitos intermediários que muitas vezes dificultam a classificação.

Nos insetos, com exceção dos Isoptera, a eusociabilidade está presente apenas nos Hymenoptera e, somente nestes, existem grupos (abelhas e vespas) que exibem todas as gradações da organização social, de solitária a eussocial avançada.

Segundo Hanson (1995), os Hymenoptera contêm mais espécies de interesse às atividades humanas do que qualquer outra ordem de insetos. Como a maioria é parasitóide e/ou predadora de outros insetos, muitas espécies desempenham papel importante no equilíbrio natural das populações de seus hospedeiros, sendo largamente utilizadas em programas de controle biológico de pragas agrícolas e florestais. Entre os membros fitófagos da ordem, as abelhas constituem o grupo mais importante de polinizadores, sendo consideradas essenciais à manutenção da diversidade das angiospermas, incluindo as espécies cultivadas (Hanson, 1995). Embora sejam uma pequena minoria, existem espécies de Hymenoptera que podem causar grandes prejuízos econômicos. Dentre estas, as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) que causam os prejuízos mais severos (Cherrett, 1986).

Em função da sua grande importância, existe um considerável investimento em pesquisas com os Hymenoptera, abordando os mais diversos aspectos. Entretanto, por um longo tempo poucos estudos filogenéticos relacionados aos níveis taxonômicos mais elevados foram realizados considerando essa Ordem. Estudos filogenéticos envolvendo um maior número de táxons são fundamentais, pois fornecem bases para uma classificação taxonômica natural, bem como para reconstrução da evolução de importantes caracteres e no estudo de eventos evolutivos raros (Ronquist, 1999).

Os Hymenoptera representam uma das mais bem definidas ordens de insetos e há bastante tempo é considerado um grupo natural. O monofiletismo da ordem foi inferido por Vilhelmsen (1997) baseado em dezesseis autapomorfias morfológicas e corroborado por análise molecular (Whiting et al., 1997). Os Hymenoptera são

tradicionalmente divididos em 'symphyta' e Apocrita, sendo este último ainda dividido em Parasitica (vespas parasíticas) e Aculeata (abelhas, formigas e vespas). Enquanto os Apocrita e os Aculeata têm sido aceitos como grupos monofiléticos (Königsmann, 1976, 1977, 1978a,b; Rasnitsyn, 1980, 1988), ainda há dúvidas quanto as relações filogenéticas dos 'symphyta' e dos Parasitica. Segundo Ronquist et al. (1999), os 'symphyta' são provavelmente parafiléticos em relação aos Apocrita, e os Parasitica provavelmente parafiléticos em relação aos Aculeata, sendo também a relação evolutiva entre 'symphyta' e Parasitica ainda muito discutida.

A origem das vespas Apocrita, a partir de um ancestral 'symphyta', é um capítulo especialmente controverso e vem sendo discutido desde o início do século. Handlirsch (1906) sugere que os apócritas tenham derivado de um Siricoidea, enquanto Rohwer & Cushman (1917) sugerem um Orussoidea e Brues (1921) e Malyshev (1968) um Thentredinoidea. Ross (1936, 1937), baseado em evidências morfológicas, indicou os Cephoidea como grupo mais proximamente relacionado às vespas apócritas, sugestão esta corroborada pelas análises com bases Henningianas realizadas por Königsmann (1976). Atualmente, diversas linhas apontam os Orussidae como grupo irmão dos Apocritas e atribuem tal relação ao hábito de vida ectoparasita (Burke, 1917; Gourlay, 1951; Rawlings, 1957; Powell & Turner, 1975; Nuttall, 1980; Vilhelmsen, 2003). Além do parasitismo, os Orussidae compartilham diversas características anatômicas com as vespas Apocrita (Gibson, 1985; Johnson, 1988; Whitfield et al., 1989; Basibuyuk & Quicke, 1997; Schulmeister, 2003a, 2003b). Sendo assim, os Orussidae e os Apocrita formam um grupo denominado Euhymenoptera. Alguns trabalhos clássicos abordam aspectos da sistemática e biologia dos Hymenoptera (Evans & Evans, 1970; Iwata, 1972, 1976; Spradberry, 1973; Krombein et al., 1979; Gauld & Bolton,

1988; Schedl, 1991; Goulet & Huber, 1993; LaSalle & Gauld, 1993; Godfray, 1994; Hanson & Gauld, 1995; Quicke, 1997; Austin & Dowton, 2000b; O'Neill, 2001).

Os Aculeata (formigas, abelhas e as vespas com ferrão) compreendem os Hymenoptera mais conhecidos. São facilmente reconhecidos por possuírem o ovipositor modificado em um aparelho de ferrão usado para injeção de veneno. O valor adaptativo do ferrão nos Aculeata é bem evidenciado pelo fato de milhares de espécies de insetos mimetizarem as vespas com quais coexistem (Starr, 1985).

Os primeiros registros de espécies de Aculeata datam do Cretáceo, na Ásia central (Rasnitsyn, 2002). Essas espécies sofreram intensa radiação e são atualmente divididas em três superfamílias: Chrysoidea, Vespoidea e Apoidea. As relações entre as famílias de Chrysoidea foram estudadas por Carpenter (1986, 1999), Brothers & Carpenter (1993) e Brothers (1999). Os Chrysoidea são considerados os mais basais e são excluídos de Vespoidea + Apoidea (Euaculeata) por possuírem a retenção primitiva dos antenômeros idênticos em ambos os sexos. Enquanto que nos Euaculeata existe dimorfismo de antenas, com 12 e 13 antenômeros em machos e fêmeas, respectivamente.

Os Vespoidea consistem de dez famílias atuais e duas já extintas. Embora representem um grupo natural, são definidos principalmente por características que foram subsequentemente modificadas dentro da superfamília ou surgiram secundariamente nas famílias (Brothers & Carpenter, 1993; Brothers, 1999). Dentre os Vespoidea, a família Vespidae compreende aproximadamente 4.500 espécies de vespas, frequentemente sociais e de distribuição cosmopolita. As espécies de Vespidae são agrupadas em seis subfamílias (Carpenter, 1982, 1991; Carpenter & Rasnitsyn, 1990). As subfamílias mais basais: Euparagiinae, Masarinae e Eumeninae são solitárias, enquanto os Stenogastrinae, vespas primitivamente eussociais, são o grupo irmão das verdadeiramente eussociais Polistinae e

Vespinae. Por outro lado, as subfamílias eussociais são as mais estudadas. Entre os eussociais os Polistinae possuem cerca de 800 espécies distribuídas em todas as regiões do mundo, e os Vespinae, menos diversos, possuem cerca de 80 espécies restritas as regiões holoárticas e oriental (Spradberry, 1973; Matsuura & Yamane, 1990; Ross & Mathews, 1991; Gadagkar, 2001).

As abelhas e vespas esfeciformes constituem a superfamília Apoidea (Brothers, 1975; Königsmann, 1978b; Brothers & Carpenter, 1993), a qual inclui cerca de 30.000 espécies descritas, sendo a maioria de abelhas. Até recentemente, as abelhas eram classificadas em cinco ou seis famílias, enquanto os esfeciformes eram agrupados em uma única família "Sphecidae". Sphecidae nesta classificação são sem dúvida um grupo natural e formam a linhagem da qual as abelhas provavelmente evoluíram (Lomholdt, 1982; Alexander, 1992; Brothers, 1999). Baseado na sua monofilia, os Sphecidae foram divididos em uma série de famílias: Heterogynaidae, Ampulicidae, Sphecidae e Crabronidae, sendo esta última família o grupo irmão das abelhas (Prentice, 1998; Melo, 1999). Relações filogenéticas baseadas em representantes vivos indicam os Heterogynaidae como a família mais basal, seguida por Ampulicidae, Sphecidae e, por último, Crabronidae (Alexander, 1992; Prentice, 1998; Melo, 1999).

Recentemente as abelhas foram agrupadas em uma única família Apidae (Brothers, 1999; Melo, 1999; Melo & Gonçalves, 2005) que compartilha com os Crabronidae um ancestral comum, provavelmente uma vespa fitófaga, sustentando a hipótese da origem monofilética para o grupo (Muller, 1872; Michener, 1944, 2000; Brothers, 1975, 1999; Lomholdt, 1982; Alexander, 1992; Brothers & Carpenter, 1993; Alexander & Michener, 1995; Prentice, 1998; Melo, 1999; Engel, 2001).

Nos últimos trinta anos, ocorreu um progresso significativo no entendimento das relações de parentesco entre os maiores grupos de Hymenoptera. As primeiras

análises cladísticas foram fundamentadas em dados morfológicos e, eventualmente, comportamentais (Brothers, 1975; Gibson, 1985; Rasnitsyn, 1988; Whitfield et al., 1989; Quicke et al., 1992; Brothers & Carpenter, 1993; Heraty et al., 1994; Vilhelmsen, 1996; Basibuyuk & Quicke, 1997; Ronquist et al., 1999; Melo, 1999). Mais recentemente, dados moleculares também têm contribuído significativamente para o entendimento do grupo (Derr et al., 1992; Cameron, 1991, 1993; Sheppard & McPheron, 1991; Baur et al., 1993; Crozier et al., 1997; Dowton et al., 1997; Whitfield, 1998; Dowton & Austin, 1999). Ainda, alguns poucos trabalhos foram realizados associando os caracteres morfológicos aos moleculares. Os mais importantes foram realizados por Chavarría & Carpenter (1994), para as abelhas sociais, Carpenter (1997), para as vespas sociais, e Carpenter & Wheeler (1999) compreendendo representantes de todos os grandes grupos.

Apesar de diferentes abordagens considerarem a filogenia dos Hymenoptera, na maioria dos trabalhos, independente do nível taxonômico, as árvores inferidas com base em caracteres morfológicos não corresponderam àquelas inferidas a partir de caracteres moleculares. Entretanto, as análises morfológicas são freqüentemente corroboradas pelas análises de “evidência total”. Portanto, pode-se supor que muitas controvérsias ou dúvidas a respeito da filogenia dos Hymenoptera, poderão ser resolvidas se novos sistemas de caracteres, puderem ser inseridos no atual contexto de bases de dados e analisados em conjunto. Como exemplo, podemos citar aqueles caracteres obtidos a partir de estruturas menos susceptíveis as condições ambientais.

1.3. Ordem Hemiptera

A ordem Hemiptera compreende um grande e diverso grupo de insetos que variam consideravelmente em tamanho e forma do corpo, história de vida e hábitos

alimentares. Atualmente são descritas cerca de 67.500 espécies distribuídas por todo o mundo (Triplehorn & Johnson, 2005). Compreende um grupo claramente monofilético que se distingue dos outros insetos por possuírem peças bucais adaptadas à perfuração e sucção, alojadas em uma longa tromba ou bico, tanto na forma adulta como em ninfas (Schuh & Slater, 1995).

Frequentemente tem sido observada confusão em relação ao uso dos nomes no grupo, especificamente os nomes Hemiptera, Homoptera e Heteroptera (Borror et al., 1989). “Homoptera” é um nome usado no passado para todos os Hemiptera com exceção dos Heteroptera ou percevejos verdadeiros. Os “Homoptera” formam um grupo parafilético dividido em três subordens: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Coleorrhyncha.

Usualmente quatro subordens de Hemiptera são agora aceitas: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha, consideradas monofiléticas e Auchenorrhyncha, parafilética (Bourgoin et al., 1997). As principais questões filogenéticas do grupo se concentra nas relações e na monofilia dos Auchenorrhyncha. Os Sternorrhyncha são quase sempre considerados o grupo irmão dos outros Hemiptera (Wheeler et al., 1993), embora outros autores considerem que as relações nestas duas subordens ainda não estão completamente resolvidas (Hennig, 1981).

A diversidade da ordem é relacionada a radiação das angiospermas. A eficiência na alimentação em plantas é atribuída a estrutura das partes bucais, a qual também possui algumas pré-adaptações para predação. Os Heteroptera abrangem cerca de 25.000 espécies conhecidas como percevejos. A maioria das espécies são fitófagos, alimentando de seiva e outros sucos produzidos por plantas, mas existem algumas espécies hematófagas (alimentam-se de sangue) ou entomófagas (predadores de outros insectos). Os Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas) e os Sternorrhyncha (psilídeos, moscas brancas, pulgões e cochonilhas) são fitófagos. O desenvolvimento pós-embrionário dos Hemiptera

ocorre por hemimetabolia (Triplehorn & Johnson, 2005). O aparelho bucal surge na frente da cabeça na subordem Heteroptera, de trás da cabeça em Auchenorrhyncha e (quando presente) entre as procoxas dos Sternorrhyncha (Schuh & Slater, 1995).

1.3.1. Subordem Heteroptera: Pentatomorpha

Os Heteroptera são um dos raros grupos que tem atraído considerável atenção e esforço por vários entomologistas, os quais têm realizado intensas revisões sobre a biologia e taxonomia da subordem (Poisson, 1951; Carver et al., 1991; Schuh & Slater, 1995). Os Heteroptera são divididos em sete infraordens monofiléticas e as relações entre elas foram amplamente discutidas por Wheeler et al. (1993) baseando-se nos caracteres morfológicos extraídos dos trabalhos de Cobben (1968, 1978).

Os Pentatomomorpha compreendem cerca de 15.000 espécies em todo o mundo (Dolling, 1991; Schaefer, 1990; Schuh & Slater, 1995). Todos os taxa dessa infra-ordem são terrestres e a grande maioria fitófagos. Dentre os Heteroptera, os Pentatomomorpha ocupam a posição mais distal entre as sete infraordens, com os Cimicomorpha como seu grupo irmão (Schuh, 1979; Wheeler et al., 1993).

Até mesmo as relações filogenéticas e o número de superfamílias dos Pentatomomorpha são incertos. Dependendo dos autores são reconhecidas quatro (Schaefer, 1964), cinco (Stys, 1961, 1967; Schaefer, 1990; Schuh & Slater, 1995), seis (Carver, et al., 1991; Henry, 1997) ou sete (Schuh, 1986; Henry & Froeschner, 1988; Li & Zheng, 1994) superfamílias. Recentemente, Henry (1997) usando dados morfológicos, e Li et al. (2005), dados moleculares, reconheceram seis superfamílias (Aradoidea, Pentatomoidea, Coreoidea, Pyrrhocoroidea, Idiostoloidea

e Lygaeoidea), colocando os Piesmatoidea dentro de Lygaeoidea. Destas, somente Aradoidea e Pentatomoidea são, reconhecidamente, monofiléticas.

A família Pentatomidae é uma das maiores dentre os Heteroptera, com cerca de 4.120 espécies descritas, o que corresponde a 11% das espécies estimadas dessa subordem (Schuh & Slater, 1995). Os Pentatominae compreendem a maior subfamília e seus membros são fitófagos. Eles são chamados insetos fedorentos “stink bugs” porque produzem um odor desagradável pelas glândulas de odores que se abrem na região da metacoxa ou no caso de algumas ninfas, no dorso do abdômen (Borror et al., 1992).

Os Pentatomidae se alimentam inserindo o estilete na fonte alimentar para sugar os nutrientes. Dessa forma, esses insetos causam injúrias nos tecidos das plantas, resultando em plantas murchas e, em muitos casos, aborto de frutos e sementes. Durante a alimentação eles também podem transmitir patógenos, aumentando o seu potencial de dano. Por isso, os membros dessa família estão entre as principais pragas agrícolas, já que se alimentam em várias espécies de plantas de importância econômica (Borror et al., 1992).

1.3.2. Subordem Auchenorrhyncha

A subordem Auchenorrhyncha possui aproximadamente 25.000 espécies descritas, todas elas com hábito fitófago, alimentando-se de fluidos de plantas vasculares e com poucas espécies alimentando de fungos. Apesar de possuir várias características morfológicas únicas, ainda existem controversas a respeito da monofilia do grupo. A monofilia da subordem Auchenorrhyncha tem sido suportada por Kristensen (1975, 1981), Hennig (1981) e Carver et al. (1991). Entretanto, Hamilton (1981, 1996) manteve os Sternorrhyncha como grupo irmão de uma linhagem dos Auchenorrhyncha (os Cicadomorpha). Alguns caracteres morfológicos

e do DNA indicam relação próxima entre a outra linhagem de Auchenorrhyncha (os Fulgoromorpha) e os Heteroptera (Bourgoin et al., 1997). Dessa forma, as infraordens Cicadomorpha e Fulgoromorpha são consideradas monofiléticas, entretanto, são mais proximamente relacionadas com as outras subordens de Hemiptera, o que distancia a hipótese de monofilia para os Auchenorrhyncha.

Os Cicadomorpha são divididos em três superfamílias: Cicadoidea, Cercopoidea e Cicadelloidea (ou Membracoidea). Essa última família tem sido a mais estudada em termos de taxonomia e comportamento. Um completo trabalho sobre as relações filogenéticas entre as famílias é apresentado por Deitz & Dietrich (1993).

1.4. Morfologia do sistema reprodutor masculino nos insetos

Paralelamente a grande radiação adaptativa dos insetos, a pressão seletiva sexual atuou gerando uma 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).

Em geral, o sistema reprodutor masculino nos Hymenoptera é constituído por dois testículos, duas vesículas seminais, ductos deferentes, ducto ejaculatório e, geralmente, duas glândulas acessórias. Os testículos podem variar de esféricos a fusiformes, sendo bem desenvolvidos nas pupas e nos adultos jovens, sofrendo, comumente, uma degeneração gradativa até a completa regressão ao final da maturidade sexual. Eles são constituídos por folículos, os quais podem variar em número, forma e tamanho nos diferentes grupos taxonômicos. Por exemplo, todas

as espécies de vespas parasíticas já observadas têm apenas um folículo (Fiorillo et al., 2008). Já em Vespidae, Crabronidae, Colletinae, Andreninae e Halictinae têm sido observados três folículos (Ferreira et al., 2004; Moreira et al., 2008). Em outras abelhas como Mellitinae, Apinae e alguns Megachilinae ocorrem quatro folículos (Ferreira et al., 2004). Entretanto, em Formicidae este número varia de um (*Gnamptogenys striatula*; observação pessoal) a onze (Wheller & Krutzsch, 1992). Apesar desse número ser constante dentro do grupo, podem existir espécies com número de folículos discrepantes, como, por exemplo, *Apis mellifera* que possui cerca de 250 folículos (Chapman, 1998) e *Hypanthidium foveolatum* (Megachilinae) que possui, em média, 28 folículos por testículo (Gracielle et al., 2009).

Nos insetos, os espermatozóides são transferidos dos testículos para as vesículas seminais onde ficam armazenados até a cópula. As vesículas seminais são uma porção especializada do ducto deferente, que nos Hymenoptera pode compreender desde quase todo o ducto deferente ou apenas uma determinada região dilatada dele. As glândulas acessórias, assim como os demais órgãos do sistema reprodutivo, apresentam grande diversidade morfológica, podendo ser esféricas, ovaladas, tubulares, ou mesmo estarem ausentes como nas abelhas da tribo Meliponini (Kerr, 1969; Ferreira et al., 2004).

Há poucos trabalhos descrevendo aspectos anatômicos do sistema reprodutor masculino de Hymenoptera e Hemiptera. Ferreira et al. (2004) estudaram 51 espécies de abelhas e as agruparam em quatro tipos de acordo com as diferenças anatômicas das estruturas reprodutivas. Ainda dentre os Apoidea, alguns trabalhos descreveram em detalhes a histologia do sistema reprodutor em abelhas (Dallacqua & Cruz-Landim, 2003; Araújo et al., 2005a), vespas esfeciformes (Moreira et al., 2008) e parasíticas (Baer & Boomsma, 2004; Damiens & Boivin, 2005; Fiorillo et al., 2008). Dentre os Vespidae, a morfologia do sistema reprodutor masculino foi analisada em algumas espécies (Dirks & Sternburg, 1972; Bushrow et al., 2006).

Boomsma et al. (2005) apresentaram uma ampla revisão sobre a evolução do trato reprodutor masculino em insetos sociais. Os trabalhos realizados demonstram vários caracteres morfológicos derivados dos sistemas reprodutores de machos capazes de suportar análises comparativas entre espécies e apontados como promissores para serem usados em estudos filogenéticos.

1.5. Caracteres estruturais e ultra-estruturais dos espermatozóides

A análise filogenética usando características morfológicas de estruturas internas vem ganhando o interesse dos biólogos celulares e sistematas. Um exemplo dessas estruturas é o espermatozóide. Esta célula fornece um conjunto de dados não tradicionais, tendo seus caracteres uma natureza mais conservada que os caracteres morfológicos comumente utilizados. Por isso a morfologia dos espermatozóides tem sido utilizada para resolver problemas filogenéticos e taxonômicos em vários grupos animais, incluindo os insetos (Dallai & Afzelius, 1995; Jamieson et al., 1999) e, pontualmente nos Hymenoptera (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 2000a,b; 2008b; Zama et al., 2007).

Jamieson et al. (1999) propuseram uma filogenia para os holometabolos utilizando caracteres morfológicos e moleculares (Kristensen, 1981; Whiting et al., 1997), superpostos a caracteres ultra-estruturais dos espermatozóides, apomórficos para cada ordem. Estes pesquisadores não definiram uma sinapormorfia consistente para os Hymenoptera baseada nos espermatozóides, entretanto sugeriram que a “inserção do perforatorium na cavidade anterior nuclear” ocorra nos grandes grupos ‘symphyta’ e Apocrita. Este caracter é apomórfico em relação aos holometabolos e provavelmente homoplástico em relação aos insetos, uma vez que também foi observado em Collembola e Orthoptera (Jamieson et al., 1999).

O primeiro trabalho comparativo da morfologia dos espermatozóides nos

Hymenoptera foi realizado por Quicke et al. (1992) e compreende cerca de 14 famílias representando 'symphyta', Aculeata e Parasítica. Nesse trabalho, os autores incluem uma matriz constituída por 13 caracteres, entretanto não sugerem uma filogenia fundamentada neles. Recentemente, outros trabalhos descritivos da morfologia dos espermatozóides em Hymenoptera, especialmente nos Aculeata, têm sido realizados visando a utilização desta fonte de caracteres para análise filogenética em diferentes níveis taxonômicos (Lino-Neto et al., 1999, Lino-Neto, 2000a,b; Lino-Neto & Dolder, 2001a,b; Zama et al., 2001, 2004, 2005, Báó et al., 2004; Ferreira et al., 2004; Moreira et al., 2004; Araújo et al., 2005a,b; Fiorillo et al., 2005; Zama et al., 2007; Mancini et al., 2008; Lino-Neto et al., 2008b).

O espermatozóide típico de Hymenoptera é longo, medindo, em geral, entre 40 μm e 300 μm de comprimento (Quicke et al., 1992). Medidas morfométricas dos espermatozóides têm contribuído para a taxonomia de insetos, visto que são bem conservadas intra-especificamente. Este é constituído de cabeça e cauda, sendo a cabeça formada pelo acrossomo e o núcleo, enquanto que a cauda, ou flagelo, geralmente é formada pelo axonema, de padrão 9 + 9 + 2 microtúbulos, o adjunto do centríolo, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios.

A morfologia dos espermatozóides em Hymenoptera foi descrita em detalhes em vários grupos de Hymenoptera como em symphyta (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1999a; Lino-Neto et al., 2008b), em Aculeata, como nas abelhas (Rothschild, 1955; Cruz-Höfling et al., 1970; Lensky et al., 1979; Peng et al., 1992, 1993; Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005; Báó et al., 2004; Araújo et al., 2005b; Fiorillo et al., 2005; 2008a) e em algumas formigas (Thompson & Blum, 1967; Caetano, 1980; Wheeler et al., 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini et al., 2006; Moya et al., 2007) e nos Apocrita parasítica os estudos dos espermatozóides concentrou-se em alguns Chalcidoidea (Hogge & King, 1975;

Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008b), em algumas espécies de Ichneumonoidea (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992), em um Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b), em um Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000) e em Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Dentre os Hemiptera, algumas espécies representantes da infraordem Cicadomorpha (Cicadidae, Cercopidae e Cicadellidae) e Fulgoromorpha, tiveram a ultra-estrutura dos espermatozoides descrita (Folliot & Maillet, 1970; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006).

Apesar dos trabalhos serem restritos a algumas espécies, portanto ainda pouco representativos se considerarmos o grande número de espécies e a grande diversidade dos Hymenoptera e Hemiptera, algumas características ultra-estruturais possibilitaram inferências dentro de alguns grupos.

1.6. Referências Bibliográficas

- Adiyodi KG; Adiyodi RG (1975) Morphology and cytology of the accessory sex gland in invertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 47: 353-398.
- Alexander BA (1992) An exploratory analysis of cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *J. Hym. Res.* 1: 25-61.
- Alexander BA; Michener CD (1995) Phylogenetic studies of the families of short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas Sci. Bull.* 55: 377-424.
- Araújo VA; Zama U; Neves CA; Dolder H; Lino-Neto J (2005a) Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22 (4): 193-201.
- Araújo VA; Zama U; Dolder H; Lino-Neto J (2005b) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22 (3): 137-141.
- Austin AD; Downton M (2000a) The Hymenoptera: An introduction. In: Austin AD; Downton M. (Eds.) *Hymenoptera: Evolution, biodiversity and biological control*. CSIRO; Collingwood, Australia, xi + 468 pp.
- Austin AD; Downton M (2000b) *Hymenoptera: Evolution, biodiversity and biological control*. CSIRO; Collingwood, Australia, xi + 468 pp.
- Baer B; Boomsma JJ (2004) Mating system evolution and male reproductive investment in fungus-growing ants. *Behav. Ecol.* 15: 426-432.
- Baccetti B; Dallai R (1978) The evolution of myriapod spermatozoa. *Abh. Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg* 21(22): 203-217.
- 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. Submicr. Cytol. Pathol.* 36: 23-28.
- Basibuyuk HH; Quicke DLJ (1997) Hamuli in the Hymenoptera (Insecta) and their phylogenetic implications. *J. Nat. Hist.* 31: 1563-1585.
- Baur A; Buschinger A; Zimmermann FK (1993) Molecular cloning and sequencing of 18S rDNA gene fragments from six different ant species. *Insect. Soc.* 40: 325-335.
- Boomsma JJ; Baer B; Heinze J (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 395-420.
- Borror DJ; Triplehorn CA; Johnson NF (1989) *An introduction to the study of insects* (6th Ed.) Saunders College Publishing, Philadelphia, Pennsylvania, xvi + 875 pp.
- Borror DJ; Triplehorn CA; Johnson NF (1992) *An introduction to the study of insects*. Saunders, Harcourt Brace.
- Bourgoin TJ; Steffan-Campbell D; Campbell BC (1997) Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Auchenorrhyncha). The enigmatic Tettigometridae: Evolutionary affiliation and historical biogeography. *Cladistics* 13: 207-224.

- Brothers DJ (1975) Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to the Mutillidae. *Uni. Kan. Sci. Bull.* 50: 483-648.
- Brothers DJ (1999) Phylogeny and evolution of wasps, ants and bee (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zool. Scr.* 28: 233-249.
- Brothers DJ; Carpenter JM (1993) Phylogeny of Aculeata, Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). *J. Hym. Res.* 2: 227-304.
- Brues CT (1921) Correlation of taxonomic affinities with food habits in Hymenoptera, with special reference to parasitism. *Am. Nat.* 55: 134-164.
- Burke J (1985) *The day the universe changed*. Little, Brown, and company; Boston, Massachusetts, 352 pp.
- Burke HE (1917) *Oryssus* is parasitic. *Proceedings of the entomological society of Washington*, 19: 87-89.
- Bushrow ES; Fuller CL; Cowan DP; Byrd CA (2006) Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invert. Biol.* 125(4): 354-362.
- Caetano FH (1980) Ultra-estrutura dos espermatozóides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). *Naturalia* 5 : 1005-1011.
- Cameron, SA (1991) A new tribal phylogeny of the Apidae inferred from mitochondrial DNA sequences. In: D.R. Smith (ed). *Diversity of the genus Apis*. Colorado, Westview Press, Boulder. pp. 71-78.
- Cameron SA (1993) Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad.* 90: 8687-8691.
- Carpenter JM (1982) The phylogenetic relationship and natural classification of the Vespoidea (Hymenoptera). *Syst. Entomol.* 7: 11-38.
- Carpenter JM (1986) Cladistics of the Chrysidoidea (Hymenoptera). *J. New York Entomol. Soc.* 94: 303-330.
- Carpenter JM (1991) Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. pp. 7-32. In: Ross KG; Matthews RW (Eds.) *The social biology of wasps*. Cornell University Press, Ithaca, New York, xvii + 678 pp.
- Carpenter JM (1997) Phylogenetic relationship among European *Polistes* and the evolution of social parasitism (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae). *Mém. Mus. Natn. Hist. Nat.* 173: 135-161.
- Carpenter JM; Rasnitsyn AP (1990) Mesozoic Vespidae. *Psyche*, 97: 1-20.
- Carpenter JM; Wheeler WC (1999) Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zool. Scr.* 28: 251-260.
- Carver M; Gross GF; Woodward TE (1991) Hemiptera (bugs, leaf-hoppers, cicadas, aphids, scale insects, etc.). In: Naumann, I.D. (Ed.), *The insects of Australia*. Melbourne University Press, Melbourne, Australia, pp. 429-509.
- Chapman RF (1998) *The Insects: Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Chauvin G; Agoze M; El Hamon C; Huignard J (1988) Ultrastructure des espermatozoïdes des males haploïdes et diploïdes de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera : Ichneumonidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 17 : 359-366.
- Chavarría G; Carpenter JM (1994) "Total Evidence" and the evolution of highly social bees. Cladistics 10: 229-258.
- Chawanji AS; Hodgson AN; Villet MH (2005) Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 37: 257-267.
- Chawanji AS; Hodgson AN; Villet MH (2006) Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 38: 373-388.
- Cherrett JM (1986) History of the leaf-cutting ant problem. In: C.S. Lofgren and R.K. Vander-Meer R.K. (eds). Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management. Boulder, Westview Press. pp. 10-17.
- Cobben RH (1968) Evolutionary trends in Heteroptera. Part 1: Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. Centre for agricultural publishing and documentation, Wageningen, the Netherlands, 475 pp.
- Cobben RH (1978) Evolutionary trends in Heteroptera. Part 2: Mouthpart structures and feeding strategies. Veeman, Wageningen, the Netherlands, 407 pp.
- Crozier RH; Jermini LS; Chiotis M (1997) Molecular evidence for Jurassic origin of ants. Naturwissenschaften, 84: 22-23.
- Cruz-Höfling MA ; Cruz-Landim C ; Kitajima EW (1970) The fine structure of spermatozoa from the honey bee. An. Acad. Bras. Ciênc. 42: 69-78.
- Dallacqua RP; Cruz-Landim C (2003) Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Anat. Hist. Embryol. 32: 276-281.
- Dallai R; Afzelius BA (1995) Phylogeny significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: B.G.M. Jamieson *et al.* (eds) Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Mem. Mus. Natn. Hist. Nat. 16: 291-296.
- Damiens D; Boivin G (2005) Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. Physiol. Entomol. 30: 241-247.
- Darwin CR (1859) On the origin of the species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life. J. Murray; London, UK; ix + [1] + 502 pp.
- Deitz LL; Dietrich CH (1993) Superfamily Membracoidea (Homoptera: Auchenorrhyncha). I. Introduction and revised classification with new family-group taxa. Syst. Entomol. 18: 287-296.
- Derr JN; Davis SK; Woolley JB; Wharton RA (1992) Variation and the phylogenetic utility of the large ribosomal subunit of mitochondrial DNA from the insect order Hymenoptera. Mol. Phylogenet. Evol. 1: 136-137.
- Dirks TF; Sternburg JG (1972) Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 1(4): 315-320.
- Dobzhansky TG (1937) Genetics and the origin of species. Columbia University Press; New York, New York; xvi + 364 pp.

- Dolling WR (1991) The Hemiptera. Natural History Museum Publication. Oxford University Press, Oxford.
- Dowton M; Austin AD (1999) Models of analysis for molecular dataset for the reconstruction of basal hymenopteran relationships. *Zool. Scr.* 28: 69-74.
- Dowton M; Austin AD; Dillon N; Bartowsky E (1997) Molecular phylogeny of the apocritan wasp: the Proctotrupomorpha and Evaniomorpha. *Syst. Entomol.* 22: 245-255.
- Dupuis C (1974) Pierre André Latreille (1762-1833): The foremost entomologist of his time. *Annu. Rev. Entomol.* 19: 1-13.
- Engel MS (2001) A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bull. Ame. Mus. Nat. His.* 259: 1-192.
- Evans MA; Evans HE (1970) William Morton Wheeler, Biologist. Harvard University Press; Cambridge, Massachusetts, xi + [2] + 363 pp.
- Fabricius JC (1778) *Philosophia entomologica: Sistens scientiae fundamenta; adiectis definitionibus, exemplis, observationibus, adumbrationibus.* Bohnii; Hamburgi et Kilonii (Hamburg and Cologne), Germany, [12] + 178 pp.
- Farris JS (1974) Formal definitions of paraphyly and polyphyly. *Syst. Zool.* 23: 548-554.
- Ferreira A; Abdalla FC; Kerr WEC; Cruz-Landim C (2004) Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* 33: 569-576.
- Fiorillo B; Coelho AAM; Lino-Neto J; Báo SN (2005) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37: 75-81.
- Fiorillo BS; Lino-Neto J; Báo SN (2008) Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39: 1271-1280.
- Folliot R; Maillet PL (1970) Ultrastructure de la espermiogênese et du spermatozoïde de divers insectes Homoptères. In: Baccetti B (ed.), *Comparative Spermatology.* Academic Press, New York, pp. 289-300.
- Gadagkar R (2001) The social biology of *Ropalidia marginata*: Toward understanding the evolution of eusociality. Harvard University Press; Cambridge, Massachusetts, xiii + 368 pp.
- Gaston KJ (1991) The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology* 5: 283-296.
- Gauld ID; Bolton B (1988) The Hymenoptera. Oxford University Press; Oxford, UK, xi + 322 pp.
- Geoffroy Saint-Hilaire E; Cordier PLA; Audouin JV (1833) Discours prononcés au nom de l'institut, du Muséum d'Histoire naturelle et de la société entomologique de France sur la tombe de M. Latreille décédé Le février 1833. *Ann. Sci. Nat.* 28: 433-445.
- Gibson GAP (1985) Some prothoracic and mesothoracic structures important for phylogenetic analysis of Hymenoptera, with a review of terms used for the structures. *Can. Entomol.* 117: 1395-1443.
- Godfray HCJ (1994) Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press; Princeton, New Jersey, 473 pp.

- Goulet H; Huber JT (1993) Hymenoptera of the world: an identification guide to families. Agriculture Canada; Ottawa, Canada, vii + 688 pp.
- Gourlay ES (1951) Notes on insects associated with *Pinus radiata* in New Zealand. Bull. Entomol. Res. 42: 21-22.
- Gracielle IMS; Fiorillo BS; Lino-Neto J; Báo S (2009) Morphology male reproductive system and spermatogenesis of the *Hypanthidium rubriventris* (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). Micron *In press*.
- Grassé DG (1982) Ejaculate esterase-6 and initial sperm use by female *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 27: 641-650.
- Grimaldi, DA; Engel MS (2005) Evolution of insects. Cambridge University Press, Cambridge, 755 pp.
- Grissel EE (1999) Hymenopteran biodiversity: some alien notions. Amer. Entomol. 45: 235-244.
- Hamilton KGA (1981) Morphology and evolution of the rhynchotan head (Insecta: Hemiptera, Homoptera). Can. Entomol. 113: 953-974.
- Hamilton KGA (1996) Cretaceous Homoptera from Brazil: Implications for classification. pp. 89-110. In: Schaeffer CW (ed.), Studies on hemipteran phylogeny. Entomological Society of America (Thomas Say Publications), Lanham, Maryland, iii + 244 pp.
- Handlirsch A (1906) Die fossilen Insekten und die Phylogenie der rezenten Formen. Ein Handbuch für Paläontologen und Zoologen. Leipzig, W.Engelmann (ed.). Leipzig, 640 pp.
- Hanson PE (1995) Economic importance of Hymenoptera. In: P. E. Hanson and I. D. Gauld (Eds) The Hymenoptera of Costa Rica. New York, Oxford University Press. pp. 89-100.
- Hanson PE; Gauld ID (1995) The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press; Oxford, UK, xx + 893 pp.
- Hennig W (1965) Phylogenetic systematics. Annu. Rev. Entomol. 10: 97-116.
- Hennig W (1966) Phylogenetic systematics. University of Illinois Press; Chicago, Illinois, [2] + 263 pp.
- Hennig W (1981) Insect phylogeny. Wiley; Chichester, UK, xxii + 514 pp.
- Henry TJ; Froeschner RC (1988) Catalog of the Heteroptera, or true bugs, of Canada and the continental United States. Brill, Leiden, The Netherlands.
- Henry TJ (1997) Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. Ann. Entomol. Soc. Am. 90: 275-301.
- Heraty JM; Woolley JB; Darling DC (1994) Phylogenetic implications of the mesofurca and mesopostnotum in Hymenoptera. J. Hym. Res. 3: 241-277.
- Hoagge MAF; King PE (1975) The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Submicrosc. Cytol. 7: 81-96.
- Iwata K (1972) Evolution of instinct: Comparative ethology of Hymenoptera. Mano Shoten; Kanagawa Prefecture, Japan; iii + [3] + 503 pp.

- Iwata K (1976) Evolution of instinct: Comparative ethology of Hymenoptera. Amerind Publishing; New Delhi, India; ix + [1] + 535 pp.
- Jamielson BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999) Insects: Their spermatozoa and phylogeny. Science Publishers, New Hampshire, p. 554.
- Johnson NF (1988) Midcoxal articulations and the phylogeny of the order Hymenoptera. Ann. Entomol. Soc. Am. 81: 870-881.
- Kerr WE (1969) Some aspects of the evolution of social bee (Apidae). Evol. Biol. 3: 119.
- Königsmann E (1976) Das Phylogenetische system der Hymenoptera. Teil 1: Einführung, Grundplanmerkmale, Schwestergruppe und Fossilfund. Dtsch. Entomol. Z. 23: 253-279.
- Königsmann E (1977) Das Phylogenetische system der Hymenoptera. Teil 2: Symphyta. Dtsch. Entomol. Z. 24: 1-40.
- Königsmann E (1978a) Das Phylogenetische system der Hymenoptera. Teil 3: Terebrates (Unterordnung Apocrita). Dtsch. Entomol. Z. 25: 1-55.
- Königsmann E (1978b) Das Phylogenetische system der Hymenoptera. Teil 4: Aculeata (Unterordnung Apocrita). Dtsch. Entomol. Z. 25: 365-435.
- Kristensen NP (1975) The phylogeny of hexapod "orders". A critical review of recent accounts. Zeits. Zool. Syst. Evol. 13: 1-44.
- Kristensen NP (1981) Phylogeny of insect orders. Annu. Rev. Entomol. 26: 135-157.
- Kristensen NP (1991) Phylogeny of extant hexapods. In: Naumann et al. (eds). *The insect of Australia*. Melbourne, Melbourne University Press. pp. 125-140.
- Kristensen NP (1995) Forkunrty year's insect phylogenetic systematics. Hennig's Kritische Bemerkungen' and subsequent developments. Zool. Beitrage 36: 83-124.
- Kristensen NP (1999) Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. Eur. J. Entomol. 96: 237-253.
- Krombein KV; Hurd PD; Smith JDR; Burks BD (1979) Catalog of Hymenoptera in american north of Mexico. Smithsonian Institution Press; Washington, D.C., xvi + 2735 pp.
- Kubo-Irie M; Nakazawa M; Mohri H (2003) Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). J. Insect Physiol. 49: 983-991.
- LaSalle J; Gauld ID (1993) Hymenoptera and biodiversity. CABI Publishing, Wallingford, UK, xi + 348 pp.
- Latreille PA (1796) Précis des caractères génériques des insectes disposés dans um ordre naturel, & F. Bourdeaux; Brive, France, xiii [1] + 201 + [7] pp.
- Lensky YE; Ben-David E; Schindler H (1979) Ultrastructure of the spermatozoa of the mature drone bee. J. Apic. Res. 18: 264-271.
- Li XZ; Zheng LY (1994) Phylogenetic analysis of Pentatomomorpha superfamily relationships (Heteroptera). In: The Zoological Society of China et al. (Eds.), Sixtieth anniversary of the founding of China Zoological Society. Memorial volume dedicated to the birthday of the late Prof. Sician Chen (Z. Chen). China Science and Technology Press, pp. 1-9.

- Li HM; Deng RQ; Wang JW; Chen ZY; Jia FL; Wang XZ (2005) A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 313-326.
- Lino-Neto J; Dolder H (2001a) Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scr.* 30: 89-96.
- Lino-Neto J; Dolder H (2001b) Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 82: 159-164.
- Lino-Neto J; Dolder H (2002) Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* Bauren (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34: 124-128.
- Lino-Neto J; Báo SN; Dolder H (1999) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 253-259.
- Lino-Neto J; Báo SN; Dolder H (2000a) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81: 205-211.
- Lino-Neto J; Báo SN; Dolder H (2000b) Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell* 32: 322-327.
- Lino-Neto J; Zama U; Mancini K (2008a) Morfologia dos espermatozoides de Hymenoptera. In: Vilela EF; Santos IA; Schoereder JH; Campos LAO; Lino-Neto J (Org.). *Insetos Sociais: Da Biologia à Aplicação*. 1ª ed. Viçosa-MG: UFV, 2008, v. 1, p. 150-173.
- Lino-Neto J; Dolder H; Mancini K; Mercati D; Dallai R (2008b) The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185–193.
- Lomholdt O (1982) On the origin of the bees (Hymenoptera: Apidae, Sphecidae). *Entomol. Scandinavica* 13:185-190.
- Lyell C (1833) Principles of geology; being an attempt to explain the former changes of the earth's surface, by reference to causes now in operation. J. Murray; London, UK; [vol. 1, 1830] xv + 511 pp., [vol. 2, 1832] xxii + 330 pp., [vol. 3, 1833] xxxi + [1] + 398 + 109 pp.
- Malyshev SI (1968) Genesis of the Hymenoptera and phase of their evolution. London, Methuen.
- Mancini K; Lino-Neto J; Campos LAO; Dolder H (2006) Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.* 53: 333-338.
- Mancini K; Lino-Neto J; Dolder H; Dallai R (2008) Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38: 54-59.
- Matsuura M; Yamane S (1990) Biology of the Vespine wasps. Springer Verlag; Berlin, Germany, xx + 323 pp.
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. Columbia University Press; New York, xiv + 344 pp.

- Melo GAR (1999) Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera) with emphasis on the crabronid wasps. *Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 14:1-55.
- Melo GAR; Gonçalves RB (2005) Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Rev. Bras. Zool.* 22(1): 153-159.
- Michener CD (1944) Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 82: 151-326.
- Michener CD; Sokal RR (1957) A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11: 130-162.
- Michener CD (2000) *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, xvi + [1] + 913 pp.
- Moreira J; Zama U; Lino-Neto J (2004) Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21: 185-189.
- Moreira PA; Araújo VA; Zama U; Lino-Neto J (2008) Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37(4): 429-435.
- Moya J; Mancini K; Lino-Neto J; Delabie J; Dolder H (2007) Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.* 88(3): 181-187.
- Muller H (1872) Anwendung der Darwinschen Lehre auf Bienen. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereines der Preussischen Rheinlande und Westphalen* 29: 1-96.
- Newman TM; Quicke DLJ (1999a) Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.* 8: 35-47.
- Newman TM; Quicke DLJ (1999b). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.* 8: 197-203.
- Newman TM; Quicke DLJ (2000) Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *J. Hym. Res.* 9: 62-70.
- Nuttall MJ (1980) Insect parasites of *Sirex*. *Forest and timber insects in New Zealand*, 47.
- O'Neill KM (2001) *Solitary wasps: behavior and natural history*. Cornell University Press; Ithaca, New York, xiii+ [1] + 406 pp.
- Peng CYS; Yin CM; Yin LRS (1992) Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.* 17: 269-276.
- Peng CYS; Yin CM; Yin LRS (1993) Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.* 18: 93-101.
- Poisson R (1951) *Ordre de Hétéroptères*. pp. 1657-1803. In: Grassé PP (ed.), *Traité de Zoologie*, Tome 10. Masson et Cie, Paris, France, pp. 978-1948.
- Powell JA; Turner WJ (1975) Observations on oviposition behavior and host selection in *Orussus occidentalis* (Hymenoptera: Siricoidea). *J. Kan. Entomol. Soc.* 48: 299-307.

- Prentice M (1998) The comparative morphology and phylogeny of apoïd wasps (Hymenoptera: Apoïdeia). Ph. D. Dissertation. University of California, Berkeley, California, 1439 pp.
- Quicke DLJ; Ingram SN; Baillie HS; Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). Zool. Scr. 21: 381-402.
- Quicke DJL (1997) Parasitic wasps. Chapman and Hall; London, UK, xvi + [1] + 470 pp.
- Rasnitsyn AP (1964) New Triassic Hymenoptera from Central Asia. Paleontol. Zhurnal 88-86.
- Rasnitsyn AP (1969) The origin and evolution of lower Hymenoptera. Trudy Paleontologicheskogo Instituta, Akademii Nauk SSSR 123: 1-196.
- Rasnitsyn AP (1980) Origin and evolution of hymenopterous insects. Trudy Paleontologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR 174: 1-191.
- Rasnitsyn AP (1988) An outline of the evolution of the hymenopterous insects (Order Vespida). Orient Insects 22: 115-145.
- Rasnitsyn AP (2002) Superorder Vespoïdeia Laicharting, 1781. Order Hymenoptera Linné, 1758 (=Vespida Laicharting, 1781). Pp. 242-254. In: Rasnitsyn AP; Quicke DLJ (eds.), History of Insects. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, the Netherlands, xii + 517 pp.
- Rawlings GB (1957) *Guiglia schauinslandi* (Ashmead), a parasite of *Sirex noctilio* (Fabricius) in New Zealand. Entomologist 90: 25-36.
- Ray J (1710) Historia Insectorum. A. & J. Churchill; London, UK, xv + [1] + 400 pp.
- Riek EF (1955) Fossil insects from the Triassic beds at Mt. Crosby, Queensland. Australian J. Zool. 3: 654-691.
- Rohwer SA; Cushman RA (1917) Idiogastra, a new suborder of Hymenoptera with notes on the immature stages of *Oryssus*. P. Entomol. Soc. Wash. 19: 89-98.
- Ronquist F (1999) Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta); The state of the art. Zool. Scr. 28: 3-11.
- Ronquist F; Rasnitsyn AP; Roy A; Eriksson K; Lindgren M (1999) Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. Zool. Scr. 28: 13-50.
- Ross HH (1936) The ancestry and wing venation of the Hymenoptera. Ann. Entomol. Soc. Am. 29: 99-109.
- Ross HH (1937) A generic classification of the Nearctic sawflies (Hym. Symphyta). Illinois Biol. Mon. 15: 1-173.
- Ross KG; Matthews RW (1991) The social biology of wasps. Cornell University Press, Ithaca, New York, xvii + 678 pp.
- Rothschild L (1955) The spermatozoa of the honey bee. Trans. R. Ent. Soc. Lond. 107: 289-294.
- Schaefer CW (1964) The morphology and higher classification of the Coreïdeia (Hemiptera-Heteroptera: parts I and II. Ann. Entomol. Soc. Am. 57: 670-684.

- Schaefer CW (1990) The Hemiptera of north América: what we do and do not know. In: Kosztarab M; Schafer CW (Eds.), Systematics of the North American insects and arachnids: status and needs. Contribution n° 3 to the National Biological Survey. Info. Ser. 90-1. Virginia Agricultural Experiment Station. Blacksburg. pp 105-118.
- Schedl W (1991) Hymenoptera, unterordnung Symphyta: Pflanzenwespen. Handbuch der Zoologie 31: 1-136.
- Schluter T (2000) *Moltenia rieki* n. gen., n. sp. (Hymenoptera: Xyelidae), a tentative sawfly from the Molteno formation (Upper Triassic), south Africa. Paleontol. Zeitschrift 74: 75-78.
- Schuh RT (1979) Review of Evolutionary trends in Heteroptera. Parte II. Mouthpart-structures and feeding strategies, by Cobben RH. Syst. Zool. 28: 653-656.
- Schuh RT (1986) The influence of cladistics on heteropteran classification. Annu. Rev. Entomol. 31: 67-93.
- Schuh RT; Slater JA (1995) The bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Schulmeister S (2003a) Review of morphological evidence on the phylogeny of basal Hymenoptera (Insecta), with a discussion of the ordering of characters. Biol. J. Linn. Soc. 79: 209-243.
- Schulmeister S (2003b) Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): Introducing robust-choice sensitivity analysis. Biol. J. Linn. Soc. 79: 245-275.
- Sheppard WS; McPherson BA (1991) Ribosomal DNA diversity in the Apidae. In: Smith, D. R. (ed.) *Diversity in the genus Apis*. Boulder, Westview Press. pp. 89-102.
- Sivinski J (1984) Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.), Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems. Academic Press, New York, pp. 85-115.
- Smith AB (1994) Systematics and the fossil record: documenting evolutionary patterns. Blackwell; Oxford, UK, viii + 223 pp.
- Sneath PHA; Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman; San Francisco, California; xv + 573 pp.
- Sokal RR; Sneath PHA (1963) Principles of numerical taxonomy. Freeman; San Francisco, California, xvi + 359 pp.
- Spradberry JP (1973) Wasps: An account of the biology and natural history of solitary and social wasps, with particular reference to those of the British Isles. Sidgwick and Jackson; London, UK, xvi + 408 pp.
- Starr CK (1985) A simple pain scale for field comparison of hymenopteran stings. J. Entomol. Sci. 20: 225-231.
- Sturtevant AH (1942) The classification of the genus *Drosophila*, with description of nine new species. University of Texas Publication 4213: 6-51.
- Stys P (1961) Morphology of the abdomen and female ectodermal genitalia of the trichophorous Heteroptera and bearing on their classification. Verh. XI Int. Entomol. Kongr. Wien. 1: 37-43.

- Stys P (1967) Monograph of Malcinae, with reconsideration of morphology and phylogeny of related groups (Heteroptera, Malcidae). *Acta Entomol. Mus. Natl. Prag.* 37: 351-516.
- Swammerdam J (1685) *Historia Insectorum Generalis, in qua quaecunque ad Insecta eorumque mutationes spectant, dilucide ex sanioris philosophiae & experientiae principiis explicantur. Cum figuris & indicibus necessariis.* Jordanum Luchtman; Lugduni, Batavorum (Leiden, the Netherlands), 16 + 212 + [17] pp., 13 pls.
- Thompson TE; Blum MS (1967) Structure and behavior of spermatozoa of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60: 632-642.
- Triplehorn CA; Johnson N (2005). *Introduction to the Study of Insects.* Belmont, California, Thomson Brooks/Cole.
- Vilhelmsen L (1996) The preoral cavity of lower Hymenoptera (Insecta): comparative morphology and phylogenetic significance. *Zool. Scr.* 25: 143-170.
- Vilhelmsen L (1997) The phylogeny of lower Hymenoptera (Insecta), with summary of the early evolutionary history of the order. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 35: 49-70.
- Vilhelmsen L (2003) Phylogeny and classification of the Orussidae (Insecta: Hymenoptera) a basal parasitic wasp taxon. *Zool. J. Linn. Soc.* 139: 337-418.
- Wheeler DE; Krutzsch PH (1992) Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* 211: 307-317.
- Wheeler DE; Crichton ED; Krutzsch PH (1990) Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.* 206: 343-350.
- Wheeler WC; Schuh RT; Bang R (1993) Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. *Entomol. Scand.* 24: 121-137.
- Wheeler WC; Whiting M; Wheeler QD; Carpenter JM (2001) The phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics* 17: 113-169.
- Whitfield JB; Johnson NF; Hamerski MR (1989) Identity and phylogenetic significance of the metapostnotum in nonaculeate Hymenoptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 663-673.
- Whitfield JB (1998) Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 129-151.
- Whiting MF; Carpenter JC; Wheeler QD; Wheeler WC (1997) The Strepsitera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 46: 1-68.
- Zama U; Lino-Neto J; Dolder H (2001) Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10: 261-270.
- Zama U; Lino-Neto J; Dolder H (2004) Structure and Ultrastructure of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36: 29-41.
- Zama U; Brito P; Lino-Neto J; Campos LAO; Dolder H; Báo SN (2005) The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37: 313-321.

Zama U; Moreira J; Báo SN; Campos LAO; Dolder H; Lino-Neto J (2007) Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod. Struct. Dev.* 36: 304-316.

2. Objetivos

Considerando a diversidade morfológica do sistema reprodutor e dos espermatozóides na classe Insecta (especificamente nas ordens Hymenoptera e Hemiptera), este trabalho tem como objetivos:

- Descrever a anatomia e a histologia dos sistemas reprodutores nas seguintes espécies de Hymenoptera: *Thygater (Thygater) analis*, *Melipona segmentaria* e *Polistes versicolor versicolor*;
- Caracterizar a estrutura e a ultra-estrutura dos espermatozóides em espécies de Hymenoptera: *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, *Thygater (Thygater) analis* e *Melipona segmentaria*; e em espécies Hemiptera: *Aethalion reticulatum* e *Largus rufipennis*;
- Descrever a morfologia dos espermatozóides polimórficos na família Largidae (Hemiptera) e suas implicações na competição de espermatozóides;
- Comparar os dados de estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides das espécies descritas neste trabalho, com aqueles existentes na literatura, procurando um padrão morfológico e/ou caracteres para serem incluídos em análises filogenéticas.

Capítulo 1

3.1. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae)

Vinícius Albano Araújo; Jane Moreira & José Lino-Neto

Artigo submetido à revista Micron

ABSTRACT. The ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* is described here for the first time within this genus. Testes and seminal vesicles were dissected and processed for transmission electron microscopy. In the testicular follicles, the spermatids are arranged in a maximum number of 32 for each cyst. The spermatozoa are slender and measure approximately 150 μm in length. The head are about 17 μm long and its is formed by the acrosome and the nucleus. The flagellum consists in an axoneme, two mitochondrial derivatives, two accessory bodies and, at the nucleus-flagellum transition, a symmetric centriolar adjunct. The axoneme presents the typical insect 9+9+2 microtubule pattern. In the terminal region, the central microtubules and nine doublets finish first, followed by the accessory microtubules. Both mitochondrial derivatives begin together and are inserted in the centriolar adjunct base. Along the middle region, the larger derivative has almost twice the area of the smaller one and includes a discrete paracrystalline region. At the tip, the smaller derivative ends before the larger one and both before the axoneme. The characters derived from the ultrastructure of the spermatozoa of *T. albitarse* show synapomorphies shared with the Apoidea and probably present apomorphic characters for the Crabroninae subfamily.

KEYWORDS: centriolar adjunct, apomorphic, mitochondrial derivative, Crabroninae.

1. Introduction

The Apoidea were divided into the families Apidae, Sphecidae (*Latu sensu*) and Heterogynaidae (Brothers, 1975). Lomholdt (1982), in his phylogenetic study of Apoidea, established the proposal of Bohart & Menke (1976) that the Sphecidae could be separated into the families, Sphecidae and Larridae (= Crabronidae). He also suggested that the Larridae constitute a sister-group of Apidae *s.l.* However, according to Ohl (1995), this hypothesis cannot be sustained, since it is supported by a symplesiomorphy based on the form of the shape of the salivary gland opening in the larval stages. Melo (1999) has shown more evidence that supports the hypothesis of monophily for the Crabronidae and its relation to the sister-group Apidae *s.l.* and suggested significant changes in the classification of the Crabronidae subfamilies. This represents an important advance, since there are few phylogenetic studies involving taxon below the family-status (Alexander, 1992; Nemkov and Lelej, 1996; Bohart, 2000). Recently, Brothers (1999), Melo (1999) and Melo and Gonçalves (2005) proposed a new, higher-level classification of Apoidea, recognizing four wasp families and a single bee family.

The Apoidea phylogeny is still not clear and, probably, many questions concerning this field will be solved with the new characters, besides those traditionally used in the phylogeny analyses. In insects, the ultrastructural diversity of the spermatozoa has furnished character sets, which could be used in phylogeny inferences (Dallai, 1974; Jamieson, 1987; Wheeler et al., 1990; Quicke et al., 1992; Dallai and Afzelius, 1993; Jamieson et al., 1999). In Aculeata, the morphology of the spermatozoa was described in some bees (Cruz-Hofling et al., 1970; Lensky et al., 1979; Peng et al., 1993; Lino-Neto et al., 2000a; Bao et al., 2004; Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Fiorillo et al., 2005; Araújo et al., 2005), wasps (Lino-Neto et al., 1999, 2000b; Lino-Neto and Dolder, 2001a,b; Zama et al., 2005b) and ants (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007). However, for the

spheciformes only in the genus *Microstigmus* (Crabronidae) (Zama et al., 2007) and *Sceliphron* (Sphecidae) (Zama et al., 2005b) has the spermatozoa morphology been described in detail, while in *Trypoxylon* only the nucleus-flagellum transition region was analysed (Zama et al., 2005c).

The *Trypoxylon* Latreille genus has a wide geographic distribution (Bohart and Menke, 1976) and more than 660 species have been reported (Hanson and Menke, 1995) in the *Trypoxylon* and *Trypargilum* Richards subgenera. Its nests are built with mud or using pre-existing cavities, such as those made in wood by other insects, and their nests are supplied with spiders (Bohart and Menke, 1976). This research describes, for the first time, the ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (subfamily Crabroninae) with the intention of indicating characters that can contribute to phylogeny analyses of the spheciformes, mainly in the taxa below family status.

2. Material and Methods

Eight adult males of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* were sampled in nests collected from buildings on the *campus* of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. The nests occupied were taken to the laboratory where they were kept until the adult's emergence.

2.1. Light microscopy: From each male, the suspension of the spermatozoa extracted from one of the seminal vesicles was spread on clean glass microscope slides and fixed for 20 minutes in solution 4% (wt/vol) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, the preparations were observed with a photomicroscope (Olympus, BX-60), equipped with phase contrast and 50 spermatozoa were photographed to be measured. To access

nucleus measurements, some of these preparations were stained during 15 min with 0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in PBS, washed, and mounted in 50% sucrose. They were examined with an epifluorescence microscope (Olympus, BX-60), equipped with a BP 360-370 nm excitation filter and 50 nuclei were photographed. All the measures were obtained with the software Image Pro-Plus®, version 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA).

2.2. Transmission electron microscopy: From each male, one of the seminal vesicles and one of the testes was fixed for 24 h, at 4 °C, in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 3% sucrose, 0.2% picric acid and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. After rising in buffer, they were post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h. Dehydration was carried out in acetone, followed by embedding in Epon 812 resin. Ultrathin sections were stained with the 2% uranyl acetate and 0.2% lead citrate in 1 N sodium hydroxide and observed with the LEO 906 transmission electron microscope.

3. Results

The spermatozoa of *Trypoxylon albitarse* are slender cells, measuring approximately 150 µm in length (Fig. 1). They comprises the head region, formed by an acrosome and a nucleus, and the flagellar region that includes an axoneme, the paired mitochondrial derivatives, two accessory bodies, and the transition nucleus-flagellum a centriolar adjunct.

The acrosome is anterior to the nucleus and are comprised by an acrosomal vesicle and a perforatorium (Fig. 3). The acrosomal vesicle is conic shaped and covers the perforatorium that has its base inserted into a cavity at the nucleus anterior extremity (Fig. 3 and 7). In cross sections, the acrosomal vesicle is circular

(Fig. 4-6) and, anteriorly, an electron lucid layer separates it from the perforatorium (Fig. 5). However, near the nucleus, this layer practically disappears, remaining only two regions at the perforatorium opposite sides (Fig. 6).

The nucleus is slender, homogeneous, with electron dense chromatin, and measured about 17 μm in length (Fig. 2). It presents a circular shape in the cross sections (Fig. 7 and 8) and its base is laterally pointed, where it is associated side by side with the centriolar adjunct and ends immediately above the axoneme (Fig. 9).

The nucleus-flagellum transition region is composed by the nuclear base, a centriolar adjunct and the anterior portions of the axoneme and both mitochondrial derivatives. The centriolar adjunct is compact and electron dense, measuring about 2 μm length, with approximately two of its anterior thirds juxtaposed to the nuclear lateral projection (Fig. 9-10). It extends laterally to the axoneme (Fig. 11) and is located between the nuclear base and at the beginning of both mitochondrial derivatives (Fig. 12), leading to this adjunct a symmetrical pattern.

The axoneme begins immediately below the nucleus' projection (Fig. 9) and follows the typical 9 + 9 + 2 pattern of microtubule arrangement. The nine single accessory microtubules are the most external, followed by the nine doublets and a central pair (Fig. 13). In the terminal region, the central microtubules and the nine doublets finish first, followed by the accessory microtubules (Fig. 14-16).

The two mitochondrial derivatives begin almost together and are inserted into the centriolar adjunct base (Fig. 12). In cross sections, in both ends they are circular and present approximately the same diameter (Fig. 12 and 14). However, along the middle region, the diameter of one is almost twice as big as the other's, and at the cross section it shows a constriction resembling the number eight, while the smaller diameter remains circular (Fig. 13). Moreover, only the larger mitochondrial derivate

presents a paracrystalline core, situated distally in relation to the axoneme (Fig. 13). In the terminal portion of the flagellum, the small mitochondrial derivative ends first, followed by the larger one and both ends before the axoneme (Fig. 15-16).

The accessory bodies are approximately triangular, in the cross section. They are located exclusively between the axoneme and the mitochondrial derivatives and, therefore, they are not seen followed by the centriolar adjunct (Fig. 13).

In the testicular follicles, the spermatids are arranged with a maximum number of 32 in each cyst (Fig. 17).

4. Discussion

In Hymenoptera, a large variation of sperm length has been observed, which has been found even among species of same family. It can be observed in the Crabronidae, which presents *T. albitarse* (Crabroninae) with spermatozoa measuring 150 μm and therefore, smaller than those of Pemphredoninae, *Microstigmus arlei*, that measure 813 μm (Zama et al., 2007). In bees, the length of such cells varies considerably, generally from 80 to 450 μm (Baer et al., 2003; Zama et al., 2004; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005), but reaching up to 1500 μm , as observed in Euglossini bees (Zama et al., 2005a).

The spermatozoa of *T. albitarse* share many ultrastructural characteristics with other Hymenoptera (Wheeler et al., 1990; Peng et al., 1992, 1993; Newman and Quicke, 1999; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b,c; Lino-Neto and Dolder, 2002). However, there are also differences, as among the species of Crabronidae and Sphecidae already studied. For example, in *Microstigmus*, the perforatorium is paracrystalline, very long and almost entirely inserted into a nuclear cavity. The nucleus and the perforatorium show a spiralled course (e.g. Zama et al., 2007). The difference between the species acrosome studied here and that of Sphecidae, *S.*

fistularium (Zama et al., 2005b) consists in the acrosomal vesicle. In *T. albitarse*, it is circular, while in *S. fistularium* it changes to ellipsoidal near to the nucleus.

The perforatorium base is inserted into a cavity at the anterior extremity of the nucleus and occurs in all the Hymenoptera. In this sense, it may be considered a synapomorphic character to the order. However, variations in the depth of the insertion are observed among different species. In *T. albitarse*, the insertion, only 80 nm, is the shortest registered for Hymenoptera. In *S. fistularium* (Zama et al., 2005b) and in the Halictinae bees (Fiorillo et al., 2005), Tapinotaspidini (Báo et al., 2004) and Meliponini (Zama et al., 2001, 2004; Araújo et al., 2005) this insertion varies from 100 and 300 nm. The deepest insertions were 400 nm in ants (Moya et al., 2007), 500 nm in wasps *Agelaia vicina* (Mancini et al., 2006), and 630 nm in Euglossini bees (Zama et al., 2005a).

In most insects, the nucleus is connected to the flagellum by an electron-dense structure called the centriolar adjunct (Jamieson et al., 1999). In the Hymenoptera, this structure has been classified as symmetric or asymmetric, based on its association with the other components of this region. It's called symmetric when it's structure is located between nuclear base (which, in general, is pointed) and the beginning of both mitochondrial derivatives. It is considered asymmetric when the centriolar adjunct, which usually begins at the nuclear base, extending parallel to the axoneme and the large mitochondrial derivative and finishes just above the tip of the smaller mitochondrial derivative. The asymmetric type is observed from 'symphyta' to Apoidea, including the spheciforme *S. fistularium* (Zama et al., 2005b). However, as in *T. albitarse*, in Siricoidea *Tremex* sp. (Newman and Quicke, 1999), in Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto et al., 2000b; Lino-Neto and Dolder, 2001b), and in ants (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007), the centriolar adjunct is symmetric. Possibly, the symmetric condition in this species represents an autapomorphy and occurred independently. On the other

hand, no centriolar adjunct was observed in the parasitic wasp Scelionidae, (Lino-Neto and Dolder, 2001a).

Although the microtubular arrangement pattern is largely conserved in Hymenoptera (Jamieson et al., 1999) differences can be recognized in the sequence of their cut-off in the terminal axonemal portion. In *T. albitarse* similarly to all aculeate, the central microtubules and the nine doublets end first, followed by the accessory microtubules (Lino-Neto et al., 2000a; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b, 2007; Bao et al., 2004, Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, Mancini et al., 2006) or all end approximately together, as in ants (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto and Dolder, 2002). A different sequence was found for parasitic wasps (Chalcidoidea) where the nine doublets are the last microtubules to be lost at the flagellum tip (Lino-Neto et al., 1999, 2000b; Lino-Neto and Dolder, 2001b).

The asymmetry in the mitochondrial derivatives' diameters was observed in Sphecidae *S. fistularium* (Zama et al., 2005b), in Apidae (Lino-Neto et al., 2000a; Bao et al., 2004; Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Fiorillo et al., 2005; Araújo et al., 2005) and in Vespidae (Mancini et al., 2006; 2008), while in *Microstigmus*, the mitochondrial derivatives are symmetrical (Zama et al., 2007). However, the constriction observed in the biggest mitochondrial derivative can be used to differ *T. albitarse* from other species.

The number of spermatozoa per cyst in testicular follicles reflects the number of mitosis and the viability of the spermatids at the beginning of spermiogenesis (Lino-Neto et al., 2008). In *T. (Trypargilum) albitarse* and *T. (Trypoxylon)* spp. (Moreira et al., 2008), up to 32 spermatids were observed per cyst, indicating that this number is possibly characteristic for the genus or, at the most, of the subfamily Crabroninae; since in Pemphredoninae, *Microstigmus* showed up to 64 spermatozoa per cyst (Zama et al., 2007). Also, in Sphecidae, *S. fistularium*, up to 128 spermatozoa were observed per cyst (Zama et al., 2005b).

As can be observed, the morphology of the spermatozoa of *T. albitarse* shows several synapomorphies to the Apoidea. However, there are characteristics shared only with the subfamily while others are exclusive of the species or, possibly, of the genus.

Acknowledgement

We are grateful to the Núcleo de Microscopia e Microanálise of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) and the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). We thank Dr. Lúcio A. O. Campos (DBG-UFV) for supplying some of the specimens and Heide Dolder for critical reading of the manuscript. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

References

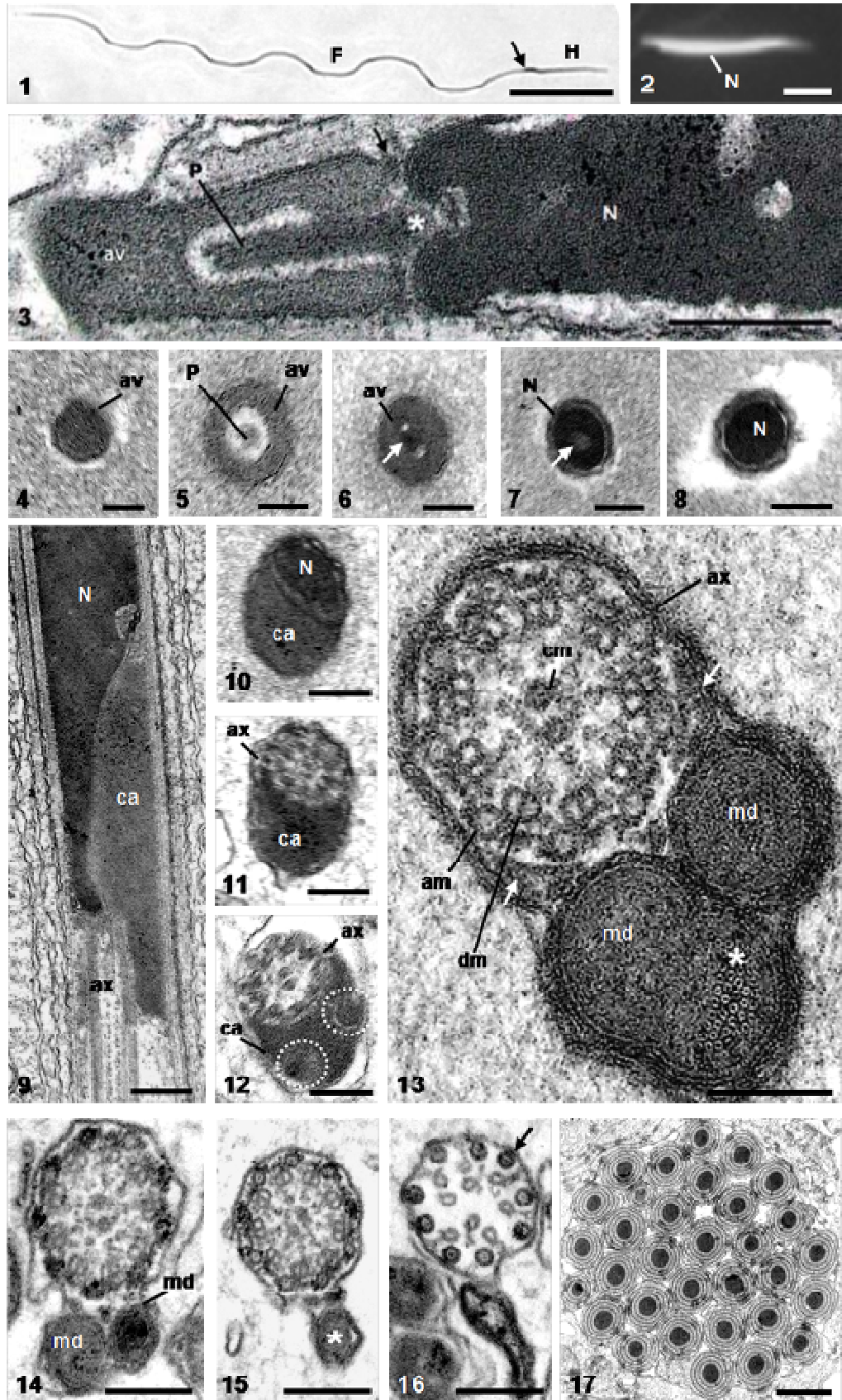
- Alexander, B.A., 1992. An exploratory analysis of cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *J. Hym. Res.* 1, 25-61.
- Araújo, V.A., Zama, U., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2005. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 137-141.
- Baer, B., Schmid-Hempel, P., Hoeg, J.T., Boomsma, J.J., 2003. Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insect. Soc.* 50, 101-108.
- Báo, S.N., Gonçalves-Simões, D., Lino-Neto, J., 2004. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener & Mours 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36, 23-28.
- Bohart, R., 2000. A review of Gorytini in the Neotropical Region (Hymenoptera: Sphecidae: Bembicinae). *Contributions in Entomology International* 4, 111-259.
- Bohart, R.M., Menke, A.S., 1976. Sphecidae wasps of the world - A generic revision. University of California Press, Berkeley.
- Brothers, D.J., 1975. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference a Mutillidae. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 50, 483-648.
- Brothers, D.J., 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bee (Hymenoptera, Chrysoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zool. Scr.* 28, 233-249.
- Cruz-Höfling, M.A., Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1970. The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *An. Acad. Bras. Ciências* 42, 69-78.
- Dallai, R., 1974. Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta Apterygota. *Pedobiology* 14, 148-156.
- Dallai, R., Afzelius, B.A., 1993. Development of the accessory tubules of insect sperm flagella. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 25, 499-504.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.A.M., Lino-Neto, J., Báo, S.N., 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37(1), 75-81.
- Hanson, P.E., Menke, A.S., 1995. The sphecid wasps (Sphecidae), in: Hanson, P.E., Gauld, I.A. (Eds.), *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford University Press., New York, pp. 621-649.
- Jamieson, B.G.M., 1987. *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, Inc., USA.
- Lensky, Y.E., Ben-David, E., Schindler, H., 1979. Ultrastructure of the spermatozoa of the mature drone bee. *J. Apicult. Res.* 18, 264-271.

- Lino-Neto, J., B ao, S.N., Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28, 253-259.
- Lino-Neto, J., B ao, S.N., Dolder, H., 2000a. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell* 32, 322-327.
- Lino-Neto, J., B ao, S.N., Dolder, H., 2000b. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81, 205-211.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001a. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scr.* 30, 89-96.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001b. Redescription of sperm structure and ultra-structure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 82, 159-164.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* Bauren (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34, 124-128.
- Lino-Neto, J., Araújo, V.A., Dolder, H., 2008. Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* 51(1), 163-172.
- Lomholdt, O., 1982. On the origin of the bees (Hymenoptera: Apidae, Sphecidae). *Entomol. Scandinavica* 13, 185-190.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insect. Soc.* 53, 333-338.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., Dallai, R., 2008. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38, 54-59.
- Melo, G.A.R., 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera) with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers, Natural History Museum, University of Kansas* 14,1-55.
- Melo, G.A.R., Gonçalves, R.B., 2005. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Revta. Bras. Zool.* 22(1), 153-159.
- Moreira, P.A., Araújo, V.A., Zama, U., Lino-Neto, J., 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37(4), 429-435.
- Moya, J., Mancini, K., Lino-Neto, J., Delabie, J., Dolder, H., 2007. Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.* 88(3), 181-187.
- Nemkov, P.G., Lelej, A.S., 1996. Phylogenetic relationships and classification of the digger wasp tribe Gorytini (Hymenoptera: Sphecidae, Nyssoninae). *Far Eastern Entomol.* 37, 1-14.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 1999. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.* 8, 35-47.

- Ohl, M., 1995. Die phylogenetische Beziehungen von Grabwespen und Bienen: Stand der Forschung, Probleme, Perspektiven (Hymenoptera: Apoidea). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie* 10, 629-632.
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M., Yin, L.R.S., 1992. Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.* 17, 269-276.
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M., Yin, L.R.S., 1993. Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.* 18, 93-101.
- Quicke, D.L.J., Ingram, S.N., Baillie, H.S., Gaitens, P.V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21, 381-402.
- Wheeler, D.E., Crichton, E.D., Krutzsch, P.H., 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.* 206, 343-350.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10, 261-270.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2004. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36, 29-41.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Melo, S.M., Campos, L.A.O., Dolder, H., 2005a. Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.* 52(2), 122-131.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., B ao, S.N., 2005b. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37(3-4), 91-99.
- Zama, U., Bottura, G., Lino-Neto, J., Dolder, H., B ao, S.N., 2005c. The nucleus e flagellum transition in *Trypoxylon (Trypargilum)* subgenus, with emphasis on a singular centriolar adjunct (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22 (Suppl.), 56-57.
- Zama, U., Moreira, J.C.S., B ao, S.N., Campos, L.A.O., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod. Struct. Dev.* 36, 304-316.

Legends of the figures

Figure 1. Phase contrast micrograph of *T. albitarse* spermatozoa. Arrow indicates the limit between the head (H) and the flagellum (F). **2.** DAPI stained fluorescence micrographs of the nucleus. **3-17.** Electron micrographs of the spermatozoa. **3.** Longitudinal section of the head anterior region, showing the short cavity at the nucleus top, in which the perforatorium is inserted (asterisk). **4-8.** Transverse sections at various levels, from the head anterior to the posterior region. **(4)** Detail of acrosomal vesicle (av); **(5)** electron-lucid layer separating the acrosomal vesicle (av) from the perforatorium (p); **(6)** acrosomal vesicle (av) posterior end and of the perforatorium (arrow); **(7)** anterior extremity of the nucleus, in which the perforatorium (arrow) is inserted; **(8)** anterior region of the electron-dense nucleus (N). **9.** Longitudinal section of the nucleus-flagellum transition region, showing the nucleus (N), the centriolar adjunct (ca) and the axoneme (ax). **10-12.** Transverse section of the nucleus-flagellum transition region. The circle of broken lines indicates the anterior tip of both mitochondrial derivatives. **13.** Transverse section of the flagellum, showing the axoneme (ax) made up of accessory, doublet and central microtubules (am, dm and cm, respectively), two mitochondrial derivatives (md); the paracrystalline material (asterisk); and two accessory bodies (arrows) located between the axoneme and the mitochondrial derivative. **14-15.** Transverse sections of the posterior region of the flagellum: in **(14)** the mitochondrial derivatives (md) follow the axoneme and in **(15)** are the larger derivative (asterisk) ends after the smaller. **16.** Transverse section of the final flagellar region showing the accessory microtubules (arrow), which are the last ones to end. **17.** Transverse section of the spermatids nuclei in a cyst with 32 spermatids. Scale bars: (A) 20 μm ; (B) 5 μm ; (C, J-L) 0.2 μm ; (D) 0.5 μm ; (E-F, M-P) 0.1 μm ; (G-I) 0.3 μm ; (Q) 1 μm .



Capítulo 2

3.2. Ultra-estrutura dos espermatozóides em duas espécies de abelhas solitárias com ênfase nos caracteres sinapomórficos compartilhados na família Apidae

RESUMO. A morfologia dos espermatozoides de abelhas tem fornecido caracteres promissores para análises filogenéticas. Neste trabalho a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de *Thygater (Thygater) analis* e *Melitoma segmentaria* foram descritas e as sinapomorfias compartilhadas na família Apidae foram discutidas. Nestas espécies, os feixes de espermatozoides que são despejados na vesícula seminal, possuem, em média, 50 células. Os espermatozoides são formados por uma região de cabeça e outra flagelar. A cabeça inclui um acrossomo contendo o perforatorium, coberto pela vesícula acrossomal e um núcleo. O flagelo é formado por dois derivados mitocondriais assimétricos em diâmetro e comprimento, um adjunto do centríolo, um axonema (9 + 9 + 2) e dois corpos acessórios. O adjunto do centríolo possui padrão assimétrico e os corpos acessórios formato triangular. Na região final do flagelo, os derivados terminam antes do axonema e o derivado de menor diâmetro termina primeiro. O axonema é gradualmente desorganizado e os microtúbulos acessórios são os últimos a terminarem. Nestas duas espécies, os espermatozoides compartilham diversas sinapomorfias com aqueles de outras espécies de abelhas já descritas na literatura, o que possibilita estabelecer um padrão geral morfológico típico para os espermatozoides na família Apidae.

PALAVRAS-CHAVE: adjunto do centríolo, sinapomorfia, abelhas solitárias e Apoidea.

1. Introdução

A morfologia dos espermatozoides de insetos é uma importante fonte de caracteres para análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos (Baccetti, 1970; Phillips, 1970; Dallai, 1974; Jamieson, 1987; Dallai & Afzelius, 1993; Jamieson et al., 1999). O primeiro estudo comparativo da morfologia dos espermatozoides em Hymenoptera foi feito por Quicke et al. (1992), com espécies de 14 famílias representando “symphyta”, Aculeata e Parasitica. Jamieson et al. (1999) propuseram uma filogenia para os holometabolos utilizando caracteres morfológicos e moleculares, superpostos pelos caracteres apomórficos dos espermatozoides para cada ordem. Estes autores sugeriram que o “perforatorium inserido em uma curta cavidade na extremidade anterior do núcleo” seja a única característica apomórfica dos espermatozoides nos Hymenoptera.

Em abelhas, a ultra-estrutura dos espermatozoides foi descrita em algumas espécies de Apinae (Rothschild, 1955; Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Hofling et al., 1970; Lensky et al., 1979; Woyke, 1984; Peng et al., 1992; 1993; Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 2000; Zama et al., 2001; 2004; 2005a,b; Bão et al., 2004; Araújo et al., 2005a), Halictinae (Fiorillo et al., 2005), Megachilinae e Andreninae (Quicke et al., 1992). Nestas abelhas os espermatozoides apresentam em comum uma região de cabeça curta, formada pelo acrossomo e núcleo, e a região do flagelo formada por dois derivados mitocondriais assimétricos, um adjunto do centríolo, um axonema com o arranjo de microtúbulos 9 + 9 + 2 e dois corpos acessórios. Nas abelhas, assim como nos Aculeata em geral, os espermatozoides são transferidos para as vesículas seminais em feixes (espermatodesmata), os quais são desorganizados durante a maturação sexual (Moreira et al., 2004; Araújo et al., 2005b; Moreira et al., 2008).

Neste trabalho, descrevemos a ultra-estrutura dos espermatozoides em duas espécies de Apinae e comparamos com aquela das demais espécies descritas na

literatura, com o objetivo de investigar a existência de caracteres sinapomórficos para as abelhas e, assim, fornecer um padrão ultra-estrutural para os espermatozóides na família Apidae.

2. Material e Métodos

Oito machos adultos de *Thygater (Thygater) analis* (Lepeletier 1841) e oito de *Melitoma segmentaria* (Fabricius 1804) foram coletados com redes entomológicas enquanto visitavam as flores de *Ipomoea* sp. (Convolvulaceae) no campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

2.1. Microscopia de luz - Suspensão de espermatozóides extraídos de uma das vesículas seminais foi espalhada em lâminas histológicas e fixada por vinte minutos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2. Após secar em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio equipado com contraste de fase e 50 espermatozóides foram fotografados para serem medidos. Para medir os núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) 0.2 µg/ml em PBS, lavadas e montadas em sacarose 50%. Essas lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm e 50 núcleos foram fotografados. Todas as medidas foram feitas usando o software Image Pro-Plus (Media Cybernetcs) e os comprimentos foram expressos pela média do número total de espermatozóides analisados.

2.2. Microscopia eletrônica de transmissão - De cada macho, uma das vesículas seminais foi fixada por 24 h, a 4°C, em solução contendo glutaraldeído 2.5%, ácido

pícrico 0.2%, sacarose 3% e 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio, pH 7.2. O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, desidratado em acetona e incluído em Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2% em solução de hidróxido de sódio 1N e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109).

3. Resultados

Os espermatozóides de *T. analis* e *M. segmentaria* são longos, finos e medem, em média, 500 µm e 300 µm de comprimento, respectivamente (Fig. 1A e C). Em *T. analis* o núcleo mede, em média 45 µm de comprimento (Fig. 1B) com razão núcleo/flagelo de 0,09, enquanto em *M. segmentaria* o núcleo mede, em média, 30 µm (Fig. 1D) e a razão núcleo/flagelo é igual a 0,1.

Os espermatozóides de *Thygater (Thygater) analis* e *Melitoma segmentaria* saem dos testículos em feixes, sendo estes frequentemente desfeitos no lúmen da vesícula seminal (Fig. 1E). Entretanto, algumas vezes, feixes ou seus fragmentos são vistos na vesícula seminal (Fig. 1F-G). O arranjo dos espermatozóides nos feixes é mantido por uma capa fibrosa de material extracelular, na qual a porção anterior das cabeças dos espermatozóides (acrossomo e parte do núcleo) é embebida (Fig. 1F). Os feixes possuem, em média, 50 espermatozóides (Fig. 1G).

A região da cabeça dos espermatozóides consiste de um complexo acrossomal e do núcleo (Fig. 1H-K). O acrossomo mede aproximadamente 1,8 µm em ambas as espécies e é formado por uma vesícula acrossomal de formato cônico que cobre o perforatorium ao longo de todo o seu comprimento (Fig. 1I-J). A base do perforatorium é inserida em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo (Fig. 1K). Esta cavidade mede aproximadamente 0,2 µm em *T. analis* (Fig. 1K) e 0,18 µm em *M. segmentaria*. Em seção transversal, observa-se que a vesícula

acrossomal é formada por estruturas lamelares (Fig. 1L-Q). A vesícula acrossomal é circular na região anterior e, a medida que se aproxima do núcleo, ela se torna oval (Fig. 1L-Q). Ao longo do acrossomo, uma camada elétron-lúcida separa o perforatorium da vesícula acrossomal (Fig. 1J e 1O-P).

O núcleo é linear e apresenta-se fortemente elétron denso, com muitas lacunas elétron lúcidas, principalmente, nas regiões periféricas ao longo de todo o seu comprimento (Fig. 2A-B). Em seção transversal, o núcleo possui formato oval (Fig. 2B). A extremidade posterior do núcleo possui um formato coniforme assimétrico e se posiciona paralelamente com a região anterior do axonema e o topo do derivado mitocondrial maior (Fig. 2C-E).

O adjunto do centríolo começa na altura da base nuclear, se estende em paralelo ao axonema e ao derivado mitocondrial maior (Fig. 2E-F) e termina justamente acima do topo do derivado mitocondrial menor, padrão denominado assimétrico. Em corte transversal, o adjunto do centríolo possui formato aproximadamente triangular sendo compacto e elétron denso (Fig. 2F).

O flagelo consiste de dois corpos acessórios, um axonema e dois derivados mitocondriais. Em cortes transversais, os corpos acessórios possuem formato triangular (Fig. 2H-J) e estão localizados entre o axonema e os derivados mitocondriais, mas não ocorrem entre o axonema e o adjunto do centríolo (Fig. 2F). Na região anterior, o axonema não possui os microtúbulos centrais, sendo que estes começam posteriores a região centriolar (Fig. 2C-E). O axonema apresenta o padrão típico de $9 + 9 + 2$ microtúbulos, sendo 9 acessórios, 9 duplas e 2 microtúbulos centrais (Fig. 2H e 3A-B). Os derivados mitocondriais são assimétricos em tamanho e diâmetro (Fig. 2H e 3A). Anteriormente, o derivado mitocondrial maior começa adjacente a extremidade nuclear (Fig. 2C), enquanto o derivado menor começa imediatamente abaixo do adjunto do centríolo. Os derivados mitocondriais são divididos em quatro regiões: (1) uma região clara, circular e de

localização central; (2) uma região elétron densa adjacente ao axonema; (3) uma região de crista, a qual é restrita a borda distal em relação ao axonema e (4) uma região de paracristalino que ocorre somente no derivado mitocondrial maior (Fig. 2H e 3C). Em cortes longitudinais, as cristas são perpendiculares ao longo do eixo dos derivados e com espaços em intervalos regulares que medem 25 nm em *T. analis* (Fig. 2G) e 29 nm em *M. segmentaria*. Na região final do flagelo, os derivados terminam antes do axonema e o derivado de menor diâmetro termina primeiro (Fig. 2I-K). O axonema é o componente mais longo do flagelo, sendo que, na sua extremidade posterior, os microtúbulos acessórios são os últimos a terminarem (Fig. 2K-P).

4. Discussão

Os espermatozóides de *T. analis* e *M. segmentaria* medindo 500 µm e 300 µm, respectivamente, estão dentro do intervalo encontrado em outras abelhas, que varia de 80 µm em *Scaptotrigona xanthotricha* (Araújo et al., 2005a) a 1500 µm em *Euglossa mandibularis* (Zama et al., 2005a). O grande intervalo de comprimento observado demonstra que o comprimento total dos espermatozóides pode não ser um caracter válido em estudos filogenéticos, porque apresenta muitas homoplasias, mas mostra-se um bom indicador taxonômico, já que possui medidas distintas em espécies proximamente relacionadas. Quando se analisa a razão entre o núcleo e o flagelo de *T. analis* (0,09) e *M. segmentaria* (0,1) observa-se grande similaridade entre as espécies das tribos Eucerini e Emphorini, respectivamente. Em outras tribos de Apinae filogeneticamente próximas, a razão núcleo/flagelo de 0,6 em *Exomalopsis auropilosa* (Exomalopsini) e 0,7 em *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. (Tapinotaspidini) também foram muito similares (Báo et al., 2004). Entretanto, é necessário analisar a razão núcleo/flagelo em um número maior de espécies para

confirmar se esta razão se mantém similar dentro de grupos proximalmente relacionados.

A presença de espermatozoides mantidos em feixes na vesícula seminal tem sido observada em todas as espécies de “symphyta” estudadas (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1999; Lino-Neto et al., 2008a) e feixes ou fragmentos destes também são observados na vesícula seminal dos Aculeata (Moreira et al., 2004; Zama et al., 2004; Moreira et al., 2008). Entretanto, nas abelhas e nos Aculeata em geral, quando os indivíduos tornam-se sexualmente maduros, os feixes são desfeitos e raramente são observados na vesícula seminal, sendo mais comum a presença de espermatozoides individualizados, os quais, dessa forma, serão transferidos para a fêmea. Esta característica representa uma sinapomorfia para as abelhas e para os Aculeata. Isto porque nos “symphyta”, considerados os Hymenoptera mais basais, todos os espermatozoides são vistos em feixes na vesícula seminal (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1999; Lino-Neto et al., 2008a). Lino-Neto et al. (2008a) sugerem que, a manutenção dos feixes na vesícula seminal dos symphyta, possivelmente esta relacionada ao conteúdo enzimático e/ou pH dos fluidos presentes no lúmen.

Nos folículos testiculares, a organização das células germinativas em cistos é uma característica comum para os insetos. O número de espermatozoides nos feixes representa o número final de células que se desenvolveram em sincronia dentro dos cistos, a partir de uma única espermatogônia (Lino-Neto et al., 2008b). Em abelhas, os machos são haplóides e durante a espermiogênese, pelo menos metade das espermátides são células inviáveis (Cruz-Landim & Beig 1980a,b; Cruz-Landim 2001; Conte et al., 2005; Lino-Neto et al., 2008b). Portanto, em *T. analis* e *M. segmentaria*, a média de 50 espermatozoides por feixe indica a ocorrência de seis divisões celulares mitóticas, como observado para a maioria das abelhas (Observação pessoal). Exceção para a tribo Meliponini, que possui 128

espermatozoides por cisto, indicando sete ciclos mitóticos, o que pode ser considerado um carácter derivado dentro da família.

Os espermatozoides de *T. analis* e *M. segmentaria* apresentam várias semelhanças com aqueles já descritos para outras espécies de Apidae. Em abelhas o acrossomo mede de 1-2 μm e é formado pela vesícula acrossomal e pelo perforatorium (Zama et al., 2001; 2004; 2005a; Báó et al., 2004; Araújo et al., 2005a; Fiorillo et al., 2005), com exceção de *Apis mellifera*, onde o acrossomo é excepcionalmente longo, medindo 5,6 μm (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Hofling et al., 1970; Lensky et al., 1979; Woyke, 1984). Em corte transversal, o acrossomo, em geral, varia de circular, na região anterior, a elipsoidal na região posterior, exceto em Meliponini, onde na região posterior ele possui formato triangular (Zama et al., 2001; 2004; Araújo et al., 2005a). A vesícula acrossomal formada em lamelas em *T. analis* e *M. segmentaria* não havia sido observada em outras espécies de abelhas. O perforatorium é compacto, assim como em outros Apini (Báó et al., 2004) em Euglossini (Zama et al., 2005a) e em Meliponini (Zama et al., 2001; 2004; Araújo et al., 2005). Em Halictinae (Fiorillo et al., 2005), o perforatorium é paracristalino. A base do perforatorium inserida em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo é uma característica que ocorre em praticamente todos os Hymenoptera. Por isso, pode ser considerada uma característica sinapomórfica para a ordem.

Nos espermatozoides da maioria das abelhas, a cromatina nuclear é fortemente elétron-densa e compacta. Entretanto, em *T. analis* e *M. segmentaria* ela apresenta várias lacunas elétron lúcidas, como observado em Exomalopsini e Tapinotaspidini (Báó et al., 2004) e em Halictidae ocorrem inúmeras inclusões paracristalinas (Fiorillo et al., 2005). Em Meliponini, como *Melipona marginata* e *M. rufiventris*, a cromatina é compactada em grumos, dando ao núcleo a aparência de cromatina frouxa (Zama et al., 2004). A projeção assimétrica na parte posterior do

núcleo é uma sinapomorfia compartilhada entre as abelhas. Nesta região de transição, o núcleo conecta-se com a extremidade anterior do derivado mitocondrial maior por uma série de lamelas elétron-densas. Em Apidae, o adjunto do centríolo inicia-se na base nuclear, se estende paralelamente ao axonema e ao derivado mitocondrial maior e termina no topo do derivado mitocondrial menor (padrão assimétrico), sendo este caracter sinapomórfico para a família. Em geral, o adjunto do centríolo é fortemente eletrondenso e compacto, seu comprimento varia de 2-7 µm em Meliponini (Zama et al., 2001; 2004; Araújo et al., 2005a) até 30 µm em *Apis mellifera* (Lino-Neto et al., 2000). Dentre os Aculeata, o adjunto do centríolo do tipo simétrico, quando ele precede ambos os derivados mitocondriais, foi encontrado em vespas Crabronidae (Zama et al., 2005b), considerado grupo irmão das abelhas e em formigas (Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya et al., 2007).

Assimetria em comprimento e diâmetro dos derivados mitocondriais são características sinapomórficas para os Apidae. Em outros Aculeata, como em *Microstigmus* (Zama et al., 2007) e em formigas (Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya et al., 2007) os derivados mitocondriais são simétricos. Entretanto, em abelhas a assimetria em diâmetro dos derivados mitocondriais é bem evidente, podendo o derivado maior exceder o menor em até três vezes, como observado em Euglossini (Zama et al., 2005a). Em *T. analis* e *M. segmentaria* os derivados possuem formato periforme, como em Euglossini (Zama et al., 2005a) e Meliponini (Zama et al., 2001, 2004; Araújo et al., 2005a). Em Halictidae (Fiorillo et al., 2005) eles são ovalados. Outro caracter sinapomórfico para abelhas é a presença de material paracristalino no derivado mitocondrial maior, na região oposta ao axonema.

Em insetos em geral, o axonema apresenta o padrão 9 + 9 + 2 microtúbulos e se inicia como centríolo na região anterior do flagelo. No final do flagelo, o axonema é gradualmente desorganizado, primeiro terminam o par central, seguido das nove duplas e, por último, os microtúbulos acessórios, padrão para a maioria dos

Aculeata (Lino-Neto et al., 2000; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b,c, 2007; Bão et al., 2004; Araújo et al., 2005a; Fiorillo et al., 2005; Mancini et al., 2006), sendo que em formigas, eles terminam aproximadamente juntos (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002). Já em vespas parasíticas (Chalcidoidea) os microtúbulos acessórios terminam primeiro (Lino-Neto et al., 1999).

Os corpos acessórios possuem formato triangular e são inseridos entre os derivados mitocondriais e o axonema, mas não entre este último e o adjunto do centríolo, como nos Aculeata em geral (Lino-Neto et al., 2000; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b,c, 2007; Bão et al., 2004; Araújo et al., 2005a; Fiorillo et al., 2005; Mancini et al., 2006, 2008; Moya et al., 2007).

As duas espécies de abelhas analisadas nesse estudo compartilham várias características morfológicas dos espermatozoides com as demais abelhas já descritas. Estas semelhanças permitem estabelecer um padrão geral para a família baseado nos caracteres sinapomórficos: (1) feixes de espermatozoides desfeitos na vesícula seminal; (2) perforatorium inserido em uma curta cavidade no topo anterior do núcleo; (3) projeção lateral na região posterior do núcleo; (4) adjunto do centríolo assimétrico; (5) assimetria dos derivados mitocondriais e região de paracristalino no derivado maior; (6) seqüência de terminação dos microtúbulos e (7) formato triangular dos corpos acessórios. As sinapomorfias além de estabelecer um padrão geral para os espermatozoides em Apidae reforçam a proposta de Brothers (1999) e Melo (1999) em que todas as abelhas são agrupadas em uma única família Apidae.

Agradecimentos

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília (UnB). Esta pesquisa foi suportada pelo CNPq (Proc. 142455/2005-9) e Capes.

Referências

- Araújo VA; Zama U; Dolder H; Lino-Neto J (2005a) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22: 137-141.
- Araújo VA; Zama U; Neves CA; Dolder H; Lino-Neto J (2005b) Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22: 129-137.
- Baccetti B (1970) The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogeny. In: Baccetti, B. (Ed.). Comparative spermatology. New York: Academic Press, p. 169-182.
- Báo SN; Gonçalves-Simões D; Lino-Neto J (2004) Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener & Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 36: 23-28.
- Brothers DJ (1999) Phylogeny and evolution of wasps, ants and bee (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). Zool. Scr. 28: 233-249.
- Conte MJ; Lino-Neto J; Dolder H (2005) Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): Fate of the atypical spermatids. Caryologia 58: 183-188.
- Cruz-Ladim C; Beig D (1980a) Meiose nos Hymenoptera. Ciência e Cultura 33: 937-966.
- Cruz-Ladim C; Beig D (1980b) An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Inter. J. Inver. Rep. 2: 271-283.
- Cruz-Ladim C (2001) Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. Iheringia 91: 183-189.
- Cruz-Hofling MA; Cruz-Ladim C; Kitajima EW (1970) The fine structure of spermatozoa from the honey bee. An. Acad. Bras. Ciên. 42: 69-78.
- Dallai R (1974) Spermatozoa and phylogeny. A few data on Insecta Apterygota. Pedobiologia 14: 148-156.
- Dallai R; Afzelius BA (1993) Development of the accessory tubules of insect sperm flagella. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 25: 499-504.
- Fiorillo BS; Coelho AAM; Lino-Neto J; Báo SN (2005) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 37: 75-81.
- Hoage TR; Kessel RG (1968) An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. J. Ultrastruct. Res. 24: 6-32.
- Jamieson BGM (1987) The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jamieson BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999) Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, NH, USA: Scientific publishers.

- Lensky Y; Ben-David E; Schindler H (1979) Ultrastructure of the spermatozoa of the mature drone honey bee. *J. Apic. Res.* 18: 264-271.
- Lino-Neto J; Báo SN; Dolder H (1999) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 253-259.
- Lino-Neto J; Báo SN; Dolder H (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.
- Lino-Neto J; Dolde H (2002) Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* Bauren (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34: 124-128.
- Lino-Neto J; Dolder H; Mancini K; Mercati D; Dallai R (2008a) The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185-193.
- Lino-Neto J; Araújo VA; Dolde, H (2008b) Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* 51(1): 163-172.
- Mancini K; Lino-Neto J; Dolder H (2006) Sperm ultrastructure of *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insect. Soc.* 53: 333-338.
- Mancini K; Lino-Neto J; Dolder H; Dallai R (2008) Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod. Struct. Dev.* 38: 54-59.
- Melo GAR (1999) Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera) with emphasis on the crabronid wasps. *Mus. Nat. His. Univ. Kansas* 14:1-55.
- Moreira J; Zama U; Lino-Neto J (2004) Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(4): 185-189.
- Moreira PA; Araújo VA; Zama U; Lino-Neto J (2008) Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37(4): 429-435.
- Moya J; Mancini K; Lino-Neto J; Delabie J; Dolder H (2007) Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.* 88(3): 181-187.
- Newman TM; Quicke DLJ (1999) Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.* 8: 35-47.
- Peng CYS; Yin CM; Yin LRS (1992) Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.* 17: 269-276.
- Peng CYS; Yin CM; Yin LRS (1993) Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.* 18: 93-101.
- Phillips DM (1970) Insect flagellar tubule patterns theme and variations. In: Baccetti, B. *Comparative spermatology*. New York: Academic Press, p. 263-278.
- Quicke DLJ; Ingram SN; Baillie HS; Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21: 381-402.

- Rothschild L (1955) The spermatozoa of the honey bee. Transactions of the Royal Entomological Society of London. 107: 289-294.
- Wheeler DE; Crichton ED; Krutzsch PH (1990) Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). J. Morphol. 206: 343-350.
- Woyke J (1984) Ultrastructure of single and multiple diploid honey bee spermatozoa. J. Hym. Res. 23: 123-135.
- Zama U; Lino-Neto J; Dolder H (2001) Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J. Hym. Res. 10: 261-270.
- Zama U; Lino-Neto J; Dolder H (2004) Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (Stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). Tissue Cell 36: 29-41.
- Zama U; Lino-Neto J; Melo SM; Campos LAO; Dolder H (2005a) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). Insectes Sociaux 52: 122-131.
- Zama U; Bottura G; Lino-Neto J; Dolder H; Báo SN (2005b) The nucleus e flagellum transition in *Trypoxylon (Trypargilum)* subgenus, with emphasis on a singular centriolar adjunct (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). Braz. J. Morphol. Sci. 22 (Suppl.): 56-57.
- Zama U; Brito P; Lino-Neto J; Campos LAO; Dolder H; Báo SN (2005c) The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 37(3-4): 91-99.
- Zama U; Moreira JCS; Báo SN; Campos LAO; Dolder H; Lino-Neto J (2007) Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. Arthropod. Struct. Dev. 36: 304-316.

Legendas das Figuras

Figura 1. A-B. Fotomicrografia de um espermatozóide de *T. analis*. **A.** Contraste de fase, a seta indica o limite entre a cabeça e o flagelo. **B.** Região da cabeça, mostrando o núcleo corado com DAPI. **C-D.** Fotomicrografia de um espermatozóide de *M. segmentaria*. **C.** Contraste de fase, a seta indica o limite entre a cabeça e o flagelo. **D.** Região da cabeça, mostrando o núcleo corado com DAPI. **E-Q.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozóides na vesícula seminal de *Thygater analis*. **E.** Corte da vesícula seminal mostrando a região epitelial (ep) e o lúmen (L) repleto de espermatozóides; as cabeças de seta indicam espermatozóides seccionados na região do núcleo. **F.** Seção transversal de um espermatozóide, seccionados na região do núcleo (seta) e acrossomo (cabeça de seta) embebido em uma matriz de material extracelular menos eletrônico denso (m). **G.** Corte transversal de um espermatozóide na altura dos núcleos, com 50 espermatozóides. **H.** Corte longitudinal da região anterior da cabeça mostrando o acrossomo (ac) e o núcleo (n). **I-J.** Corte longitudinal do acrossomo indicando a vesícula acrossomal (av) e o perforatorium (p). **K.** Corte longitudinal da região de transição entre o acrossomo (ac) e o núcleo (n), mostrando que a base do perforatorium se estabelece em uma cavidade no topo nuclear (asterisco). **L-Q.** Cortes transversais da região anterior para a posterior do acrossomo, mostrando a vesícula acrossomal (av) e o perforatorium (p). Barras: A e C = 50 μm ; B e D = 20 μm ; E e G = 2 μm ; F = 1 μm ; H-K = 0,2 μm ; L-Q = 0,1 μm .

Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozóides na vesícula seminal de *Thygater analis* (A-B e D-P) e *Melitoma segmentaria* (C). **A-B.** Corte longitudinal e transversal, respectivamente, do núcleo mostrando as lacunas elétricas ao longo da periferia (cabeça de seta). **C-E.** Corte longitudinal da região de transição núcleo-flagelo. A cabeça de seta indica a base do núcleo (n). Note a projeção posterior nuclear (n) e a inserção do axonema (ax), do derivado mitocondrial maior (md) e do adjunto do centríolo (ca) e a região centriolar do flagelo (asterisco). **F.** Corte transversal do flagelo mostrando um proeminente adjunto do centríolo (ca) na porção anterior do flagelo, adjacente ao axonema (ax) e ao derivado mitocondrial maior (md) e um corpo acessório (seta). **G.** Corte longitudinal dos derivados mitocondriais evidenciando a região das cristas (seta). **H.** Corte transversal do flagelo mostrando o axonema formado por nove microtúbulos

acessórios (am), nove duplas (dm) e um par central (cm). As cabeças de seta indicam os corpos acessórios e seta indica um material central entre as estruturas flagelares. Ambos os derivados possuem uma área central menos elétrion densa (a), uma região adjacente ao axonema mais elétrion densa (b) e uma região de crista oposta ao axonema (c). O asterisco indica a região de paracristalino presente somente no derivado maior. **I-P.** Cortes transversais da extremidade posterior flagelar. **I.** Mostrando o axonema (ax), os derivados mitocondriais (dm) e os corpos acessórios (cabeças de seta). **J.** Mostrando o axonema (ax) e um derivado mitocondrial (dm). Note que um derivado termina antes do outro. A seta indica um corpo acessório. **K-P.** Mostrando a desorganização dos microtúbulos. As cabeças de setas indicam os microtúbulos acessórios que são os últimos a terminarem na extremidade posterior flagelar. Barras: A-C e G = 0,4 μm ; D-F e I-K = 0,2 μm ; H e L-P = 0,1 μm .

Figura 3. A-C. Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozóides na vesícula seminal de *Melitoma segmentaria*. Corte transversal do flagelo mostrado o axonema (ax), os corpos acessórios (cabeças de seta) e um material central entre as estruturas flagelares (seta). Ambos derivados possuem uma área central menos elétrion densa (a), uma região adjacente ao axonema mais elétrion densa (b) e uma região de crista oposta ao axonema (c). O asterisco indica a região de paracristalino presente somente no derivado maior. **B-C.** Detalhe em maior aumento do axonema e do derivado mitocondrial maior. Em (B) axonema formado por nove microtúbulos acessórios (am), nove duplas (dm) e um par central (cm); em (C) derivado mitocondrial maior mostrando as regiões de área menos elétrion densa (a), mais elétrion densa (b), de crista (c) e de material paracristalino (asterisco). Barras: A = 0,2 μm ; B-C = 0,1 μm .

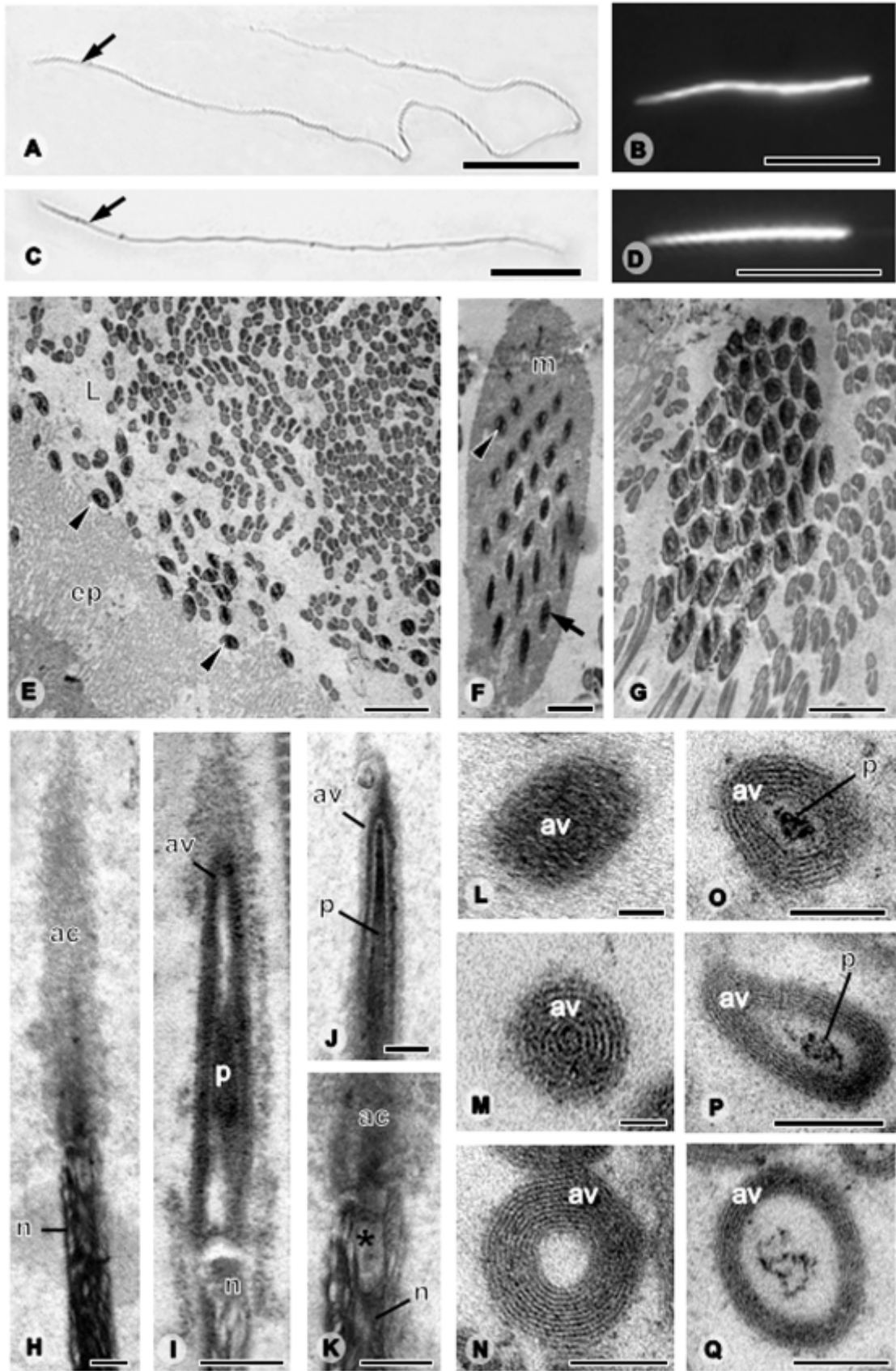


Figura 1

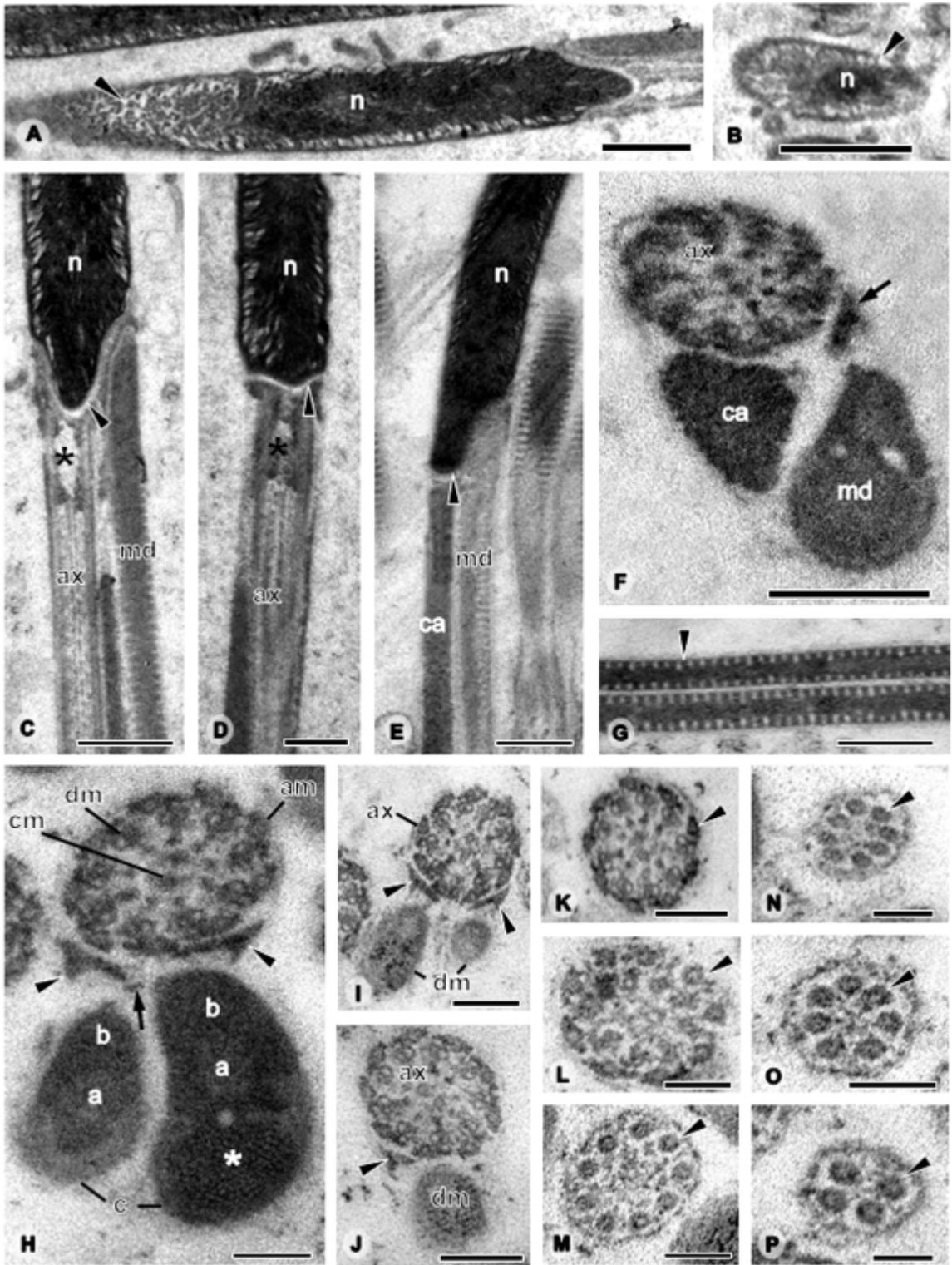


Figura 2

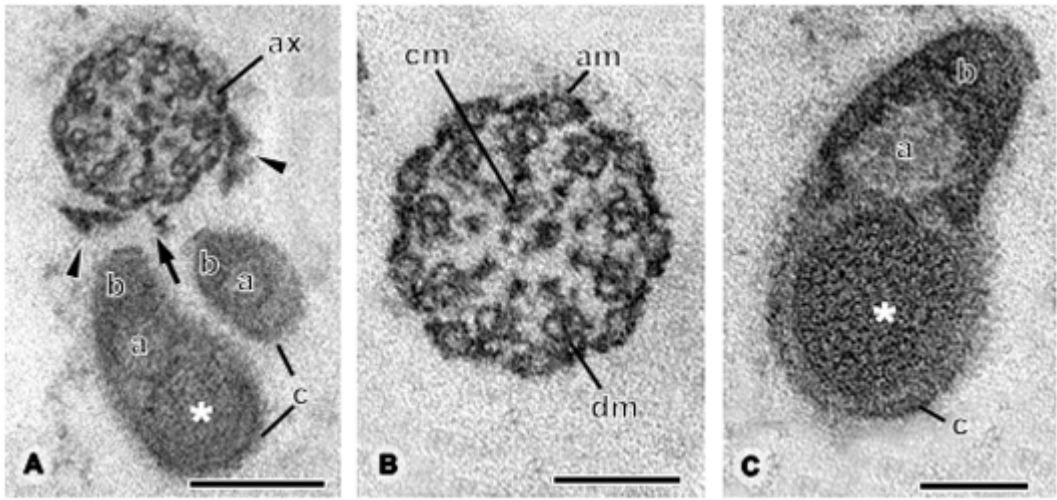


Figura 3

Capítulo 3

3.3. Morphology of the Male Reproductive System of *Polistes versicolor* *versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae: Polistini) with phylogenetic considerations

Vinícius Albano Araújo; Jane Moreira & José Lino-Neto

Artigo submetido à revista Journal of Insect Science

ABSTRACT. Variations of the adult male reproductive system morphology among different Hymenoptera groups offer characteristics that can help studies of behaviour and the evolution of this group. The aim of this study was the description of the adult male reproductive system of the wasp *Polistes versicolor versicolor*. The reproductive system of the specimens was dissected, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 and postfixed in 1% osmium tetroxide. The material was dehydrated and embedded for light microscopy. In *P. versicolor* the reproductive system includes a pair of testes, each one with three fusiform follicles. From each follicle emerges an efferent duct that join, forming a deferent duct. The first half of the deferent duct is enlarged and differentiated into a specialized region in sperm storage, the seminal vesicle. At the post-vesicular region of each deferent duct, emerges an accessory gland. The seminal vesicle and the accessory gland are covered with a capsule forming a vesicle-gland complex, also observed in some species of North American *Polistes*. Sperms are released from testes in bundles, which are disorganized inside the seminal vesicles. In the testes, on average 95 spermatozoa were observed per cyst.

KEYWORDS: histology, mitotic cycles, seminal vesicle, spermatozoa, wasps.

1. Introduction

The Vespidae family is currently classified in 6 subfamilies which are apparently monophyletic: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Vespinae, and Polistinae (Carpenter 1991). Polistinae is considered the most derived Vespidae subfamily, because all species present eusocial behaviour. In this subfamily, the *Polistes* genus is outstanding because it presents about 200 species distributed throughout the world along the tropical region (Richards 1978; Gauld and Hanson 1995). This genus has been widely studied and is considered the “key genus” for understanding the social insect’s evolution and the social behaviour among wasps (Evans 1959).

The reproductive system of Hymenoptera males presents considerable morphological differences among the species. Such differences may be related to presence, size or shape of the structures as well as in their position along the reproductive tract (Dirks and Sternburg 1972; Dallacqua and Cruz-Landim 2003; Ferreira et al. 2004; Araújo et al. 2005a; Bushrow et al. 2006; Moreira et al. 2008). Sperm morphology has revealed a considerable number of features that differ between taxa (Araújo et al. 2005b; Brito et al. 2005; Zama et al. 2007; Lino-Neto et al. 2008a; Mancini et al. 2006, 2008), indicating another possible source of characters that may contribute to understanding the systematics of these insects.

For insects, in general, during spermatogenesis, germ cell development occurs in compartments, called cysts, surrounded by somatic cells. The number of spermatids/spermatozoa per cyst, which is determined by the number of cell divisions, is constant for each species, but it may vary from species to species. Thus, this number has been used as additional information in the systematics of Hymenoptera (Schiff et al. 2001; Zama et al. 2007; Lino-Neto et al. 2008a). The variations in number of spermatozoa per cyst among species are, generally, the result of the spermatogonial mitotic divisions number, and this is due to the fact that

meiosis is constituted, in general, of two divisions, quadrupling the number of cells originated by the mitosis. However, in Hymenoptera since the males are haploid, meiosis has effectively only one division and thus the number of cells resulting from the mitosis is only duplicated. Moreover, in some bees, one of the two spermatids produced by meiosis becomes unviable (Conte et al. 2005; Lino-Neto et al. 2008b), not altering the number of the cells originated by the mitosis. Thus, to use the number of spermatids and/or spermatozoa per cyst as an indicator of the mitotic divisions number, it is necessary to know, if the meiotic divisions and the spermiogenic stages occur as usual.

Variations in the morphology of the reproductive system in *Polistes* males were observed between European (Bordas 1895) and North American species (Dirks and Sternburg 1972). In this work, the morphology of the reproductive system, the spermatozoa morphometry and the spermatozoa number per cyst were described for the South America specie, *Polistes versicolor*. In this sense, we want to contribute for the reproductive biology knowledge and also to reveal characters that may be useful for future studies in taxonomy and phylogeny of Hymenoptera, especially within Aculeata.

2. Material and Methods

Twelve adult males of *Polistes versicolor versicolor* were obtained from nests sampled on a farm in the municipality of Conceição do Castelo, state of Espírito Santo, Brazil.

2.1. Light microscopy: For the histological analysis, the reproductive systems of six males were fixed for 12h in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 and post fixed in 1% osmium tetroxide. The material was dehydrated in increasing alcoholic concentration and embedded in Historesin[®] (GMA, Leica).

Semithin sections were stained with 1% sodium toluidine borate and mounted in Entelan[®] (Merck). The analysis and photographic records were made with an Olympus BX60 microscope.

Sperm suspensions extracted from the seminal vesicles of six males were spread on clean glass microscope slides, which were fixed for 20 minutes in solution of 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, 100 spermatozoa, randomly observed, were photographed in a photomicroscope (Olympus, BX60), equipped with phase contrast.

For nuclear measurements, six slides of different males were stained during 15 minutes with 0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in PBS, washed, and mounted in 50 % sucrose. They were then examined in an epifluorescence microscope (Olympus, BX60) equipped with a BP 360-370 nm excitation filter and 100 nuclei were randomly photographed. All the measures were obtained with the Image Pro-Plus[®] software, version 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA) and the lengths were related to the total number of spermatozoa analysed.

3. Results

The male reproductive system of *Polistes versicolor* consists of a pair of testes, each one with three fusiform follicles (Figures 1A-C). The three follicles are covered by a single capsule and are entirely filled with cysts (Figure 1C). Each cyst has up to 95 spermatozoa on the average (Figure 1D), indicating that at least, six mitotic cycles occur. During spermatogenesis, the cysts migrate along the follicles, while they continue to differentiate. When the spermatozoa are formed, the cysts are broken. The released bundles of spermatozoa (spermatodesmata) remain together, held by extra cellular material that surrounds the anterior portion of their heads

(Figure 1E). The spermatodesmata migrate to the efferent duct (Figure 1E), pass into the deferent duct and then are transferred to the seminal vesicles, where they are disorganized (Figures 1F-H).

The deferent duct middle portion is enlarged and presents a modified epithelium, being transformed into a seminal vesicle (Figure 1A and 1F). The accessory glands are connected to the post-vesicular deferent ducts beginning. The seminal vesicle and the accessory gland are surrounded by a single layer of conjunctive tissue or capsule, forming the vesicle-accessory gland complex (Figures 1A-B).

The seminal vesicle epithelium consists of prismatic cells with spherical basal nuclei. In the apical third of these cells, some vesicular inclusions (Figure 1G) can be observed. In mature males, the vesicular lumen is completely filled with spermatozoa. The epithelium is separated from the external muscular layer by a thick basal membrane (Figures 1F-G).

The accessory glands are oval (Figures 1H-I) and their epithelium consists of prismatic cells with spherical and basal nuclei, and large secretory vesicles in the apical cell portion (Figures 1I and 2A). The lumen is filled with granular secretion (Figures 1H-I).

The deferent duct epithelium is formed by cubical cells with a developed striated border (Figures 2A-B). The deferent duct opens into the ejaculatory duct, and its epithelium consists of cubical cells completely covered by a thin cuticle (Figure 2C).

The spermatozoa of *P. vesicolor* measure about 110 μm in length (Figure 2D) and the nucleus is about 17 μm in length (Figure 2E).

4. Discussion

In general, the reproductive system of *P. versicolor* is morphologically similar to that described for the North American species, *P. metricus*, *P. exclamans* and *P. annularis* (Dirks and Sternburg 1972), as well as the European species *P. gallicus* (Bordas 1895). However, the vesicle-accessory gland complex, observed in *P. versicolor*, was described only for the North American species (Dirks and Sternburg 1972). These authors suggested that the geographical isolation of the ancestral forms would have originated the anatomical pattern found in North American species. Our results point out that *P. versicolor* and the species of North American *Polistes* share a more recent ancestry when compared to the European species *P. gallicus*.

Although the reproductive systems in the *Polistes* (Polistinae) are very similar, they differ in some aspects from *Ancistrocerus antilope* (Eumeninae) (Bushrow et al. 2006). In *A. antilope*, a single capsule involving the testicles and the seminal vesicles was reported – a pattern also observed in several species of bees of the subfamily Colletinae, Megachilinae, and Apinae (Ferreira et al. 2004). Many species of bees described by Ferreira et al. (2004) have shown conspicuous variation in the reproductive system of males, even within a single family.

The occurrence of 95 spermatozoa per cyst in *P. versicolor* indicates that there are, at least, six mitotic cycles during the spermatogonial proliferation. This number was also observed in other Polistinae such as *Mischocyttarus* sp. (Brito et al. 2005) and *Agelaia vicina* (personal observation). However, in *Eumenes* sp. (Eumeninae), we noticed five mitotic cycles (personal observation). Considering that Eumeninae are more basal than the Polistinae, the hypothesis of Virkki (1970, 1973) that the most derived insects tend to have less sperm per bundle cannot be applied in this case. For instance, in the Crabronidae wasps, there are five mitotic cycles in Pemphredoninae (*Microstigmus*) (Zama et al. 2007) and four cycles in Crabroninae

Trypoxylon (Moreira et al. 2008). In the family Sphecidae, six mitotic cycles were observed in Sceliphrinae *Sceliphron fistularium* (Zama et al. 2005) and four in Sphecinae *Isodontia fuscipennis* (Zama et al. 2007). Thus, in Hymenoptera at least, the number of mitotic events during the spermatogonial proliferation phase may be used in phylogenetic analyses between subfamilies and/or genera, but not in taxa above these categories.

The spermatozoa bundle released from the testes to the seminal vesicles, observed in *P. versicolor*, is a phenomenon common in Hymenoptera in general (Quicke et al. 1992; Moreira et al. 2004; Lino-Neto et al. 2008a). The observation that only mature cells at the spermiogenesis final stage and spermatozoa in the testes of adult *P. versicolor*, as well as in other species of *Polistes* (Dirks and Sternburg 1972) and in *A. antilope* (Bushrow et al. 2006), indicates that in these insects, spermatogenesis begins in the pupal stage and that they produce spermatozoa at once. This characteristic seems to be common among the social Hymenoptera, because it has been observed in ants (Ball and Vison 1984) and bees (Dallacqua and Cruz Landim 2003; Araújo et al. 2005a). In these species, the testis degeneration begins after the spermatozoa migration to the seminal vesicles. Possibly, the same process happens with the social wasps, however, it was not observed because the individuals were obtained from the nests so, they were not sexually mature. The continuous production of spermatozoa is commonly observed in species that mate throughout the entire adult phase (Brockmann 1992; Garcia and Adis 1995; Coville et al. 2000; Buschini 2007; Moreira et al. 2008). This phase is longer for such species than for those that produce sperm only once.

As in most insects, the ejaculatory duct of *P. versicolor* is a single, median structure and presents a cuticle, which demonstrated its ectodermic origin. In *A. antilope* (Vespididae), the presence of two ejaculatory ducts was verified. They begin at the accessory glands base and later join to form the common ejaculatory duct

(Bushrow et al. 2006). However, since these authors did not mention about the cuticle, we cannot confirm if the ducts consist entirely of an ejaculatory duct or if they correspond to the deferent ducts posterior region, followed by the ejaculatory duct.

In Hymenoptera, it has been observed that the spermatozoa morphology varies even among very closely related species. The spermatozoon of *P. versicolor*, as in the majority of the insects, is linear and slender. However, such cells are spiralled in some parasitic wasps, as in Chalcidoidea and Platygastroidea (Lino-Neto et al. 2000; Lino-Neto and Dolder 2001). The spermatozoa length of *P. versicolor* (110 μm) is within the very wide range in size observed for Vespidae, which may vary from 13 to 577 μm (Quicke et al. 1992; Bushrow et al. 2006; Mancini et al. 2006; 2008).

This study supports the use of anatomical differences of the male reproductive system as a tool for the phylogenetic analysis among Hymenoptera families or higher taxa. The number of spermatozoa per cyst may be used when compared within the levels subfamily or genus. Nevertheless, the length of the spermatozoa may be helpful in taxonomic studies.

Acknowledgement

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). We would like to thank Heidi Dolder for critical reading of the manuscript.

References

- Araújo VA, Zama U, Neves CA, Dolder H, Lino-Neto J. 2005a. 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* 22(4): 193-201.
- Araújo VA, Zama U, Dolder H, Lino-Neto J. 2005b. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science* 22(3): 137-141.
- Ball DE, Vinson SB. 1984. Anatomy and histology of the male reproductive system of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *International Journal Morphology and Embriology* 13(4): 283-294.
- Bordas MS. 1895. Appareil genital male des Hymenopteres. *Annual Science and Nature* 20: 101-184.
- Brito P, Moreira J, Lino-Neto J. 2005. Morphology of the male reproductive system and sperm of *Mischocyttarus* sp. (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22(Suppl.): 175-176.
- Brockmann HJ. 1992. Male behavior, courtship and nesting in *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *monteverdeae* (Hymenoptera: Sphecidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 65: 66-84.
- Buschini MLT. 2007. Life-history and sex allocation in *Trypoxylon* (syn. *Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). *Journal Zoological Systematic and Evolution Research* 45: 206-213.
- Bushrow ES, Fuller CL, Cowan DP, Byrd CA. 2006. Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invertebrate Biology* 125(4): 354-362.
- Carpenter J. 1991. Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In: Ross KG, Matthews RW, editors. *The social Biology of Wasps*, pp. 7-32. Cornell University Press.
- Conte M, Lino-Neto J, Dolder H. 2005. Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthiodioides* (Hymenoptera, Apidae). Fate of atypical spermatids. *Caryologia* 58: 183-188.
- Coville RE, Griswold C, Coville PL. 2000. Observations on the nesting biology and behavior of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *vagulum* (Hymenoptera: Sphecidae) in Costa Rica. *Pan-Pac Entomology* 76: 28-48.
- Dallacqua RP, Cruz-Landim C. 2003. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Anatomy, Histology and Embryology* 32: 276-281.
- Dirks TF, Sternburg JG. 1972. Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 1(4): 315-320.
- Evans ME. 1959. The evolution of social life in wasps. *Proceedings of the 10th International Congress of Entomology* 449-457.
- Ferreira A, Abdalla FC, Kerr WE, Cruz-Landim C. 2004. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotropical Entomology* 33: 569-576.

- Garcia MVB, Adis J. 1995. Comportamento de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera, Sphecidae) em uma floresta inundável de várzea na Amazônia Central. *Amazoniana* 13: 259-282.
- Gauld ID, Hanson PE. 1995. The evolution, classification and identification of the Hymenoptera. In: Hanson PE, Gauld ID, editors. *The Hymenoptera of the Costa Rica*, pp.138-156. Oxford University Press.
- Lino-Neto J, Bão SN, Dolder H. 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 81: 205-211.
- Lino-Neto J, Dolder H. 2001. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto J, Dolder H, Mancini K, Mercati D, Dallai R. 2008a. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue & Cell* 40: 185-193.
- Lino-Neto J, Araújo VA, Dolder H. 2008b. Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* 51(1): 163-172.
- Mancini K, Lino-Neto J, Campos LAO, Dolder H. 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelais vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Socias* 53: 333-338.
- Mancini K, Lino-Neto J, Dolder H, Dallai R. 2008. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Structure & Development* 38: 54-59.
- Moreira J, Zama U, Lino-Neto J. 2004. Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Brazilian Journal of Morphological Science* 21(4): 185-189.
- Moreira PA, Araújo VA, Zama U, Lino-Neto J. 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon (Trypargilum)* Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotropical Entomology* 37(4): 429-435.
- Quicke DLJ, Ingram SN, Baillie HS, Gaitens PV. 1992. Sperm structure and ultrasctructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoological Scripta* 21: 381-402.
- Richards OW. 1978. *The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae*, pp. 436-524. London, British Museum (Natural History).
- Schiff N, Flemming AJ, Quicke DLJ. 2001. Spermatodesmata of the sawflies (Hymenoptera: symphyta): evidence for multiple increases in sperm bundle size. *Journal of Hymenoptera Research* 10: 119:125.
- Virkki N. 1970. Alticial beetles with 128 sperm cell per bundle. *Journal of Agricultural University of Puerto Rico* 54: 586-587.
- Virkki N. 1973. Evolution of sperm cell number per bundle in insects. *Anales de Escuela Nacional de Ciencias Biologicas de Mexico* 20: 23-54.
- Zama U, Brito P, Lino-Neto J, Campos LAO, Dolder H, Bão SN. 2005. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 37(3-4): 91-99.

Zama U, Moreira JCS, Báo SN, Campos LAO, Dolder H, Lino-Neto J. 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure & Development* 36: 304-316.

Legends of the figures

Figure 1. Photomicrograph of the anatomy (A-B) and histology (C-J) of the male *Polistes vesicolor* reproductive system. **A.** Reproductive system showing the testes (T), seminal vesicles (sv) and accessory glands (g) separated by the broken line, deferent duct (dd) and the ejaculatory duct **B.** is showing the follicles (F) and the vesicle-gland complex involved by a single capsule (circle of broken lines). **C.** Transversal section of the testes showing six testicular follicles (F) and the testicular capsule (arrow). **D.** Inset: a cyst with 95 spermatozoa. **E.** Longitudinal section of a follicle (F) where the spermatozoa bundle (arrow) is observed being released from the follicles (F) to the efferent duct (ed). **F.** Transverse section of the seminal vesicle showing the thick muscular layer (m), the epithelium (ep) and the lumen (L) with spermatozoa. **G.** Detail of the seminal vesicle's wall showing the epithelium comprised of prismatic cells with spherical and basal nuclei (white arrow) and at the apical third, some vesicular inclusions (circle of broken lines); notice that the epithelium is separated from the external muscular layer (m) by a thick basal membrane (black arrow). **H.** Longitudinal section of the accessory gland (g) and seminal vesicle (vs). **I.** Transverse section of the accessory gland completely filled with secretion (black arrow). Note the epithelium with basal nuclei (white arrow). Bars: A and B = 500 μm ; C, F and I = 150 μm ; D = 5 μm ; E, G, H and J = 50 μm .

Figure 2. A-C. Histology of the *Polistes vesicolor* male reproductive system. **D-E.** Photomicrograph of the spermatozoa and of the nucleus stained with DAPI, respectively. **A.** Longitudinal section from the deferent ducts (dd) insertions into the accessory gland (g). Note the difference between the deferent duct epithelium (dd), with the basal and spherical nuclei (arrow) and the striated border (arrowhead) and the accessory gland (g) epithelium with several secretory vesicles at the apical portion (circle of broken lines). **B.** Transverse section of the deferent ducts (dd) showing the striated border (arrow). **C.** Transverse section of the ejaculatory duct (ej), showing the cuticle (arrow). **D.** Photomicrograph of the spermatozoon. **E.** Head region, stained with DAPI. Bars: A and D = 10 μm ; B and C = 25 μm ; E = 5 μm .

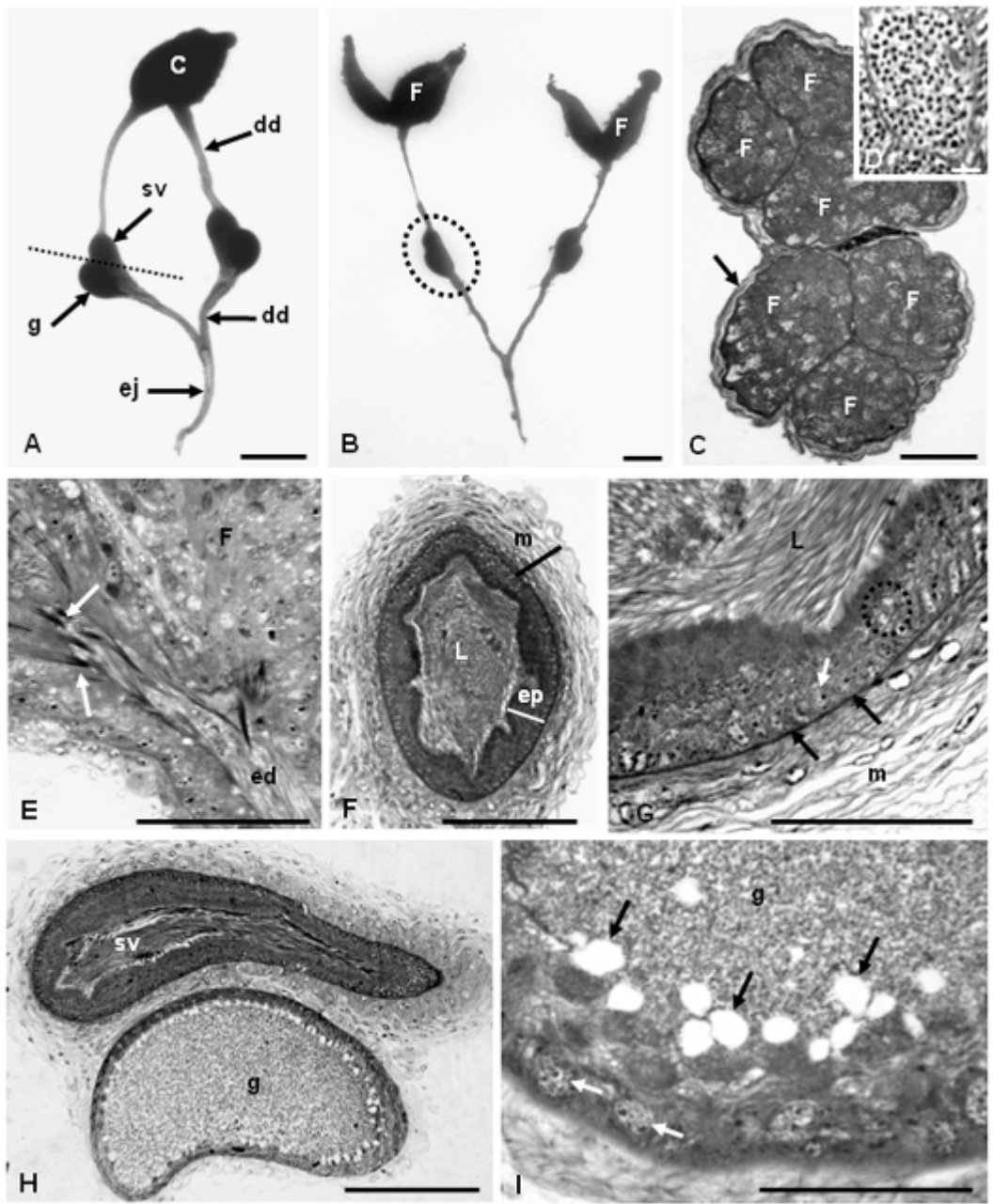


Figura 1

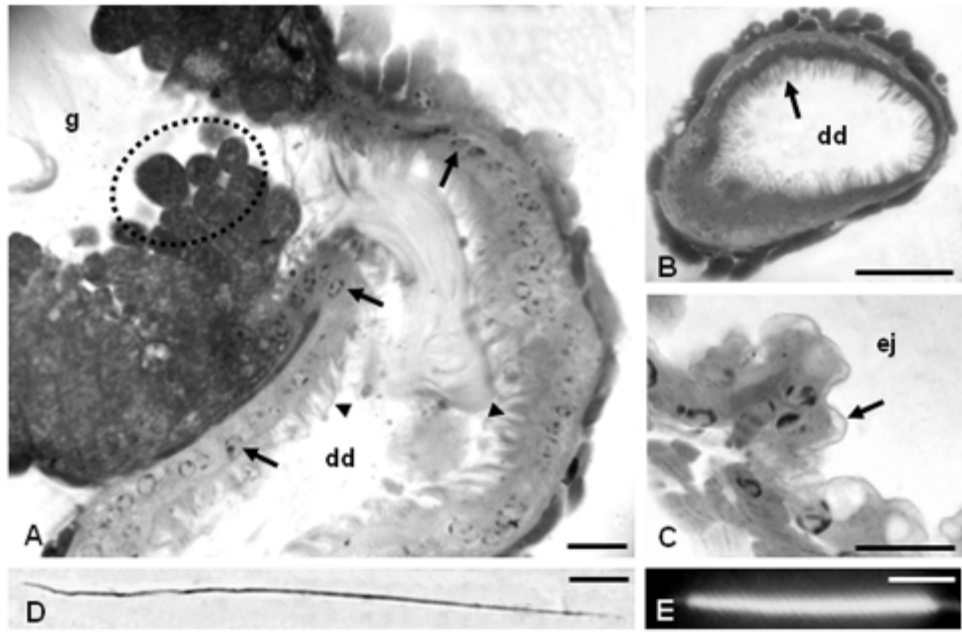


Figura 2

Capítulo 4

3.4. Morfologia do sistema reprodutor masculino em duas espécies de abelhas solitárias (Hymenoptera, Apidae)

RESUMO. As abelhas compreendem espécies representativas em todos os níveis de organização social, de solitárias à eussociais avançadas. As abelhas solitárias compreendem cerca de 80% das espécies, entretanto a maioria dos trabalhos enfatiza as espécies sociais. O objetivo deste trabalho foi descrever o sistema reprodutor masculino das abelhas solitárias *Thygater analis* e *Melitoma segmentaria* buscando caracteres que possam auxiliar em estudos de comportamento e filogenia. Para isso, os sistemas reprodutores dos machos foram dissecados, fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. O material foi desidratado e incluído para microscopia de luz. As espécies possuem características anatômicas similares do sistema reprodutor, compreendendo um par de testículos, vesículas seminais, ductos deferentes, glândulas acessórias e um ducto ejaculatório. Cada testículo contém quatro folículos. Em ambas as espécies um testículo e uma vesícula seminal são envoltos por uma cápsula comum, formando um complexo testículo-vesícula. As duas espécies possuem glândulas acessórias com características morfológicas bem distintas. O padrão anatômico e as características histológicas do sistema reprodutor das espécies estudadas são semelhantes ao descritos para outras abelhas, entretanto possui caracteres capazes de diferenciar as espécies e, ainda permitem inferências acerca da sua biologia reprodutiva.

PALAVRAS-CHAVE: Histologia, glândula acessória, biologia reprodutiva, *Thygater analis* e *Melitoma segmentaria*.

1. Introdução

A fauna de abelhas do novo mundo, especialmente na região Neotropical está entre a mais rica do mundo (Moure et al., 2007). As abelhas têm sido extensamente estudadas devido a sua importância econômica e ecológica, já que são polinizadoras frequentemente exclusivas da maioria das plantas floridas, incluindo espécies cultivadas pelo homem. Os Apidae são também reconhecidos como um grupo diverso em relação ao comportamento social, com espécies representativas em todos os níveis de organização social, de solitárias à eussociais avançadas (Michener, 1974). No Brasil, das 6 mil espécies de abelhas estimadas, mais de 80% são solitárias (Silveira et al., 2002).

Em geral o sistema reprodutor interno dos insetos é formado por um par de testículos, dois ductos deferentes e um ducto ejaculatório. Em cada ducto deferente ocorre uma região dilatada, com epitélio modificado, a vesícula seminal, onde os espermatozoides ficam armazenados até a cópula e, ainda em cada ducto, desemboca uma glândula acessória. Nos Apidae têm sido observadas variações morfológicas do sistema reprodutor e dos espermatozoides (Duvoisin et al., 1999; Lino-Neto et al., 2000; Cruz-Landim, 2001; Cruz-Landim & Dallacqua, 2002; Baer, 2003; Dallacqua & Cruz-Landim, 2003; Bão et al., 2004; Ferreira et al., 2004; Zama et al., 2001, 2004, 2005; Araújo et al., 2005a,b; Fiorillo et al., 2005). Ferreira et al. (2004), em seu trabalho envolvendo 51 espécies de abelhas (de seis famílias, de acordo com a classificação de Michener, 1965), dividiu os sistemas reprodutores masculinos em quatro tipos com base nas diferenças anatômicas. Um exemplo notável dessas diferenças anatômicas em abelhas é a ausência de glândulas acessórias associadas ao trato reprodutor em abelhas sem ferrão da tribo Meliponini.

Trabalhos sobre a histologia do sistema reprodutor masculino de Apidae foram realizados apenas em abelhas sociais como *Melipona quadrisfasciata* (Dallacqua &

Cruz-Landim, 2003), *Scaptotrigona xanthotricha* (Araújo et al., 2005a) e *Melipona monduy* (Lima et al., 2006). Este é o primeiro trabalho a descrever a histologia do sistema reprodutor masculino em abelhas solitárias e tem como objetivo contribuir para o entendimento da biologia reprodutiva deste grupo, bem como fornecer caracteres que possam ser utilizados na sistemática dos Apoidea.

2. Material e Métodos

Oito machos adultos de *Thygater (Thygater) analis* (Lepelletier 1841) e oito de *Melitoma segmentaria* (Fabricius 1804) foram coletados com redes entomológicas enquanto visitavam as flores de *Ipomoea* sp. (Convolvulaceae) no campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

2.1. Light Microscopy. Os sistemas reprodutores de quatro machos de cada espécie foram fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e incluído em resina glicol-metacrilato (Historesin, Leica). Cortes de 2 µm foram corados com azul de toluidina e fotografados em microscópio Olympus BX-60. Para análise anatômica, logo após a fixação, alguns sistemas reprodutores foram fotografados em microscópio Olympus BX-60, e em seguida, desenhados com naquim e grafite.

3. Resultados

A anatomia do sistema reprodutor interno em machos sexualmente maduros das abelhas solitárias *T. analis* e *M. segmentaria* compreende: um par de testículos degenerados com volume reduzido, vesículas seminais, ductos deferentes, glândulas acessórias e um ducto ejaculatório. Cada testículo contém quatro

folículos. Em ambas as espécies um testículo e a respectiva vesícula seminal são envolvidos por uma cápsula comum, formando um complexo testículo-vesícula (Figs. 1A, 1C, 2A, 3A). A anatomia geral do sistema reprodutor é bem diferenciada entre as duas espécies. Em *M. segmentaria*, uma cápsula recobre cada complexo testículo-vesícula separadamente e a vesícula seminal desemboca em uma região dos ductos deferentes pós-glândula acessória (Figs. 1A-B). Já em *T. analis* a cápsula que recobre cada complexo testículo-vesícula é contínua e se prolonga unindo os dois complexos formados. Além disso, nesta espécie a vesícula seminal desemboca na região da glândula acessória, que é adjacente ao complexo testículo-vesícula (Figs. 1C-D).

Os ductos deferentes pré-vesiculares apresentam epitélio simples, formado por células cúbicas de núcleos esféricos e basais. Em *T. analis* observa-se algumas inclusões na região basal ao lado dos núcleos (Fig. 3B). A vesícula seminal é uma região especializada que consiste em um espessamento na região anterior dos ductos deferentes, na qual os espermatozoides ficam armazenados até a cópula. A vesícula seminal é muito similar nas duas espécies (Figs. 2A, 2C-D, 3A, 3C-D). Ela é tubular e apresenta uma dobra na região mediana que a divide em duas regiões, as quais ficam em paralelo entre si e com o testículo (Figs. 2C e 3A). Nas vesículas seminais o epitélio é simples, formado por células prismáticas com núcleos esféricos e basais, sendo observadas várias vesículas distribuídas por toda a célula (Figs. 2C e 3C). Uma membrana basal separa as células epiteliais de uma túnica formada por feixes de células musculares (Figs. 2D e 3C).

O complexo testículo-vesícula se conecta aos ductos deferentes pós-vesiculares, os quais estão repletos de secreção (Figs. 2E e 3D). Os ductos deferentes pós-vesiculares apresentam epitélio simples formado por células cúbicas de núcleos esféricos e basais (Fig. 2H).

A duas espécies possuem glândulas acessórias com características morfológicas bem distintas. Em *M. segmentaria* elas são arredondadas, o epitélio é formado por células prismáticas com núcleos esféricos, localizados na região apical e apresenta muitos grânulos de secreção em todo o citoplasma (Figs. 2F-G). Em *T. analis* as glândulas acessórias são ovais-achatadas com epitélio baixo formado por células cúbicas com núcleos fusiformes e basais (Fig. 3A e 3E).

Posteriormente, os dois ductos deferentes desembocam no ducto ejaculatório (Fig. 2I-J), o qual possui o epitélio cúbico revestido por uma fina cutícula.

4. Discussão

A morfologia geral do sistema reprodutor das abelhas solitárias *T. analis* (Eucerini) e *M. segmentaria* (Emphorini) é similar ao observado em várias outras espécies de Hymenoptera. Particularmente, se assemelha ao padrão tipo III, observado em abelhas que também pertencem a subfamília Apinae (Ferreira et al., 2004) e é caracterizado pela presença de uma única cápsula envolvendo um testículo e uma vesícula seminal, glândulas acessórias bem desenvolvidas, ducto ejaculatório calibroso e quatro folículos em cada testículo. Outras subfamílias de abelhas como Mellitinae e alguns Megachilinae também apresentam quatro folículos por testículo (Roig-Alsina & Michener, 1993; Ferreira et al., 2004) com exceção de *Apis mellifera* com cerca de 250. A ocorrência de três folículos foi registrada em abelhas consideradas mais basais, como Colletinae, Andreninae e Hactinae (Ferreira et al., 2004; Araújo et al., 2005a) e em vespas Crabronidae (Moreira et al., 2008) considerado grupo irmão das abelhas. Por outro lado, este número varia de 1 a 11 em Formicidae (Wheeler & Krutzch, 1992) e em vespas Chalcidoidea foi observado somente um folículo por testículo (Fiorillo et al., 2008). As várias espécies de abelhas estudadas por Ferreira et al. (2004) mostraram

variações conspícuas na anatomia do sistema reprodutor, até mesmo dentro da mesma subfamília. Neste trabalho, tal variação no arranjo anatômico das estruturas ao longo do trato reprodutor permite fácil distinção entre as duas espécies estudadas, o que pode ser considerado como possível caracter taxonômico.

Nas abelhas solitárias estudadas, os espermatozóides são produzidos uma única vez e os testículos entram em processo de degeneração quando os machos tornam-se sexualmente maduros, como foi também observado nas abelhas sociais *Melipona bicolor bicolor* (Dallacqua & Cruz Landim, 2003) e *Scaptotrigona xanthotricha* (Araújo et al., 2005) e na formiga *Sonelopsis invicta* (Ball & Vison, 1984). Nestas espécies, os espermatozóides saem dos testículos em feixes e quando alcançam as vesículas seminais os feixes são desfeitos (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2004; Lino-Neto et al., 2008). A produção contínua de espermatozóides é comum em espécies que tem a vida adulta longa e copulam ao longo de toda esta fase (Buschini, 2007; Moreira et al., 2008). Machos de abelhas solitárias, em geral, emergem antes das fêmeas e patrulham as áreas de nidificação a procura de fêmeas recém emergidas (Raw, 2002). Dessa forma, precisam completar a maturação sexual durante a pupação, antes de emergirem.

As secreções das glândulas acessórias estão associadas com a manutenção e ativação dos espermatozóides e a indução e aceleração da oviposição nas fêmeas (Chen, 1984; Raina et al., 1994; Gillot, 2003). Em *T. analis* e *M. segmentaria* essas glândulas são bem desenvolvidas e em machos sexualmente maduros elas se encontram repletas de secreção. Tais secreções possivelmente podem estar envolvidas em estratégias reprodutivas do macho relacionadas com mecanismos que possam assegurar a fidelidade de cópula e a manter seus espermatozóides viáveis na espermateca da fêmea por um período mais longo.

O ducto ejaculatório, assim como na maioria dos insetos, é único, mediano e apresenta uma cutícula, evidenciando sua origem ectodérmica (Bushrow et al.,

2006; Moreira et al., 2008). O epitélio encontrado nos ductos espermáticos ao longo do trato reprodutor nas abelhas solitárias é similar ao descrito para abelhas sociais (Dallacqua & Cruz Landim, 2003; Araújo et al., 2005; Lima et al., 2006), formigas (Ball & Vison, 1984; Wheeler & Krutzsch, 1992) e vespas (Dirks & Sternburg, 1972; Bushrow et al., 2006; Moreira et al., 2008). Entretanto, algumas diferenças podem ser evidenciadas como a grande quantidade de inclusões no epitélio da vesícula seminal e as diferenças no tipo de epitélio das glândulas acessórias entre as duas espécies de abelhas estudadas.

Referências

- Araújo VA; Zama U; Neves CA; Dolder H; Lino-Neto J (2005a) Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22 (4): 193-201.
- Araújo VA; Zama U; Dolder H; Lino-Neto J (2005b) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci. 22 (3): 137-141.
- Baer B; Schmid-Hempel P; Hoeg JT; Boomsma JJ (2003) Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. Insectes Sociaux 50: 101-108.
- 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.
- Ball DE; Vinson SB (1984) Anatomy and histology of the male reproductive system of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). Int. J. Morphol. Embryol. 13(4): 283-294.
- Buschini, MLT (2007) Life-history and sex allocation in *Trypoxylon (syn. Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). J. Zool. Syst. Evol. Res. 45: 206-213.
- Bushrow ES; Fuller CL; Cowan DP; Byrd CA (2006) Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). Invert. Biol. 125(4): 354-362.
- Chen PS (1984) The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. Ann. Rev. Entomol. 29: 233-255.
- 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; 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* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Anat. Hist. Embryol. 32: 276-281.
- Dirks TF; Sternburg JG (1972) Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 1(4): 315-320.
- Duvoisin N; Baer B; Schmid-Hempel P (1999) Sperm transfer and male competition in a bumblebee. Animal Behaviour 58: 743-749.
- 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.
- Fiorillo BS; Coelho AAM; Lino-Neto J; Báo SN (2005) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 37(1): 75-81.
- Fiorillo BS; Lino-Neto J; Báo SN (2008) Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). Micron 39: 1271-1280.

- Gillot C (2003) Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 163-184.
- Lima MAP; Lino-Neto J; Campos LAO (2006) Sexual maturation in *Melipona mondury* males (Apidae: Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 23(3-4): 369-375.
- Lino-Neto J; Bão SN; Dolder H (2000) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81: 205-211.
- Lino-Neto J; Dolder H; Mancini K; Mercati D; Dallai R (2008) The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185-193.
- Michener CD (1965) A classification of the bees of the Australian and south pacific regions. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 130: 1-362.
- Michener CD (1974) The social behavior of the bees – A comparative study. Cambridge, Belknap. 404p.
- Moreira J; Zama U; Lino-Neto J (2004) Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(4): 185-189.
- Moreira PA; Araújo VA; Zama U; Lino-Neto J (2008) Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37(4): 429-435.
- Moure JS; Urban D; Melo GAR (2007) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. *Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba*, xiv, 1058p.
- Quicke DLJ; Ingram SN; Baillie HS; Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrasctructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21: 381-402.
- 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.
- Raw A (2002) New combinations and synonymies of leafcutter and mason bees of the Americas (*Megachile*, Hymenoptera, Megachilidae). *Zootaxa* 71: 1-43.
- Roig-Alsina A; Michener CD (1993) Studies of phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kans. Sci. Bull.* 55: 124-162.
- Silveira FA; Melo GAR; Almeida EA (2002) Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte. 253pp.
- Zama U; Lino-Neto J; Dolder H (2001) Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10: 261-270.
- Zama U; Lino-Neto J; Dolder H (2004) Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36: 29-41.
- Zama U; Lino-Neto J; Melo SM; Campos LAO; Dolder H; (2005) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes sociaux* 52: 122-131.
- Wheeler DE; Krutzsch PH (1992) Internal reproductive system in adult males of the Genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* 211: 307-317.

Legenda das figuras

Figure 1. **A.** Sistema reprodutor masculino de *Melitoma segmentaria*. O asterisco indica o complexo vesícula seminal-testículo e **(B)** mostra um lado do sistema reprodutor sem a cápsula. **C.** Sistema reprodutor masculino de *Thygater analis*, o asterisco indica o complexo vesícula seminal-testículo e em **(D)**, mostrando um lado do sistema reprodutor sem a cápsula. g = glândula acessória, ed = ducto ejaculatório, dd = ducto deferente, sv = vesícula seminal, f = folículo. Barras: A-D = 100 µm.

Figura 2. Histologia do sistema reprodutor de machos sexualmente maduros de *Melitoma segmentaria*. **A.** Corte longitudinal do complexo testículo-vesícula mostrando o testículo em degeneração (T) e a vesícula seminal (sv) envolvidos por uma única cápsula (setas) e o ducto deferente (dd). **B.** Corte transversal no nível indicado pela linha tracejada da figura anterior, evidenciando os quatro folículos em degeneração (F), o ducto deferente pré-vesiculares (setas brancas) e a cápsula que recobre o complexo testículo-vesícula (seta preta). **C.** Corte transversal do ducto deferente pré-vesiculares (asterisco) e da vesícula seminal, mostrando o lúmen (L) com espermatozóides e a cápsula (seta). **D.** Corte transversal da vesícula seminal mostrando o epitélio (ep) composto por células prismáticas com núcleos esféricos basais (seta preta) e citoplasma com inclusões (círculo tracejado); o epitélio é separado da camada muscular (asterisco) pela membrana basal (seta branca). **E.** Corte longitudinal do ducto deferente na região onde desemboca a vesícula seminal (círculo tracejado); o lúmen (L) está repleto de secreção. **F.** Corte transversal da glândula acessória, mostrando o lúmen (L) repleto de secreção e a camada muscular (seta). **G.** Detalhe da parede da glândula acessória. Notar o epitélio (ep) formado por células prismáticas com núcleos esféricos localizados no terço apical (seta branca). L = lúmen. **H.** Corte longitudinal do ducto deferente (dd) mostrando o epitélio formado por células cúbicas com núcleos esféricos basais (seta) e o lúmen (L) com secreção. **I-J.** Corte transversal e longitudinal, respectivamente, do ducto ejaculatório, mostrando a parede recoberta por uma cutícula (seta). Barras: A-C, F e I = 100 µm; D-E, H e J = 50 µm; G = 15 µm.

Figura 3. Histologia do sistema reprodutor de machos sexualmente maduros de *Thygater analis*. **A.** Corte longitudinal do complexo testículo-vesícula mostrando os testículos em degeneração (T), a vesícula seminal (sv) e o ducto deferente pré-vesicular (dd) envolvidos por uma única cápsula (seta) e a glândula acessória (g) adjacente ao complexo testículo-vesícula. **B.** Corte transversal, em maior aumento, do ducto deferente pré vesicular, evidenciando os núcleos esféricos basais (seta branca) e a presença de grandes inclusões próximas aos núcleos (setas pretas). L = lúmen. **C.** Corte transversal da vesícula seminal mostrando o lúmen (L) repleto de espermatozoides; o epitélio (ep) composto por células prismáticas com núcleos basais (seta branca) e no citoplasma observa-se inclusões (círculo tracejado); o epitélio é separado da camada muscular (m) por uma espessa membrana basal (seta preta). **D.** Corte longitudinal da região onde a vesícula seminal (sv) desemboca no ducto deferente pré-glandular (dd). **E.** Corte transversal da glândula acessória, mostrando o lúmen (L) repleto de secreção, o epitélio formado por células pavimentosas com núcleos de formatos irregulares (círculo tracejado) e a camada muscular (seta). Barras: A = 100 µm; B-C e E = 25 µm; D = 50 µm.

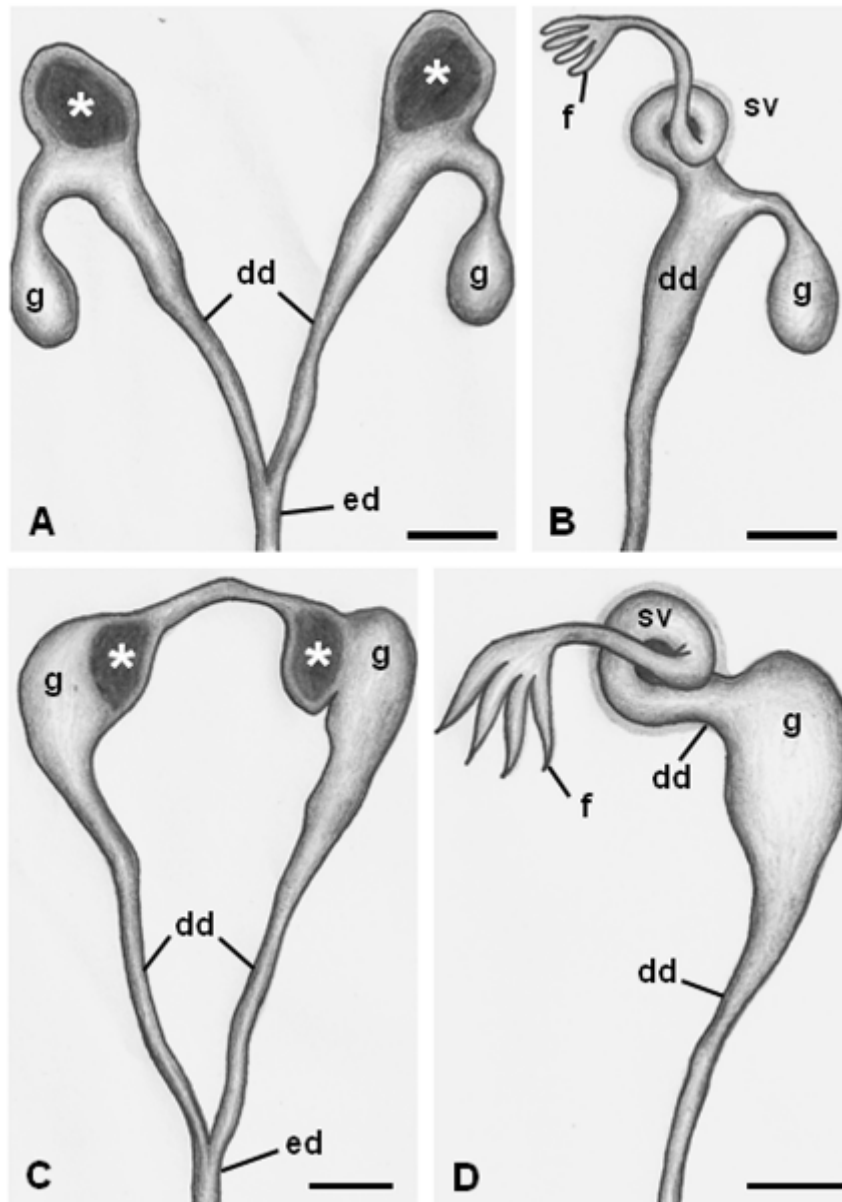


Figura 1

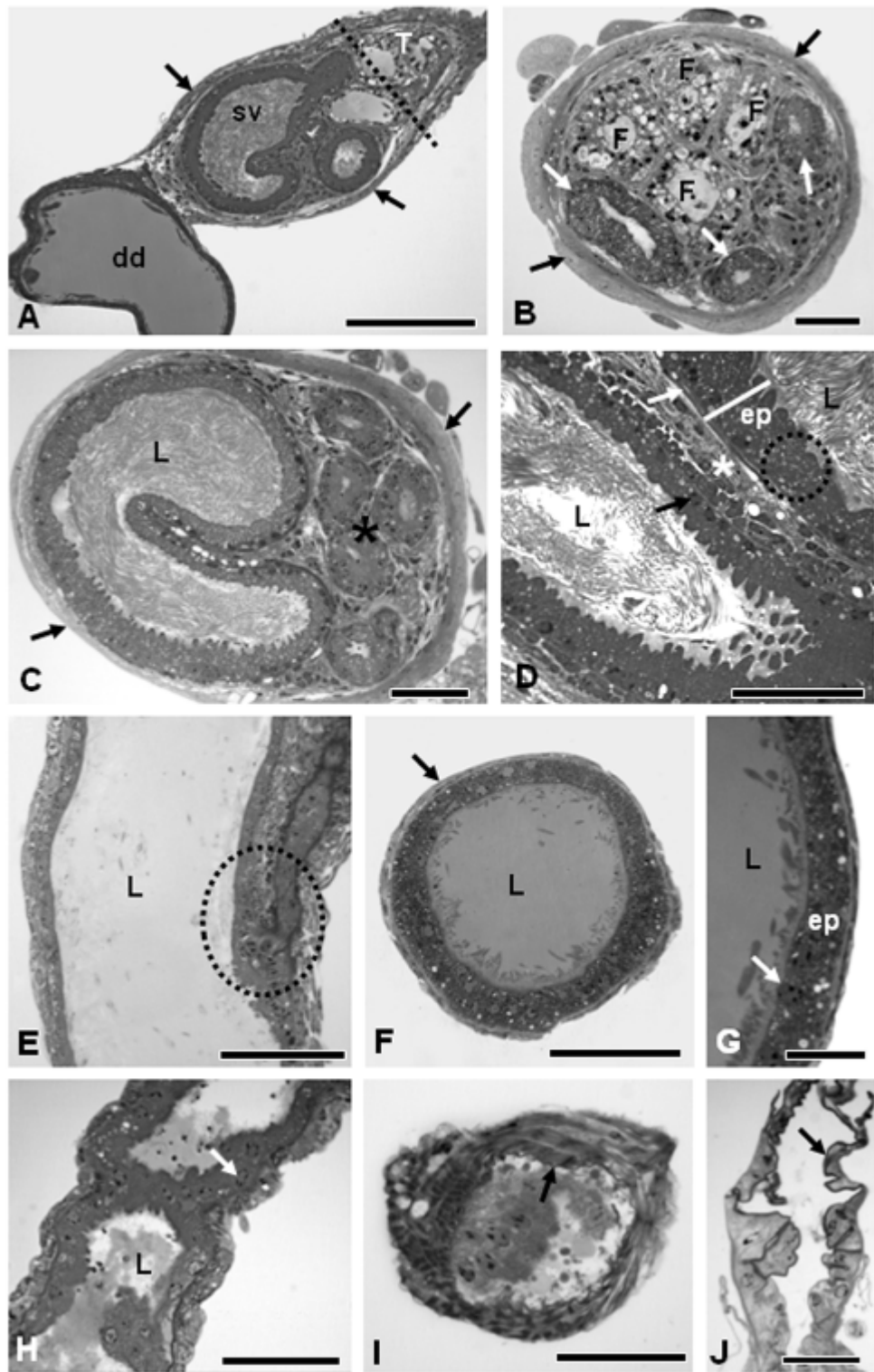


Figura 2

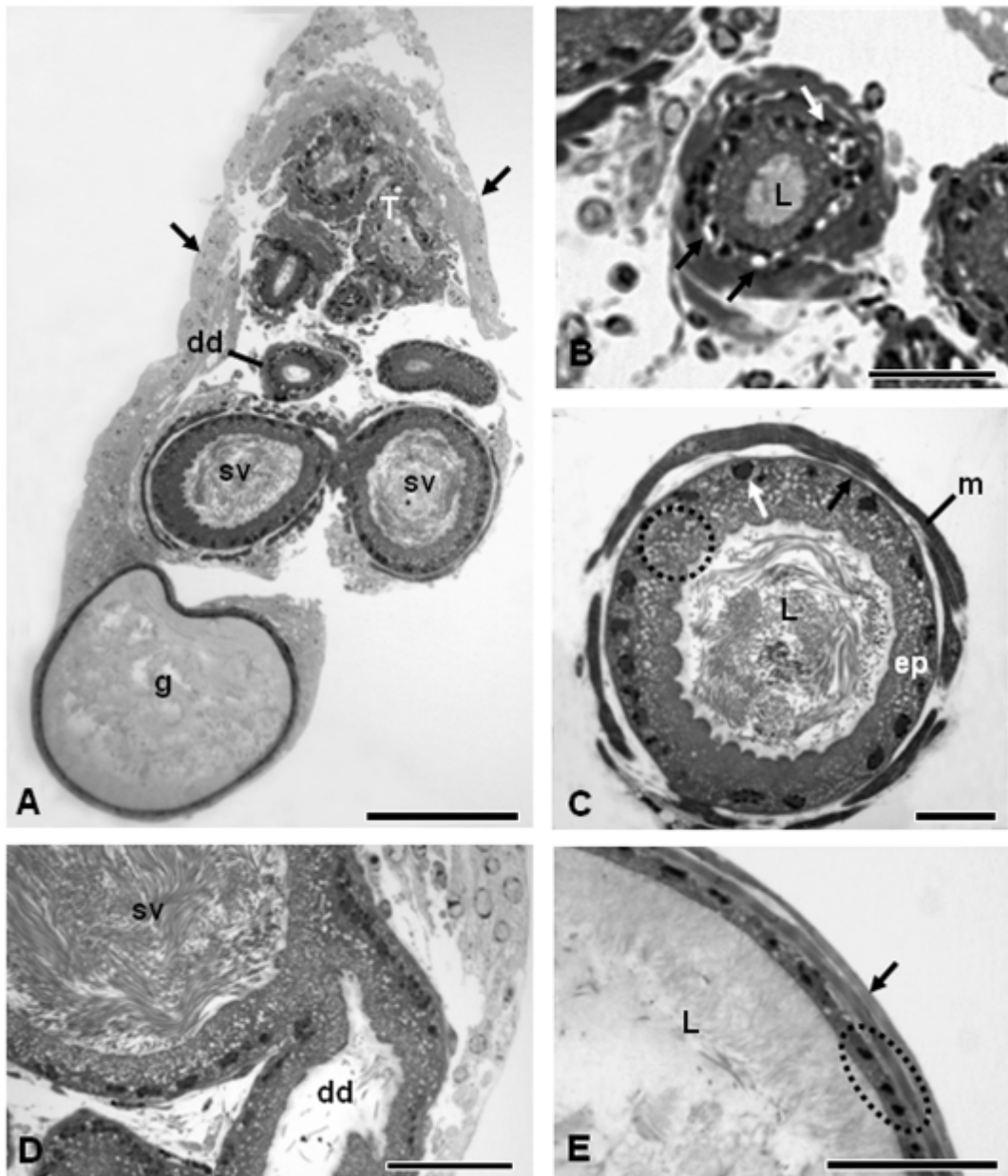


Figura 3

Capítulo 5

3.5. Caracterização ultra-estrutural dos espermatozóides de *Aethalion reticulatum* Linnaeus, 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae)

RESUMO. A ordem Hemiptera é atualmente dividida em quatro subordens, dentre elas a Auchenorrhyncha que é considerada parafilética. Como a morfologia dos espermatozoides fornece caracteres promissores para inferências filogenéticas, neste trabalho os espermatozoides de *Aethalion reticulatum* (Aethalionidae) foram examinados pela microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, com o objetivo de revelar caracteres que possam ser aplicados na sistemática da subordem. Nesta espécie os espermatozoides permanecem em feixes na vesícula seminal. A cabeça dos espermatozoides é formada por um acrossomo e pelo núcleo. O núcleo é linear, preenchido por cromatina compacta, mas possui algumas lacunas elétricas. O adjunto do centríolo está localizado anteriormente aos derivados mitocondriais. O flagelo consiste de um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. O axonema apresenta o padrão típico para insetos de 9 + 9 + 2 microtúbulos. Os derivados mitocondriais são simétricos. Os corpos acessórios são longos e possuem, em corte transversal, formato de meia lua. Na extremidade posterior do axonema os microtúbulos acessórios são os primeiros a terminarem, seguido do par central e das duplas. A presença dos corpos acessórios e a sequência de terminação dos microtúbulos difere marcadamente de outras espécies de Cicadomorpha estudadas. A morfologia dos espermatozoides em outras famílias de Auchenorrhyncha pode revelar sinapomorfias e contribuir para a sistemática da subordem.

PALAVRAS-CHAVE: Cicadomorpha, adjunto do centríolo, espermatozoides e corpos acessórios.

1. Introdução

Os espermatozóides são células altamente especializadas e têm sofrido evolução morfológica, a qual não tem paralelo em outros tipos celulares (Baccetti & Afzelius, 1976). Os trabalhos de revisão de Franzén (1970) e Wirth (1984) apontaram o valor potencial da morfologia dos espermatozóides para estudos filogenéticos dos invertebrados, grupo em que se observa a maior diversidade dessas células, principalmente entre os insetos (Baccetti & Dallai, 1978; Sivinski, 1984; Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999). Todas as espécies estudadas possuem espermatozóides com características únicas, variando entre espécies na forma, tamanho e em características ultra-estruturais.

As espécies da ordem Hemiptera são atualmente divididas em quatro subordens: Heteroptera, Coleorrhyncha, Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha. A subordem Auchenorrhyncha é considerada parafilética e suas espécies estão agrupadas em 31 famílias (Campbell et al., 1994, 1995; Sorensen et al., 1995; Von Dohlen & Moran, 1995). Dentre elas, a família Aethalionidae que possui apenas três espécies distribuídas ao longo das regiões tropicais do mundo. A espécie *Aethalion reticulatum* possui hábito de sugar a seiva de plantas, prejudicando o desenvolvimento de frutos e brotações podendo, em altas infestações, causar grandes perdas agrícolas. Esta espécie frequentemente vive em simbiose com formigas do gênero *Camponotus* atacando folhas e ramos de inúmeras plantas cultivadas e nativas (Gallo et al., 2002).

A despeito da validade dos caracteres derivados dos espermatozóides para análises sistemáticas em insetos, é necessário amostrar um número representativo de táxons para que hipóteses filogenéticas possam ser inferidas. Na subordem Auchenorrhyncha, algumas espécies representantes da infraordem Cicadomorpha (Cicadidae, Cercopidae e Cicadellidae) e Fulgoromorpha tiveram a ultra-estrutura dos espermatozóides descrita (Folliot & Maillet, 1970; Kubo-Irie et al., 2003;

Chawanji et al., 2005, 2006) e caracteres sinapomórficos foram revelados para algumas subfamílias. Neste estudo, a ultra-estrutura do espermatozóide foi descrita pela primeira vez para uma espécie da família Aethalionidae com o objetivo de encontrar caracteres que possam ser aplicados na sistemática da parafilética subordem Auchenorrhyncha.

2. Material e Métodos

Dez machos adultos de *Aethalion reticulatum* (Linnaeus, 1767) foram coletados diretamente de agregações nos galhos de árvores do gênero *Magnolia* (Magnoliaceae) no campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

2.1. Microscopia de luz – De cada macho, suspensão de espermatozóides extraídos de uma das vesículas seminais foi espalhada em lâminas histológicas e fixada por vinte minutos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2. Após secar em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio equipado com contraste de fase e 200 espermatozóides foram fotografados para serem medidos. Para medir os núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) 0.2 µg/ml em PBS, lavadas e montadas em sacarose 50%. Essas lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm e 200 núcleos foram fotografados. Todas as medidas foram feitas usando o software Image Pro-Plus (Media Cybernetics) e os comprimentos foram expressos pela média do número total de espermatozóides analisados.

2.2. Microscopia eletrônica de transmissão – De cada macho, uma das vesículas seminais foi fixada por 24 h, a 4°C, em solução contendo glutaraldeído 2.5%, ácido pícrico 0.2%, sacarose 3% e 5 mM CaCl₂ diluídos em tampão cacodilato de sódio,

pH 7.2. O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, desidratado em acetona e incluído em Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2% em solução de hidróxido de sódio 1N e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109 e JEOL 100C).

3. Resultados

Os espermatozoides de *Aethalion reticulatum* são longos, finos e medem, em média, 140 µm de comprimento (Fig. 1A). Na vesícula seminal, os espermatozoides estão organizados em feixes com a região anterior da cabeça (acrossomo e parte do núcleo) embebida em uma matriz extracelular (Fig. 1C-G).

O acrossomo é formado por uma vesícula acrossomal cônica e, posteriormente, possui uma invaginação para formar um espaço subacrossomal (Fig. 1H). Inúmeros filamentos irradiam da vesícula acrossomal (Fig. 1H-I). A extremidade anterior do núcleo é inserida na região posterior do espaço subacrossomal (Fig. 1J).

O núcleo é linear, longo e mede, em média, 55 µm de comprimento (Fig. 1B). Ele é preenchido por cromatina compacta (Fig. 2A-B) e possui algumas lacunas elétricas ao longo de toda sua extensão (Fig. 2B, 2D-E). Na região anterior, em seção transversal, o núcleo possui formato oval (Fig. 2B). Posteriormente, sua extremidade é afilada lateralmente, na região de transição núcleo-flagelo (Fig. 2A, 2E, 2I-J). Nesta região, o núcleo se estende em paralelamente ao adjunto do centríolo (Fig. 2A, 2C) e mais posteriormente, aos derivados mitocondriais (Fig. 2A, 2D, 2F-H). O adjunto do centríolo tem localização anterior aos derivados mitocondriais. Em seção longitudinal, o adjunto do centríolo mostra-se alongado e composto por um material elétron denso (Fig. 2A, 2E). A extremidade afilada posterior do núcleo termina justamente acima da região centriolar (Fig. 2K-O).

O flagelo consiste de um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios (Fig. 3A). A porção anterior do axonema é formada somente pelos microtúbulos acessórios, pelas duplas e por um material amorfo denso, correspondendo à região do centríolo. Os microtúbulos centrais começam após a região centriolar (Fig. 2I-J, 2O). O axonema apresenta o padrão típico de 9 + 9 + 2 microtúbulos, sendo 9 acessórios, 9 duplas e 2 microtúbulos centrais (Fig. 3A). Os derivados mitocondriais são simétricos (Fig. 3A) e se estendem ao longo da maior parte do flagelo estando posicionados lateralmente ao axonema e iniciando adjacente a extremidade posterior do adjunto do centríolo (Fig. 2A, 2E, 2I). Os derivados mitocondriais estão divididos em uma região clara, menos elétron-densa, adjacente ao axonema, uma região de material paracristalino e a região de crista mitocondrial, a qual é restrita a periferia dos derivados (Fig. 3A). Em cortes longitudinais, as cristas se mostram perpendiculares ao longo do eixo dos derivados e com espaços em intervalos regulares que medem 30 nm (Fig. 3B).

Os corpos acessórios são longos e possuem, em corte transversal, formato de meia lua (Fig. 3A). Estas estruturas são encontradas ao lado do axonema e paralelas aos derivados mitocondriais e possuem uma região circular de material paracristalino ao longo de todo o seu comprimento (Fig. 3A, 3C).

Na região final do flagelo, os derivados mitocondriais terminam antes do axonema (Fig. 3D). O axonema é o componente mais longo do flagelo, sendo que, na sua extremidade posterior, os microtúbulos se desorganizam simultaneamente (Fig. 3D-F).

4. Discussão

Os espermatozoides de *Aethaliom reticulatum* possuem apenas uma classe de tamanho de núcleo e flagelo. O comprimento médio dos espermatozoides nesta espécie (140 µm) está dentro do intervalo observado em outros Auchenorrhyncha,

que varia de 56 a 233 μm (Folliot & Maillet, 1970; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006). Entretanto, os espermatozoides em Cicadidae apresentaram mais de um tamanho de núcleo e de flagelo para a mesma espécie (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006), fenômeno conhecido como polimorfismo. Dentre as espécies de Cicadidae, o comprimento dos espermatozoides foi apontado como um dos principais caracteres que diferem espécies das tribos Cicadettine e Platypleurine (Chawanji et al., 2005, 2006).

A presença de espermatozoides agrupados em feixes é um fenômeno comum em insetos (Folliot & Maillet, 1970; Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1999; Kubo-Irie et al., 2003; Lino-Neto et al., 2008). Em *A. reticulatum*, assim como nos demais Auchenorrhyncha, o acrossomo e parte do núcleo estão inseridos em uma matriz extracelular formando os feixes. Em espécies de Auchenorrhyncha esses feixes são mantidos na vesícula seminal e, dessa forma, serão transferidos para as fêmeas (Folliot & Maillet, 1970; Jamieson et al., 1999; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006). Em algumas espécies de Heteroptera, como em *Nepomorpha*, os feixes são desfeitos quando alcançam as vesículas seminais (Lee & Lee, 1992).

Em trabalhos prévios com algumas famílias de Cicadomorpha (Cicadidae, Cercopidae e Cicadellidae) e Fulgoromorpha (Folliot & Maillet, 1970; Kubo-Irie et al., 2003) a morfologia dos espermatozoides não foi descrita completamente. Uma completa descrição estrutural e ultra-estrutural dos espermatozoides de várias espécies de Cicadidae foi realizada por Chawanji et al. (2005, 2006). Os espermatozoides de *A. reticulatum* possuem várias características similares aos dos Auchenorrhyncha já descritos: (1) espermatozoides agregados em uma matriz homogênea formando um espermatodesmata (2) acrossomo cônico (3) núcleo cilíndrico e bilateralmente simétrico e com a extremidade posterior afilada lateralmente; (4) ausência de um perforatorium; (5) dois derivados mitocondriais em

posição lateral e estendidos ao longo do axonema e (6) um adjunto do centríolo que antecede ambos os derivados mitocondriais.

O adjunto do centríolo foi primeiramente nomeado por Gatenby & Tahmisian (1959), referindo a uma estrutura que se forma ao redor do centríolo na região de transição núcleo-flagelo. Como proposto por Folliot & Maillet (1970) e Chawanji et al., (2006) o nome adjunto do centríolo foi mantido para os Cicadomorpha, apesar de ser localizado em uma posição anterior ao centríolo. Em *A. reticulatum*, assim como em cigarras da subtribo Platypleurinae (Chawanji et al., 2005), o adjunto é alongado e consiste de uma material homogêneo e moderadamente elétron denso. Em espécies de Cicadettinae o adjunto do centríolo é relativamente grande e possuem uma subestrutura lamelada, caracteres que foram considerados sinapomórficos para esta subtribo (Chawanji et al., 2006).

A presença de corpos acessórios é a principal diferença em relação a outras espécies de Cicadomorpha. Chawanji et al., (2005) sugerem que a perda dos corpos acessórios nas famílias Cicadidae e Cercopidae apontam essas famílias como proximamente relacionadas. De fato, tal relação está de acordo com a atual filogenia aceita para o grupo (Campbell et al., 1995; Bourggoin & Campbell, 2002) que também aponta as famílias Aethalionidae e Cicadellidae, que possuem corpos acessórios, como mais proximamente relacionadas dentro da superfamília Membracoidea.

Na extremidade posterior flagelar de *A. reticulatum* os microtúbulos se desorganizam simultaneamente, diferente das espécies de Cicadidae (Chawanji et al., 2005) em que o par central é o primeiro a terminar.

Nesse estudo, a descrição estrutural e ultra-estrutural dos espermatozóides de *A. reticulatum* trata do primeiro registro para a família Aethalionidae. Alguns caracteres, como a presença dos corpos acessórios e a sequência de terminação dos microtúbulos, difere marcadamente de outras espécies de Cicadomorpha.

Chawanji et al. (2005, 2006) demonstraram caracteres sinapomórficos que permitem separação de subtribos de Cicadidae, baseados principalmente em características do adjunto do centríolo e em medidas do tamanho do flagelo e do núcleo. Estudos adicionais com a morfologia dos espermatozóides dos Auchenorrhyncha poderão revelar novas sinapomorfias e utilizar esses caracteres em análises filogenéticas do grupo, contribuindo para elucidar o atual status de grupo parafilético da subordem Auchenorrhyncha.

Agradecimentos

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília (UnB). Esta pesquisa foi suportada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Proc. 142455/2005-9) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Referências

- Baccetti B; Afzelius A (1976) The biology of the sperm cell. S. Karger, Basel. Munchen. Paris. London. New York. Sydney.
- Baccetti B; Dallai R (1978) The evolution of myriapod spermatozoa. Abh. Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg 21(22): 203-217.
- Campbell BC; Steffen-Campbell JD; Gill RJ (1994) Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. Insect Mol. Biol. 3: 73-88.
- Campbell BC; Steffen-Campbell JD; Sorensen JT; Gill R (1995) Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. Syst. Entomol. 20: 175-194.
- Chawanji AS; Hodgson AN; Villet MH (2005) Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 37: 257-267.
- Chawanji AS; Hodgson AN; Villet MH (2006) Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 38: 373-388.
- Folliot R; Maillet PL (1970) Ultrastructure de la spermiogénèse et du spermatozoïde de divers insectes Homoptères. In: Baccetti, B (Ed.), Comparative Spermatology. Academic Press, New York, pp. 289-300.
- Franzén A (1970) Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. In: Baccetti B (Ed.) Comparative Spermatology. Academic Press, New York, London, pp. 29-46.
- Gallo D; Nakamo O; Silveira-Neto S; Carvalho RPL; Batista GC; Berti-Filho E; Parra JRP; Zuchi RA; Alves SB; Vendramim JD; Marchini LC; Lopes JRS; Omoto C (2002) Entomologia agrícola. Piracicaba: Livroceres, 920p.
- Gatenby JB; Tahmisian TN (1959) Centriole adjunct, centrioles, mitochondria and ergastoplasm in orthopteran spermatogenesis. An electron microscopy study. Cellule 60: 104-134.
- Jamieson BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999) Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, NH, USA: Scientific publishers.
- Kubo-Irie M; Nakazawa M; Mohri H (2003) Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). J. Insect Physiol. 49: 983-991.
- Lee YH; Lee CE (1992) Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. Zool. Sci. 9: 971-981.
- Lino-Neto J; Dolder H; Mancini K; Mercati D; Dallai R (2008) The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). Tissue Cell 40: 185-193.
- Newman TM; Quicke DLJ (1999) Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae), J. Hym. Res. 8: 197-203.
- Quicke DLJ; Ingram SN; Baillie HS; Gaitens PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). Zool. Scr. 21: 381-402.

- Sivinski J (1984) Sperm in competition. In: Smith RL (Ed.) Sperm competition and evolution of animal mating systems. Academic Press, New York, pp. 85-115.
- Sorensen JT; Campbell BC; Gill RJ; Steffen-Campbell JD (1995) Non-monophyly of Auchenorrhyncha ("Homoptera"), based upon 18S rDNA phylogeny: eco-evolutionary and cladistic implications within pre-heteropteroidea Hemiptera (s.l.) and a proposal for new monophyletic suborders. Pan-Pacific Entomol. 71 (1): 31-60.
- Von Dohlen CD; Moran NA (1995) Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon. J. Mol. Evol. 41: 211-223.
- Wirth U (1984) Die struktur der metazoen-spermien und ihre bedeutung fur die phylogenetik. Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg 27: 295-362.

Legenda das Figuras

Figura 1. Fotomicrografia de luz (A-B) e eletrônica de transmissão (C-J) dos espermatozoides de *Aethalion reticulatum*. **A.** Fotomicrografia em contraste de fase do espermatozoide, a seta indica o limite entre a cabeça (h) e o flagelo (f). **B.** Fotomicrografia de fluorescência da região da cabeça, mostrando o núcleo corado com DAPI. **C-D.** Corte de um espermatodesmata na vesícula seminal, mostrando núcleos seccionados em posição longitudinal (setas) e transversal (cabeça de seta) embebidos em uma matriz de material extracelular (m). **E.** Corte longitudinal da região anterior de um espermatodesmata, mostrando o núcleo (setas) e o acrossomo (cabeças de seta) inseridos na matriz (m). **F.** Corte transversal de um espermatodesmata seccionado na altura dos núcleos. **G.** Corte longitudinal da região de transição entre o acrossomo (ac) e o núcleo (n) indicando uma estrutura lamelar na extremidade anterior do núcleo (seta). **H-I.** Corte longitudinal e transversal, respectivamente, do acrossomo, mostrando os filamentos (cabeças de seta) irradiando da vesícula acrossomal (asterisco). A seta indica a região elétron lúcida que separa a vesícula acrossomal. **J.** Corte transversal da região de transição entre o acrossomo (ac) e o núcleo (seta). A cabeça de seta indica as lacunas elétron-lúcidas na região do acrossomo. Barras: A-B = 20 μm ; C-F = 3 μm ; G e J = 0,5 μm ; H e I = 0,2 μm .

Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *Aethalion reticulatum*. **A.** Corte longitudinal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando o núcleo (n), o adjunto centriolar (seta) e os derivados mitocondriais (md). **B-C.** Cortes transversais do núcleo (n) e da região em que o adjunto do centríolo (ca) está em paralelo com o núcleo. As cabeças de seta indicam as inclusões elétron-lúcidas no núcleo. **D.** Corte transversal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando o núcleo (n) e os derivados mitocondriais. A seta indica a porção final do adjunto do centríolo e a cabeça de seta à lacuna elétron lúcida no núcleo. **E.** Corte longitudinal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando o adjunto do centríolo (ca), o núcleo (n) e os derivados mitocondriais. A seta indica a ponta afilada do núcleo na sua extremidade posterior. **F-H.** Cortes transversais da região de afilamento lateral do núcleo (n), mostrando os derivados mitocondriais (md) adjacentes ao núcleo e a porção final do adjunto do centríolo (seta). A cabeça de seta indica a extremidade posterior do núcleo na região que antecede a inserção

do axonema. **I-J.** Cortes longitudinais da região de transição núcleo-flagelo. **I.** A cabeça de seta indica a extremidade posterior do núcleo se inserindo na região centriolar (c). Os derivados mitocondriais (md) inicialmente se estendem em paralelo ao núcleo (n). **J.** A extremidade posterior do núcleo (n) se insere no centríolo (c) e logo abaixo se inicia o axonema (ax). As setas indicam os corpos acessórios em cada lado do axonema. **K-O.** Cortes transversais da região de transição núcleo-flagelo, mostrando a extremidade final do núcleo (n), o início dos corpos acessórios (cabeça de seta), os derivados mitocondriais (md) e a região centriolar (asterisco). A seta indica a extremidade final do núcleo na região de inserção do centríolo. Barras: A, E e I = 0,5 μm ; B-D e J = 0,4 μm ; F-H e K-O = 0,2 μm .

Figura 3. Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *Aethalion reticulatum*. **A.** Corte transversal do flagelo mostrado o axonema formado por nove microtúbulos acessórios (am), nove duplas (dm) e um par central (cm), os corpos acessórios com uma região de paracristalino (cabeças de seta) e os derivados mitocondriais, com uma área central menos elétron densa, adjacente ao axonema (a), uma região de paracristalino (p) e uma região de crista na periferia (seta). **B.** Corte longitudinal dos derivados mitocondriais evidenciando a região das cristas (seta). **C.** Corte longitudinal do flagelo, mostrando os derivados mitocondriais (dm) e um dos corpos acessórios (cabeça de seta). **D-F.** Corte transversal da região final do flagelo, mostrando da desorganização dos microtúbulos. As setas indicam o par central e as cabeças de setas indicam as duplas que são os últimos a terminarem na extremidade posterior flagelar. Barras: A, D-F = 0,2 μm ; B-C = 0,4 μm .

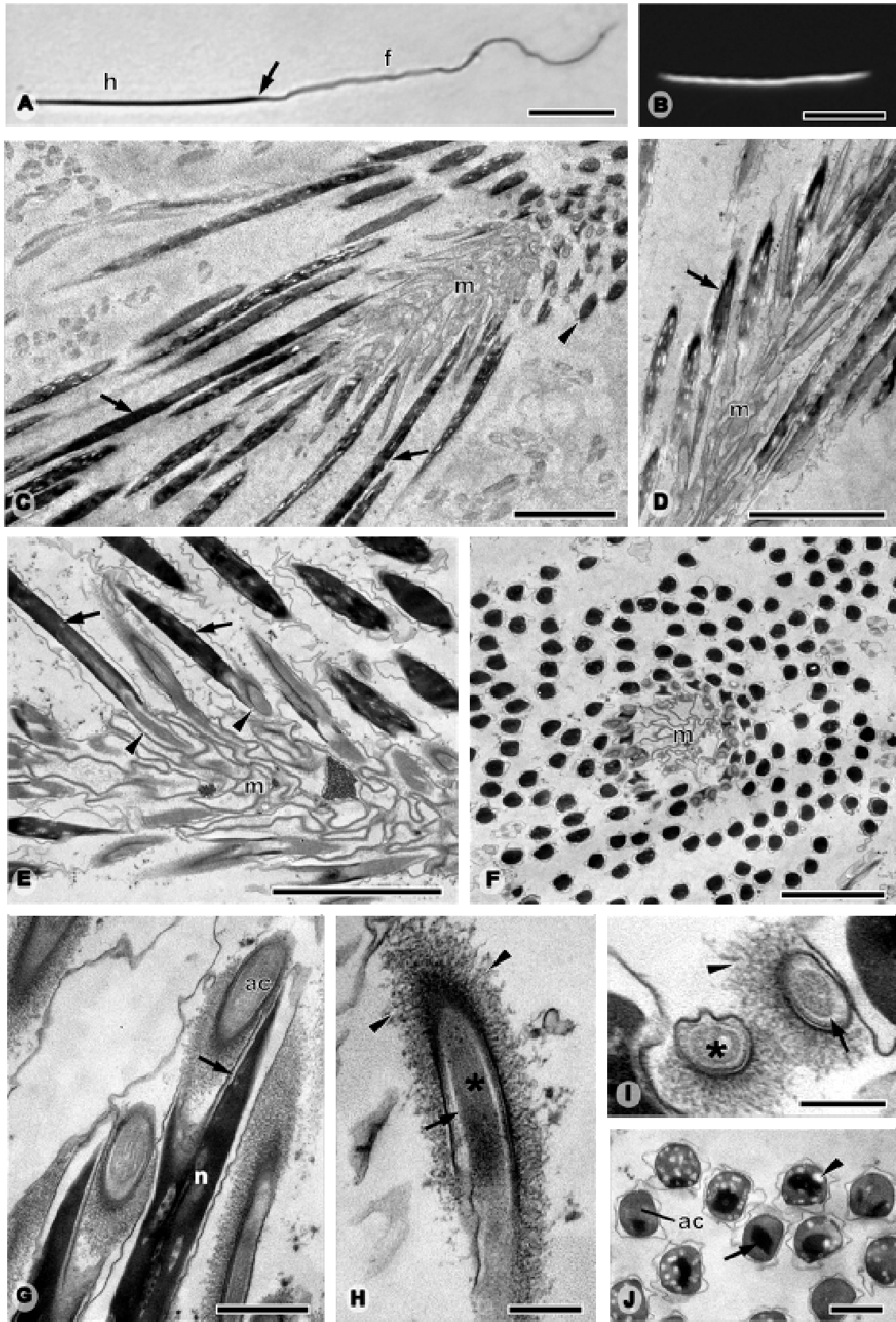


Figura 1

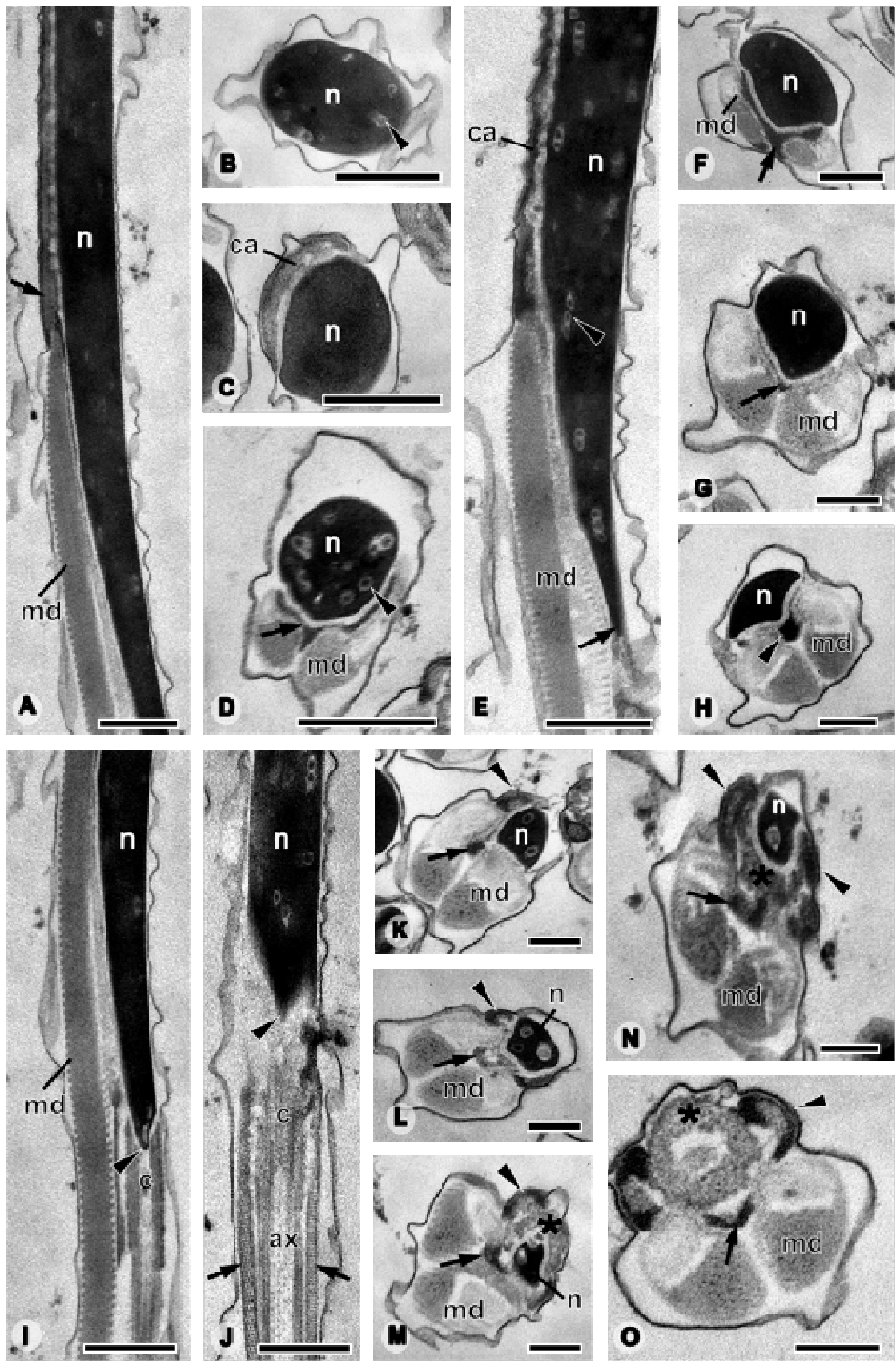


Figura 2

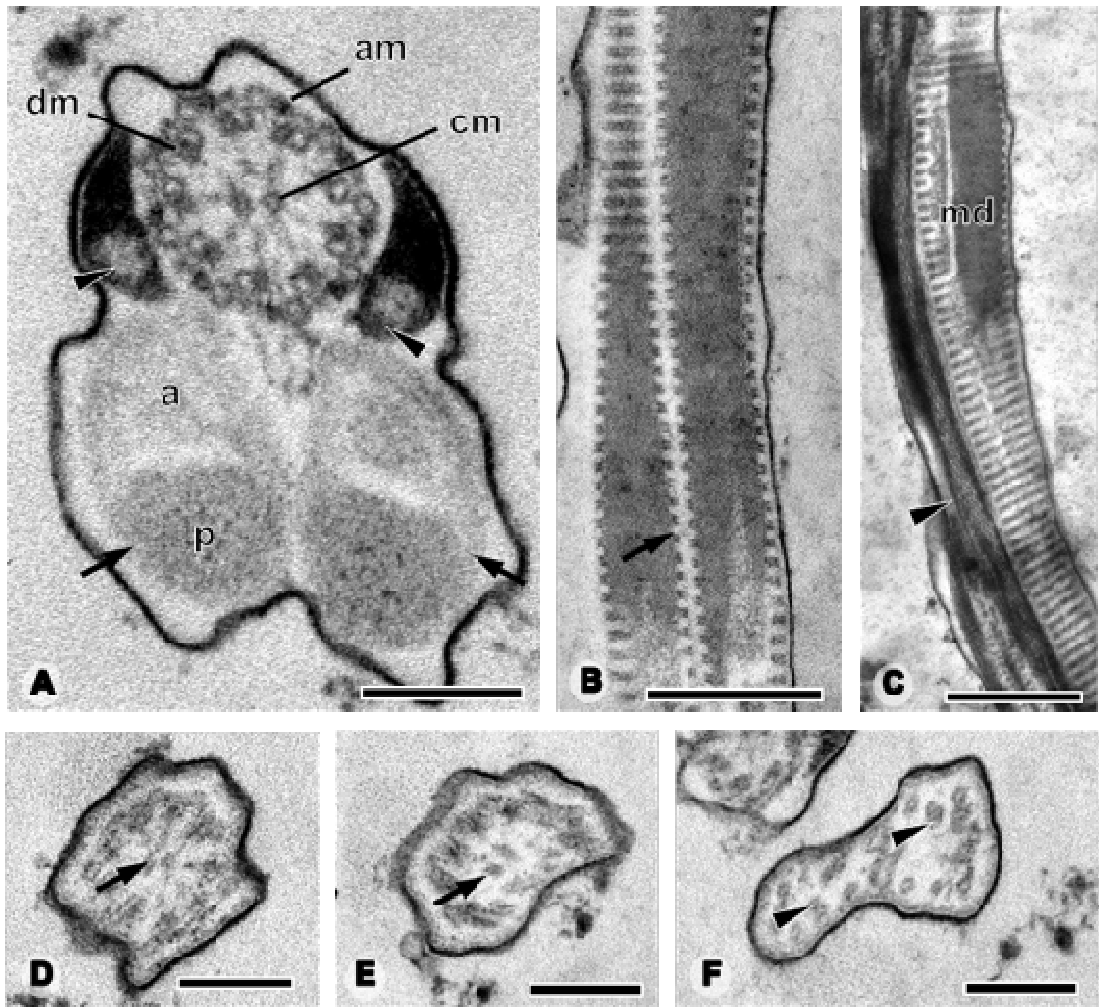


Figura 3

Capítulo 6

3.6. Polimorfismo de espermatozóides em *Largus rufipennis* Laporte 1832

(Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae)

RESUMO. A produção de espermatozóides polimórficos tem sido registrada em várias ordens de insetos, como Diptera, Lepidoptera e Hemiptera. Nesse trabalho, descrevemos, pela primeira vez na família Largidae, a morfologia dos dois tipos de espermatozóides produzidos por *Largus rufipennis*. Para isto, utilizamos técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozóides foram extraídos das vesículas seminais e medem, em média, 260 µm e 200 µm e ambos os tipos possuem o núcleo medindo, em média, 65 µm. Não foram observadas diferenças ultra-estruturais entre os dois tipos de espermatozóides de *Largus rufipennis*. A região da cabeça consiste de um acrossomo, um núcleo e parte do adjunto do centríolo que inicia na região anterior ao núcleo. O núcleo é preenchido por cromatina compacta e homogênea. O adjunto do centríolo segue em paralelo com o núcleo e, mais posteriormente, com os derivados mitocondriais. O flagelo consiste de um axonema (9 + 9 + 2 microtúbulos) e dois derivados mitocondriais, não sendo observados corpos acessórios. Os derivados mitocondriais são simétricos em tamanho e diâmetro. Na vesícula seminal foi observada quantidade similar dos dois tipos espermatozóides (57% do tipo maior e 43% do tipo menor) enquanto que na espermateca da fêmea os espermatozóides maiores foram preferencialmente estocados (87%). Tais resultados permitem discussões acerca da biologia reprodutiva da espécie, especificamente nas estratégias de competição de espermatozóides.

PALAVRAS-CHAVE: competição de espermatozóides, ultra-estrutura, Hemiptera e adjunto de centríolo.

1. Introdução

Em muitos grupos animais os machos férteis usualmente produzem espermatozóides de estrutura uniforme, com características únicas para a espécie (Parker, 1982). Tem sido observada uma grande variação morfológica no tamanho e ultra-estrutura dos espermatozóides entre as espécies, principalmente nos insetos (Sivinski, 1984; Jamieson, 1987, 1991; Jamieson et al., 1999). Em alguns táxons ocorrem variações intra-específicas na morfologia dos espermatozóides (Hudgson, 1999), fenômeno conhecido como polimorfismo, o qual pode incluir variações no comprimento e na estrutura dessas células (Jamieson et al., 1999).

Em insetos, espermatozóides polimórficos são bem relatados e foram descritos pela primeira vez na vespa Eulophidae *Dahlbominus fuscipennis* (Lee & Wilkes, 1965). Em Lepidoptera são produzidos dois tipos de espermatozóides, denominados eupirene e apirene, devido à presença e ausência de núcleo, respectivamente (Friedlander & Gitay, 1972; Katsuno, 1977; Silberglied et al., 1984; Osanai et al., 1989; Kubo-Irie et al., 1998; Mancini & Dolder, 2001, 2002, 2004). Ambos os tipos de espermatozóides são encontrados na espermateca, mas a função do apirene permanece incerta (Osanai et al., 1989; Friedlander, 1997). Em várias espécies de Diptera, principalmente no gênero *Drosophila*, foi relatada presença de espermatozóides polimórficos, variando no comprimento do núcleo e do flagelo (Beatty & Sidhu, 1967; Presgraves et al., 1997, 1999; Joly & Lachaise, 1994; Otronen et al., 1997). Dentre os Hemiptera, algumas espécies de Cicadidae e Cicadellidae apresentam polimorfismo, também baseadas em variações no tamanho do núcleo e do flagelo, mas ambos os tipos de espermatozóides apresentam as mesmas características ultra-estruturais (Kato, 1956; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005; 2006). Ainda, na família Pentatomidae a produção de espermatozóides pode variar quanto ao complemento de cromossomos (Schrader, 1960).

Existem diferentes hipóteses para explicar o polimorfismo dos espermatozóides em insetos. Algumas delas correlacionaram a produção de espermatozóides de diferentes tamanhos com o fenômeno da competição espermática pela fertilização de ovócitos (Beatty & Burgoyne, 1971; Bressac et al., 1991; Pasini et al., 1996; Snook, 1998; Swallow & Wilkinson, 2002). Em espécies de *Drosophila*, tem sido demonstrado que os espermatozóides maiores são preferencialmente estocados na espermateca (Betty & Burgoyne, 1971; Takamori & KuroKawa, 1986; Bressac & Hauschteck-Jungen, 1996). Snook & Karr (1998) demonstraram, em seis espécies de *Drosophila*, que somente espermatozóides longos foram encontrados fertilizando os ovos das fêmeas. Entre os Hemiptera, em espécies de Cicadidae, horas após a cópula, somente espermatozóides longos sobreviveram na espermateca e fertilizaram os ovócitos (Kubo-Irie et al., 2003).

Nesse trabalho, descrevemos aspectos da morfologia dos dois tipos de espermatozóides produzidos por *Largus rufipennis* (Largidae). Além disso, investigamos se ambos os tipos são transferidos das vesículas seminais para a espermateca e em que proporção eles ocorrem em cada órgão de estoque.

2. Material e Métodos

Dez indivíduos adultos de cada sexo de *Largus rufipennis* (Laporte, 1832) foram obtidos em uma área de Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, município de Araponga, Minas Gerais, Brasil.

2.1. Microscopia de luz - Machos e fêmeas adultos tiveram seus sistemas reprodutores dissecados. Para medir o tamanho dos espermatozóides, gotas de suspensão extraídas da vesícula seminal e da espermateca foram espalhadas em lâminas histológicas e fixadas por vinte minutos em solução de paraformaldeído 4%

em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2. Após secar em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio equipado com contraste de fase e todos os campos da lâmina foram fotografados para medir os espermatozóides. Para medir os núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) 0.2 µg/ml em PBS, lavadas e montadas em sacarose 50%. Essas lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm e 200 núcleos foram fotografados. Todas as medidas foram feitas usando o software Image Pro-Plus (Media Cybernetcs) e os comprimentos foram expressos pela média do número total de espermatozóides analisados. Foi feita a contagem total de cada tipo de espermatozóide presente nas lâminas e estabelecida a proporção de ocorrência na vesícula seminal e na espermateca.

2.2. Microscopia eletrônica de transmissão - De cada macho, uma das vesículas seminais foi fixada por 24 h, a 4°C, em solução de glutaraldeído 2.5%, ácido pícrico 0.2%, sacarose 3% e 5 mM CaCl₂ diluídos em tampão cacodilato de sódio, pH 7.2. O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, desidratado em acetona e incluído em Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2% em solução de hidróxido de sódio 1N e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109 e JEOL 100C).

3. Resultados

Não foram observadas diferenças ultra-estruturais entre os espermatozóides de *Largus rufipennis*. A região da cabeça consiste de um acrossomo, um núcleo e parte do adjunto do centríolo que inicia na região anterior ao núcleo (Fig. 1A). O

acrossomo tem formato cônico (Fig. 1B). O topo do núcleo é inserido na região posterior do espaço subacrossomal (Fig. 1B-D).

O núcleo é preenchido por cromatina compacta e homogênea (Fig. 1C, 1E-G). Na região anterior, o núcleo possui formato regular (Fig. 1E) e segue paralelamente ao adjunto do centríolo (Fig. 1E-G). Na região de transição núcleo-flagelo, o núcleo vai se afinando e é acompanhado pelo adjunto do centríolo (Fig. 1H). Posteriormente, o adjunto do centríolo segue em paralelo com os derivados mitocondriais (Fig. 1H-K). O núcleo se sobrepõe à região anterior dos derivados mitocondriais, justamente acima do axonema (Fig. 1I-K). Os derivados mitocondriais e o axonema percorrem toda a extensão do flagelo (Fig. 1L).

O flagelo consiste de um axonema e dois derivados mitocondriais (Fig. 2A), não sendo observados corpos acessórios. O axonema apresenta o padrão típico de $9 + 9 + 2$ microtúbulos, sendo 9 microtúbulos acessórios, 9 duplas e 2 microtúbulos centrais (Fig. 2A). Os derivados mitocondriais, simétricos em diâmetro, são formados por duas regiões paracristalinas, uma mais elétron densa situada entre as áreas claras e uma região de crista mitocondrial, a qual é restrita a periferia dos derivados (Fig. 2A). Cortes longitudinais das cristas mostram que elas são perpendiculares ao longo do eixo dos derivados e com intervalos regulares de 24 nm (Fig. 3B).

A espécie *L. rufipennis* produz espermatozóides de dois tamanhos. O maior mede, em média, 260 μm e o menor 200 μm (Fig. 2C-D). Ambos os tipos de espermatozóides apresentaram núcleos medindo, em média, 65 μm (Fig. 2E-F). Na vesícula seminal, de um total de 1426 espermatozóides, 812 (57%) foram do tipo maior e 614 (43%) do tipo menor. Na espermateca, de um total de 933 espermatozóides contabilizados, 811 (87%) foram do tipo maior.

4. Discussão

Dentre os Heteroptera a ultra-estrutura de espermatozóides foi descrita em espécies de Pentatomidae (Trandaburu, 1973; Fernandes & Báó, 1998), Reduviidae (Dolder, 1988; Báó & DeSouza, 1994), Heteroptera aquáticos (Afzelius et al., 1985; Lee, 1991; Lee & Lee, 1992) Leptodomorpha (Afzelius et al., 1976), Cimicomorpha, Gerromorpha e Pentatomorpha (Philips, 1970; Dallai & Afzelius, 1980). Estes trabalhos apontaram a presença de dois ou três corpos cristalinos nos derivados mitocondriais como uma sinapomorfia para a subordem Heteroptera. Neste trabalho, a primeira descrição para a família Largidae, demonstra que a espécie *L. rufipennis*, além de compartilhar esse carácter sinapomórfico com os demais Heteroptera, ela possui o acrossomo e o longo adjunto do centríolo paralelo ao núcleo, similares as espécies de Nepomorpha (Lee & Lee, 1992). A perda dos corpos acessórios também foi observada em espécies de Heteroptera aquáticos da infraordem Nepomorpha (Lee, 1991; Lee & Lee, 1992), em Cimicomorpha, família Reduviidae (Báó & DeSouza, 1994) e na subordem Auchenorrhyncha (Chawanji et al., 2005; 2006). Os corpos acessórios possivelmente são um carácter homoplástico na ordem Hemiptera, isto considerando que tanto a presença quanto a ausência desta estrutura já foram relatadas nas subordens Auchenorrhyncha e Heteroptera. Como observado em *L. rufipennis*, a simetria em diâmetro dos derivados mitocondriais tem sido amplamente conservada dentre os Hemiptera, e pode ser considerada uma sinapomorfia para ordem.

Neste estudo foi demonstrada a produção de dois tipos de espermatozóides com diferentes comprimentos de flagelo. Estudos similares relatam a produção de espermatozóides polimórficos em Hemiptera, como Pentatomidae (Bowen, 1922; Schrader & Leuchtenberger, 1950) e Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006). Assim como em *L. rufipennis*, os diferentes tipos de

espermatozoides produzidos nessas espécies não apresentaram diferenças nas características ultra-estruturais.

O polimorfismo mais comum nos espermatozoides de insetos está relacionado com o comprimento do núcleo e do flagelo. Em várias espécies do gênero *Drosophila* os machos produzem espermatozoides de dois ou mais tamanhos (Beatty & Burgoyne, 1971; Kurokawa et al., 1974; Takamori & Kurokawa, 1986; Hihara & Kurokawa, 1987) e as fêmeas preferencialmente estocam espermatozoides do tipo maior na espermateca. Uma análise quantitativa dos tipos de espermatozoides em *D. subobscura* mostrou que os espermatozoides de maior comprimento foram preferencialmente estocados na espermateca para serem utilizados na fertilização (Bressac & Hauschteck-Jungen, 1996). Similarmente, somente espermatozoides do tipo maior foram encontrados na espermateca de seis espécies de *Drosophila* (Snook & Karr, 1998). Ainda, Takamori & Kurokawa (1986) concluíram que em *D. bifasciata* os espermatozoides do tipo menor não participam da fertilização dos ovos.

A seleção pelo espermatozoide do tipo maior também ocorre na espermateca do Cicadidae *Graptosaltria nigrofuscata* (Kubo-Irie et al., 2003) e na fertilização dos ovos. Em *L. rufipennis* as fêmeas estocaram preferencialmente espermatozoides do tipo maior, apesar dos dois tipos diferirem apenas no comprimento do flagelo.

As implicações mais intrigantes destes dados questionam as possíveis razões para a evolução e manutenção de tipos de espermatozoides que não têm a mesma probabilidade de fertilização. Alguns trabalhos sugerem que os espermatozoides que não fecundam os ovócitos degeneram no trato reprodutivo da fêmea e podem fornecer uma fonte de energia (polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos) para os espermatozoides férteis, a fêmea ou o zigoto em desenvolvimento (Riemann & Gassner, 1973; Sivinski 1980; Snook & Markow,

1996). Baseado em observações em Lepidoptera, acredita-se que os espermatozoides apirenes perfuram a membrana basal do testículo e facilitam a migração dos feixes de eupirenes para os ductos eferentes e o deslocamento ao longo do trato reprodutor da fêmea (Holt & North 1970; Katsuno, 1977; Etman & Hooper, 1979). Outros autores propuseram que os espermatozoides apirenes seriam responsáveis por iniciar a capacitação e a aquisição de motilidade nos eupirenes, através da quebra dos feixes com a ação de endopeptidases (Kasuga & Aigaki, 1987; Osanai & Isono, 1997). As demais hipóteses relacionam a presença de espermatozoides que não fecundam os ovócitos com a competição para assegurar a paternidade. Uma delas propõe um mecanismo de eliminação do espermatozoide precedente, pela retirada do órgão do estoque ou incapacitação por contato direto (Silberglied et al., 1984; Otronen, 1997; Cordola-Aguilar, 1999). O polimorfismo implica em espermatozoides com diferentes custos de produção, sendo que as células inférteis de baixo investimento serviriam para encher a espermoteca da fêmea e, dessa forma, impedir a entrada do ejaculado de machos em cópulas subsequentes (Sugawara, 1979; Silberglied et al., 1984; Otronen, 1997). Outra hipótese propõe que os espermatozoides inférteis funcionam para bloquear a entrada de outros ejaculados no trato reprodutor da fêmea, pela formação de um plug de cópula (Woodward, 1940; Baker & Bellis, 1988; 1989).

O significado funcional do polimorfismo de espermatozoides ainda não foi totalmente elucidado (Snook, 1998; Swallow & Wilkinson, 2002), sendo apontadas as hipóteses de competição espermática para garantir a paternidade de cópula como a mais aceita (Pitnick et al., 2003).

Referências

- Afzelius BA; Baccetti B; Dallai R (1976) The giant spermatozoon of *Notonecta*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 8: 149-161.
- Afzelius BA; Dallai R; Lindskog P (1985) Spermatozoa of saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). J. Ultrastruct. Res. 90: 304-312.
- Baker RR; Bellis MA (1988) "Kamikaze" sperm in mammals. Animal behaviour 36: 936-939.
- Baker RR; Bellis MA (1989) Elaboration of the kamikaze sperm hypothesis – a reply. Animal behavior 37: 865-867.
- Báo SN; DeSouza W (1994) Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). Tissue Cell 26(3): 299-308.
- Betty RA; Burgoyne PS (1971) Size classes of the head and flagellum of *Drosophila* spermatozoa. Cytogenetics 10: 177-189.
- Beatty RA; Sidhu NS (1967) Spermatozoon nucleus length in three strains of *Drosophila melanogaster*. Heredity 22: 65-82.
- Bowen RH (1922) Studies on insect spermatogenesis. Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 57: 391-423.
- Bressac D; Joly D; Devaux J; Serres C; Feneux D; Lachaise D (1991) Comparative kinetics of short and long sperm in sperm dimorphic *Drosophila* species. Cell Motility and Cytoskeleton 19: 269-274.
- Bressac D (1994) Storage of short and long sperm in *Drosophila subobscura*. Drosophila Information Service 75: 120-121.
- Bressac C; Hauschteck-Jungen E (1996) *Drosophila subobscura* females preferentially select long sperm for storage and use. J. Insect Physiol. 42: 323-328.
- Chawanji AS; Hodgson AN; Villet MH (2005) Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 37: 257-267.
- Chawanji AS; Hodgson AN; Villet MH (2006) Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). Tissue Cell 38: 373-388.
- Cordoba-Aguilar A (1999) Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences 266: 779-784.
- Dolder H (1988) Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 101: 159-164.
- Dallai R; Afzelius BA (1980) Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). J. Morphol. 164: 301-309.
- Etmann AAM; Hooper GHS (1979) Sperm precedence of the last mating of *Spodoptera litura*. Annals of the Entomological Society of America 72: 119-120.
- Fernandes AP; Báo SN (1998) Spermiogenesis in phytophagous bug (Hemiptera, Pentatomidae): an ultrastructural study. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 30(4): 485-493.

- Friedlander M; Gitay H (1972) The fate of normal-anucleated spermatozoa in inseminated females of the silkworm *Bombyx mori*. J. Morphol. 138: 121-130.
- Friedlander M (1997) Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. J. Insect Physiol. 43: 1085-1092.
- Hihara F; Kurukawa H (1987) The sperm length and the internal reproductive organs of *Drosophila* with special references to phylogenetic relationships. Zool. Sci. 4: 167-174.
- Holt GC; North DT (1970) Effects of gamma irradiation on the mechanisms of sperm transfer in *Trichoplusia ni*. J. Insect Physiol. 16: 2211-2222.
- Hudgson AN (1999) Paraspermatozoa. In: Knobil, E., McNeill, JD (Eds.), Encyclopaedia of reproduction, vol. 3. Academic Press, San Diego, pp. 656-668.
- Jamieson BGM (1987) The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, p. 320.
- Jamieson BGM (1991) Fish evolution and systematic. Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, p. 319.
- Jamieson BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999) Insects: Their spermatozoa and phylogeny. Science Publishers, New Hampshire, p. 554.
- Joly D; Lachaise D (1994) Polymorphism in the sperm heteromorphic species of the *Drosophila obscura* group. J. Insect Physiol. 40: 933-938.
- Kato M (1956) The biology of the cicadas. Bulletin of the Cicadae Museum. Scientist Company, Tokyo (Japanese).
- Katsuno S (1977) Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori*, L. (Lepidoptera: Bombycidae) I. The intratesticular behavior of the spermatozoa at various stages from the 5th-instar to the adult. Appl. Entomol. Zool. 12: 142-153.
- Kubo-Irie M; Irie M; Nakazawa T; Mohri H (1998) Morphological changes in eupyrene and apyrene spermatozoa in the reproductive tract of male swallowtail butterfly *Atrophaneura alcinous* Klug. Invert. Rep. Dev. 34: 259-268.
- Kubo-Irie M; Irie M; Nakazawa T; Mohri H (2003) Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). J. Insect Physiol. 49: 983-991.
- Kurokawa H; Matsuo Y; Hihara H (1974) A study on sperm length and body size of *Drosophila bifasciata*. Annot. Zool. Jap. 47: 140-146.
- Lee CE (1991) Morphological and phylogenetic studies on the true water bugs (Hemiptera, Heteroptera). Nature & Life (J. Nat. Hist. Soc. Korea) 21: 1-183.
- Lee PE; Wilkes A (1965) Polymorphic spermatozoa in the Hymenopterous wasp *Dahlbominus*. Science 147: 1445-1446.
- Lee YH; Lee CE (1992) Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. Zool. Sci. 9: 971-981.
- Mancini K; Dolder H (2001) Ultrastructure of apyrene and eupyrene spermatozoa from the seminal vesicle of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). Tissue Cell 33: 301-308.

- Mancini K; Dolder H (2003) Sperm morphology and arrangement along the male reproductive tract of the butterfly *Euptoieta hegesia* (Insecta: Lepidoptera). *Invert. Reprod. Develop.* 44: 107-117.
- Mancini K; Dolder H (2004) Dichotomic spermiogenesis of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21: 13-23.
- Osanai M; Isono M (1997) Dissociation of eusperm bundles by acids, especially by succinate accumulated in the spermatophore of the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebrate Reproduction and Development* 31: 99-108.
- Osanai M; Kasuga H; Aigaki T (1989) Isolation of eupyrene sperm bundles and apyrene spermatozoa from seminal fluid of the silk-moth, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 35: 401-408.
- Otronen M (1997) Variation in sperm precedence during mating in male flies, *Dryomyza anilis*. *Animal Behaviour* 53: 1233-1240.
- Pasini ME; Redi CA; Cavaglia O; Perotti ME (1996) Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. *Tissue Cell* 28(2): 165-175.
- Parker GA (1982) Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *J. Theor. Biol.* 96: 281-194.
- Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell. Biol.* 44: 243-277.
- Pitnick S; Mille GT; Schneider K; Markow TA (2003) Ejaculate-female coevolution in *Drosophila majavensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 1507-1512.
- Presgraves DC; Severance E; Wilkinson GS (1997) Sex chromosome meiotic drive in stalk-eyed flies. *Genetics* 147: 1169-1180.
- Presgraves DC; Baker RH; Wilkinson GS (1999) Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proc. R. Soc. Lon. B.* 266: 1041-1047.
- Riemann JG; Gassner G (1973) Ultrastructure of lepidopteran sperm within the spermathecae. *Annals of the Entomological Society of America* 66: 154-159.
- Schrader F; Leuchtenberger C (1950) A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopuntatus* (De Geer). *Exp. Cell Res.* 1: 421-452.
- Schrader F (1960) Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the harlequin lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). *Chromosoma* 11: 103-128.
- Silberglied RE; Shepherd JG; Dickinson JL (1984) Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am. Naturalist* 123: 255-265.
- Sivinski J (1980) Sexual selection and insect sperm. *Florida Entomologist* 63: 99-111.
- Sivinski J (1984) Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.), *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, New York, pp. 85-115.
- Snook RR; Karr TL (1998) Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. *Current Biology* 8: 291-294.

- Snook RR; Markow TA (1996) Possible role of nonfertilizing sperm as a nutrient source for female *Drosophila pseudoobscura* Fernald (Diptera: Drosophilidae). *Pan-Pacific Entomologist* 72: 121-129.
- Sugawara T (1979) Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behavior. *Journal of Comparative Physiology* 130: 191-199.
- Swallow JG; Wilkinson GS (2002) The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol. Rev.* 77: 153-182.
- Takamori H; Kurokawa H (1986) Ultrastructure of the long and short sperm of *Drosophila bifasciata* (Diptera: Drosophilidae). *Zool. Sci.* 3: 847-858.
- Trandaburu V (1973) The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). *Trav. Mus. Hist. Nat. "Grigore Antipa"* 13: 137-145.
- Woodward TM (1940) The function of the apyrene spermatozoa of *Goniobasis laqueata* (Say). *Journal of Experimental Zoology* 85: 103-125.

Legenda das Figuras

Figura 1. Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *Largus rufipennis*. **A.** Corte longitudinal da região de transição entre o acrossomo (ac) e o núcleo (n). Note que o adjunto do centríolo (ca) começa na região anterior do núcleo. **B.** Corte longitudinal da região de transição entre o acrossomo (ac) e o núcleo (n). A seta indica a região elétron lúcida que separa o material acrossomal (asterisco) no interior da vesícula acrossomal. **C.** Corte longitudinal mostrando uma região elétron lúcida (seta) que separa o núcleo (n) do acrossomo (ac). **D.** Corte transversal da região posterior do acrossomo (ac), mostrando a inserção da extremidade anterior do núcleo (seta) e do adjunto do centríolo (ca). **E-G.** Corte transversal (F-G) e longitudinal (H) mostrando o núcleo (n) e o adjunto do centríolo (ca). A cabeça de seta indica a região elétron lúcida que separa o núcleo (n) do adjunto do centríolo (ca). **H-K.** Cortes transversais da região de transição entre o núcleo (n) e o flagelo. As cabeças de seta indicam o adjunto do centríolo (ca) e os asteriscos o início dos derivados mitocondriais. **L.** Corte longitudinal do flagelo, mostrando o axonema (ax) e um dos derivados mitocondriais (cabeça de seta). Barras: A, C-E e L = 0,3 μm ; B e F-K = 0,2 μm .

Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de transmissão (A-B) e de luz (C-F) dos espermatozoides de *Largus rufipennis*. **A.** Corte transversal do flagelo mostrado o axonema formado por nove microtúbulos acessórios (am), nove duplas (dm) e um par central (cm) e os derivados mitocondriais, com áreas elétron lúcidas de material cristalino (a) circundadas por áreas elétron densas (b) e uma região de crista na periferia (cabeça de seta). **B.** Corte longitudinal dos derivados mitocondriais evidenciando a região das cristas (cabeça de seta). **C-D.** Fotomicrografia em contraste de fase do espermatozóide do tipo maior e menor, respectivamente. A seta indica o limite entre a cabeça (h) e o flagelo (f). **E-F.** Fotomicrografia de fluorescência da região da cabeça do espermatozóide do tipo maior e menor, respectivamente, mostrando núcleos corados com DAPI. Barras: A-B = 0,2 μm ; C-F = 30 μm .

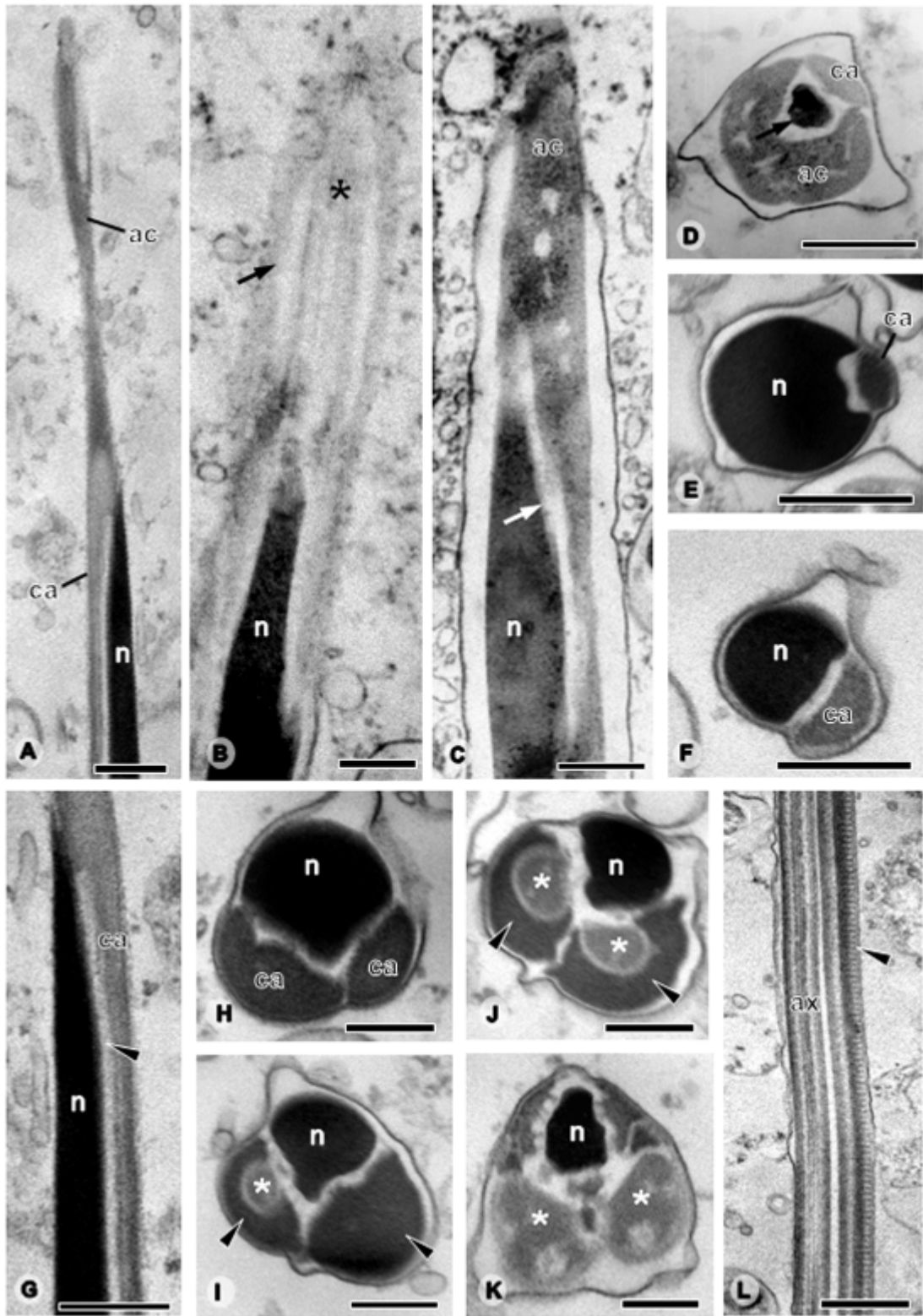


Figura 1

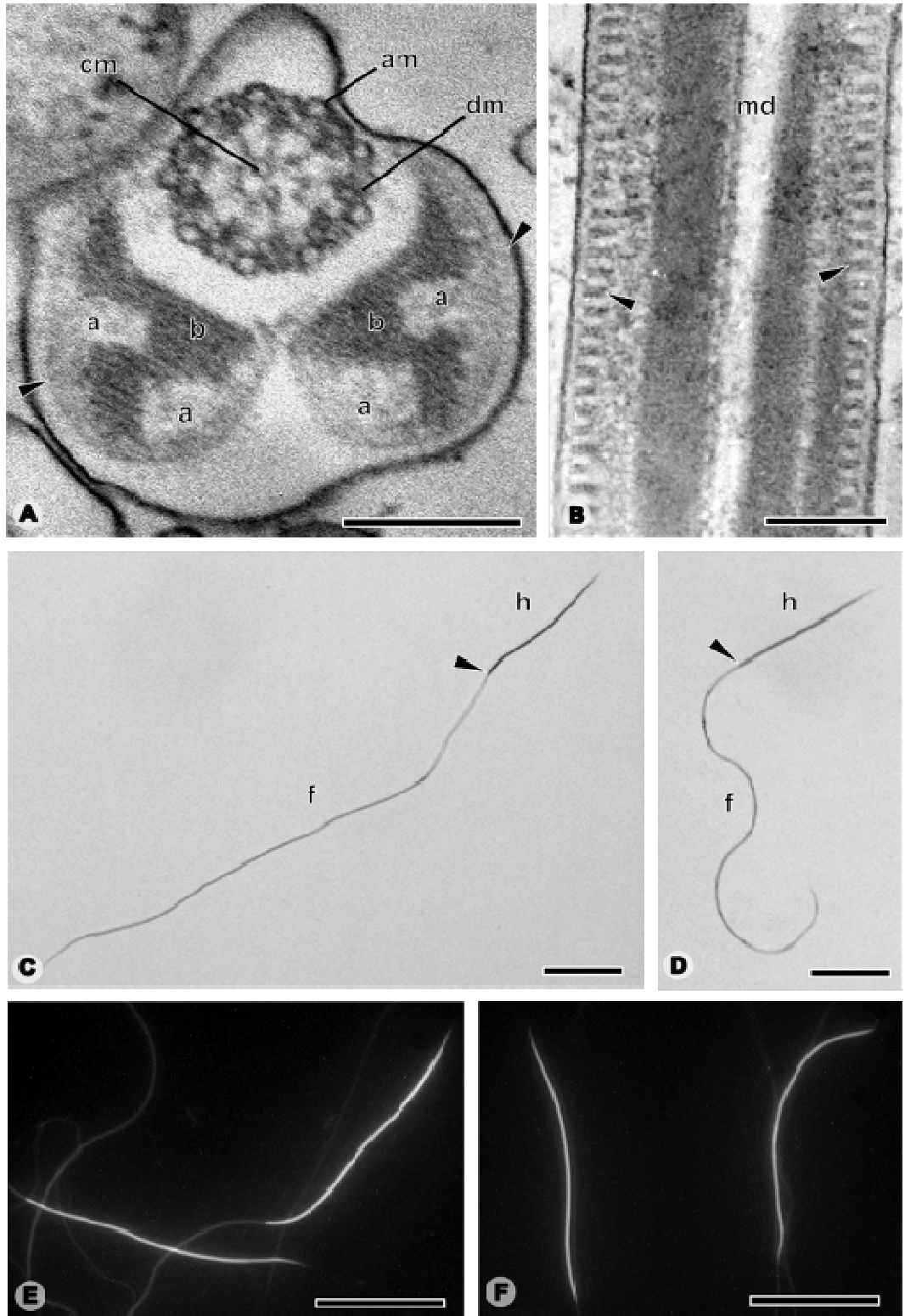


Figura 2

4. Conclusões Gerais

- ✓ A ultra-estrutura dos espermatozóides de *T. albitarse* demonstrou vários caracteres sinapomórficos com os Apoidea em geral. Entretanto, há outros caracteres que são compartilhados somente com a família Crabronidae, outros com a subfamília Crabroninae e, ainda, alguns caracteres foram exclusivos da espécie ou, possivelmente do gênero. Dessa forma, os caracteres derivados da ultra-estrutura dos espermatozóides mostram-se promissores para análises filogenéticas dos Apoidea.
- ✓ As abelhas *T. analis* e *M. segmentaria* compartilham várias características morfológicas dos espermatozóides com as demais abelhas já descritas. Estas sinapomorfias compartilhadas permitiram estabelecer um padrão ultra-estrutural para os espermatozóides da família Apidae.
- ✓ A morfologia do sistema reprodutor masculino nas espécies de Hymenoptera estudadas, *P. versicolor* (Vespidae), *T. analis* e *M. segmentaria* (Apidae), forneceram diferentes caracteres que suportam as seguintes inferências na sistemática do grupo: (1) as diferenças anatômicas do sistema reprodutor fornece caracteres para análises filogenéticas entre famílias ou táxons superiores à essa categoria; (2) o número de espermatozóides por cistos nos folículos testiculares permite inferências em nível de subfamília ou gênero; (3) medidas morfométricas dos espermatozóides podem auxiliar estudos taxonômicos.
- ✓ Os caracteres estruturais e ultra-estruturais dos espermatozóides de *A. reticulatum* diferem marcadamente de outras espécies de Cicadomorpha. Estudos prévios com Cicadidae revelaram sinapomorfias para as subtribos desta família. A descrição morfológica dos espermatozóides em representantes de outras famílias pode revelar novas sinapomorfias e

utilizar esses caracteres em análises filogenéticas do grupo, contribuindo para confirmar o atual status de grupo parafilético da subordem Auchenorrhyncha.

- ✓ Os espermatozóides dimórficos de *L. rufipennis* não apresentaram diferenças ultra-estruturais e alguns caracteres (inclusive a polimorfia dos espermatozóides) são apontados como sinapomórficos para a subordem Heteroptera. Uma maior proporção de espermatozóides do tipo maior foi observada na espermateca da fêmea.
- ✓ Caracteres derivados dos espermatozóides sustentam o uso dessas células em análises cladísticas (espermiocladística) e os caracteres da morfologia do sistema reprodutor mostram-se potenciais para a sistemática dos insetos em geral.