

LUIZ FERNANDO GOMES

**MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS REPRODUTIVAS MASCULINAS EM  
*Centris, Epicharis* E *Trypoxylon* (HYMENOPTERA: APOIDEA)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

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

T

G633m  
2011

Gomes, Luiz Fernando, 1965-

Morfologia das estruturas reprodutivas masculinas em  
*Centris*, *Epicharis* e *Trypoxylon* (Hymenoptera : Apoidea) /  
Luiz Fernando Gomes. – Viçosa, MG, 2011.

xiii, 83f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Lino Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Espermatozoide. 2. Testículos. 3. Ultraestrutura  
(Biologia). 4. Abelha. 5. Vespa. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

LUIZ FERNANDO GOMES

**MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS REPRODUTIVAS  
MASCULINAS EM *Centris*, *Epicharis* E *Trypoxylon*  
(HYMENOPTERA: APOIDEA)**

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

APROVADA: 13 de dezembro de 2011.



Prof. Lúcio Antônio Oliveira Campos



Profª Mary Anne Heidi Dolder



Profª Maria Augusta Lima Siqueira



Profª Mariana Machado Neves



Prof. José Lino Neto  
(Orientador)

A Deus.

À minha esposa, Georgete Lopes Freitas.

Ao meu filho, Lucas Freitas Adler Gomes.

*A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais voltará ao seu tamanho  
original.*

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

Às pessoas e instituições que colaboraram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral (UFV-DBG) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), pela oportunidade de realização do Curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) (Processo: BD-00250/09), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, em especial o coordenador, professor José Eduardo Serrão, e a secretária, Elizabeth Alves Pena (Beth), pela competência, profissionalismo e educação com que sempre trabalham para o bom funcionamento do Curso e atendimento as necessidades dos estudantes.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, pelo ensino de qualidade, pelas trocas de conhecimentos e pela amizade.

Ao professor José Lino Neto, orientador e amigo, pela orientação segura, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelo incentivo.

À professora Uyrá Zama, pelo incentivo, pelas sugestões, pela colaboração direta no decorrer de todo o trabalho e pela amizade.

Aos membros da banca de qualificação, professores José Lino Neto, Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Maria Augusta Lima Siqueira, Uyrá Zama e Weyder Cristiano Santana, pelas avaliações e sugestões. Ao professor Lúcio A. O. Campos, meus sinceros agradecimentos, pela acolhida, pelos ensinamentos, pelas sugestões nos manuscritos da tese e pela amizade.

Aos membros da banca da tese, professores José Lino Neto, Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Maria Augusta Lima Siqueira, Mariana Machado Neves e Mary Anne Heidi Dolder, pelas valiosas sugestões apresentadas.

À professora Sônia Nair Bão e sua equipe, pela acolhida e uso dos equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília (UnB).

À professora Mary Anne Heidi Dolder e sua equipe, pela acolhida e uso dos equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

À minha esposa, Georgete Lopes Freitas, e meu filho, Lucas Freitas Adler Gomes, pelo incentivo e apoio incondicional para que eu continuasse com minha formação e crescimento profissional.

A todos os membros da minha família, em especial meus pais, José Ribamar Gomes e Nizeth Adler Gomes, e minha irmã, Matilde, por jamais medirem esforços por mim e por sempre apoiarem minhas decisões.

A todos os membros da família da minha esposa, em especial meus sogros, Bernardo Freitas e Izabel Lopes Freitas, e minha cunhada, Giovana, pelo apoio manifestado de diversas formas, principalmente na atenção incondicional ao meu filho Lucas e à minha esposa Georgete.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, em especial Alex Bhering, Iris Stanciola e José Luís Monteiro, pela atenção e ajuda sempre que requisitadas.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, nas pessoas de Cláudia Vanetti, Karla Ribeiro, Gilmar Valente e Patrícia Fonseca, pela atenção e ajuda sempre que solicitadas. À Cláudia Vanetti, meus sinceros

agradecimentos, pela acolhida e ensinamentos no uso do ultramicrotomo e do microscópio eletrônico.

Aos professores Dejour Message, Lucio A. O. Campos, Maria Augusta, Sílvia Pompolo e Weyder Cristiano, pelo livre acesso permitido no uso dos laboratórios de fotomicroscopia.

A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural, em especial Ana Paula Caixeiro, Cláudia Vânia Oliveira (Claudinha), Glenda Dias, Helen Cristina e Riúdo Paiva, pelos momentos compartilhados e pela amizade.

Às minhas amigas do Departamento de Biologia do IFMA, Cristina Monteiro, Naiza Nogueira, Tátia Lima e Tereza Silva, pela amizade, pelo incentivo e por ministrarem minhas disciplinas durante o meu afastamento para o Doutorado.

## **BIOGRAFIA**

LUIZ FERNANDO GOMES, filho de José Ribamar Gomes e Nizeth Adler Gomes, nasceu em 17 de outubro de 1965, em São João Batista, Estado do Maranhão.

Em fevereiro de 1991, graduou-se em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura) pela Universidade Federal do Maranhão.

Em abril de 1994, concluiu o mestrado em Genética e melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em dezembro de 2011.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Superfamília Apoidea.....	1
1.1.1. Família Apidae .....	2
1.1.2. Família Crabronidae.....	3
1.2. Morfologia geral do sistema reprodutor masculino de Hymenoptera.....	3
1.3. Morfologia geral dos espermatozoides de Hymenoptera .....	5
1.4. Aspectos gerais do polimorfismo de espermatozoides em insetos.....	7
2. OBJETIVOS .....	9
2.1. Objetivo geral .....	9
2.2. Objetivos específicos .....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
Morphology of the male reproductive system and spermatozoa in <i>Centris</i> Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Apidae, Centridini) .....	18
Abstract.....	18
1. Introduction .....	19

	<b>Página</b>
2. Material and methods.....	21
2.1. Light microscopy .....	21
2.2. Transmission electron microscopy .....	22
3. Results .....	22
4. Discussion.....	30
References.....	36
 Ultraestrutura e citoquímica dos espermatozoides de <i>Epicharis</i> ( <i>Epicharoides</i> ) <i>picta</i> Smith, 1874 (Hymenoptera: Apidae, Centridini) .....	41
Resumo.....	41
1. Introdução .....	42
2. Material e métodos.....	43
2.1. Microscopia de luz .....	43
2.2. Microscopia eletrônica de transmissão .....	43
2.2.1. Citoquímica ultraestrutural: ácido fosfotúngstico-etanólico (E-PTA).....	44
3. Resultados .....	44
4. Discussão.....	50
Referências bibliográficas .....	55
 Ultraestrutura e citoquímica dos espermatozoides polimórficos de três espécies de <i>Trypoxylon</i> ( <i>Trypargilum</i> ) Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) .....	60
Resumo.....	60
1. Introdução .....	61
2. Material e métodos.....	62
2.1. Microscopia de luz .....	62
2.2. Microscopia eletrônica de transmissão .....	63
2.2.1. Citoquímica ultraestrutural: ácido fosfotúngstico-etanólico (E-PTA).....	63
3. Resultados .....	64
4. Discussão.....	71
Referências bibliográficas .....	77
 3. CONCLUSÕES GERAIS.....	82

## RESUMO

GOMES, Luiz Fernando, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2011. **Morfologia das estruturas reprodutivas masculinas em *Centris*, *Epicharis* e *Trypoxylon* (Hymenoptera: Apoidea)**. Orientador: José Lino-Neto. Coorientadora: Uyrá Zama.

A espermiocladística, uso da morfologia dos espermatozoides como ferramenta em análises filogenéticas, tem sido aplicada em diversas ordens de insetos, inclusive Hymenoptera. Ainda é muito pequeno o número de espécies de Hymenoptera que tem a estrutura do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides descrita, mas os poucos trabalhos nessa área mostram que a morfologia dessas estruturas reprodutivas apresenta caracteres diversificados entre os táxons que podem ser usados na sistemática dentro da ordem. Em função disso, nosso objetivo foi descrever a morfologia das estruturas reprodutivas em espécies de Apidae e Crabronidae (Apoidea), buscando contribuir com o conhecimento da biologia reprodutiva e sistemática desse importante grupo de insetos. Para isso, foram utilizadas técnicas de microscopias de luz (campo claro, campo escuro, contraste de fase e epifluorescência para DAPI) e eletrônica de transmissão (convencional e citoquímica com E-PTA). Embora a morfologia das estruturas reprodutivas destes Hymenoptera seja semelhante aquela dos demais já estudados, ela também apresenta algumas características até agora não observadas. Caracteres obtidos a partir das estruturas reprodutivas (anatomia, histologia,

número de espermatozoides por cisto e ultraestrutura) permitem, com base nas diferenças interespecíficas, agrupar espécies ou táxons superiores proximamente relacionados. Além disso, a associação desses caracteres aqueles da morfologia externa, do comportamento e molecular, possivelmente sustentem análises mais consistentes e consensuais sobre as relações evolutivas dos Hymenoptera. A produção de espermatozoides polimórficos, como observada em espécies de *Trypoxylon* do subgênero *Trypargilum*, desperta curiosidades sobre a biologia reprodutiva desses animais.

## ABSTRACT

GOMES, Luiz Fernando, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2011. **Morphology of male reproductive structures in *Centris*, *Epicharis* and *Trypoxylon* (Hymenoptera: Apoidea)**. Adviser: José Lino-Neto. Co-adviser: Uyrá Zama.

Spermiocladistics, the use of spermatozoa morphology as a tool in phylogenetic analysis, has been applied to several orders of insects, including Hymenoptera. The number of Hymenoptera species that have had the structure of the male reproductive system and spermatozoa reported is still very small, but the few studies in this area show that the morphology of these reproductive structures presents diversified traits among taxa, which can be used in systematics within the order. As a result, our objective was to report the morphology of reproductive structures in species of Apidae and Crabronidae (Apoidea), aiming to contribute with information on the reproductive biology and systematics of this important group of insects. Optical microscopy (bright field, dark field, phase contrast and epifluorescence for DAPI) and transmission electron microscopy techniques were thus used (conventional and cytochemistry with E-PTA). Although the morphology of reproductive structures of these Hymenoptera are similar to those of previously studied species, it also shows some features not yet observed. Specific traits of reproductive structures (anatomy, histology, number of spermatozoa per cyst and ultrastructure) allow, based on interspecific differences, grouping of closely related species or higher

taxa. Moreover, the association of those traits to those of external, behavioral and molecular morphology potentially sustains more consistent and concise analyses on the evolutionary relationships of Hymenoptera. Production of polymorphic spermatozoa, as observed in species of *Trypoxylon* of the subgenus *Trypargilum*, arouses curiosity regarding the reproductive biology of these insects.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Superfamília Apoidea

Apoidea, com cerca de 30.000 espécies descritas, a maioria delas de abelhas, é uma das três superfamílias que compreendem os himenópteros Aculeata. É constituída pelas vespas esfeciformes, com quatro famílias, Ampulicidae, Heterogynaidae, Sphecidae e Crabronidae; e pelas abelhas, todas pertencentes a uma única família, Apidae (MELO, 1999; ENGEL, 2001; MELO; GONÇALVES, 2005; FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006). A família Ampulicidae é essencialmente tropical e tem cerca de 200 espécies (MELO, 1999). Heterogynaidae, com distribuição na África, em Madagascar e na região do Mediterrâneo, é um pequeno e raro grupo de vespas com apenas sete espécies conhecidas em um único gênero, *Heterogyna*, e nada se sabe sobre a sua biologia (DAY, 1984; MELO, 1999). Sphecidae é uma família cosmopolita, com cerca de 180 espécies no Neotrópico (MENKE; FERNÁNDEZ, 1996). Crabronidae é uma família monofilética com mais de 8.500 espécies conhecidas, das quais cerca de 1.600 ocorrem no Neotrópico (AMARANTE, 2002). Mesmo com a grande diversidade de formas e histórias de vida, Apoidea é considerado um grupo monofilético, como demonstrado por vários estudos cladísticos, por exemplo, Brothers e Carpenter (1993) e Melo (1999).

### 1.1.1. Família Apidae

Alguns autores consideram todas as famílias de abelhas como subfamílias e agrupam-nas em uma só família, Apidae (GRISWOLD *et al.*, 1995; BROTHERS, 1999; MELO; GONÇALVES, 2005). Pela classificação de Melo e Gonçalves (2005), a família Apidae tem sete subfamílias, 51 tribos e 27 subtribos.

As abelhas estão presentes em todas as regiões biogeográficas do mundo, exceto no extremo Ártico, e constituem o maior grupo de Apoidea, com cerca de 16.000 espécies conhecidas (MICHENER, 2007). Há cerca de 350 gêneros e pelo menos 5.000 espécies na Região Neotropical. As abelhas sociais sem ferrão (Meliponini) estão presentes somente nas regiões tropicais (ROUBIK, 1989; FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006).

Da mesma maneira que possui diversidade de formas, a família Apidae também apresenta grande variedade de hábitos de vida e de comportamentos; há desde espécies solitárias até altamente sociais. As abelhas das tribos Apini e Meliponini são as que exibem os mais altos níveis de sociabilidade (FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006).

Das subfamílias de Apidae, Apinae Latreille, 1802, é a mais diversa e abundante, com 19 tribos, das quais 13 ocorrem no Neotrópico, e 17 subtribos (MELO; GONÇALVES, 2005; FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006). Quatro tribos são completamente parasitas, enquanto em outras três apenas algumas espécies apresentam esse comportamento (FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006).

As abelhas da tribo Centridini Cockerell & Cockerell, 1901, são solitárias, de médio a grande porte, robustas e peludas, geralmente nidificam no solo, mas alguns grupos nidificam em buracos de madeira. É uma tribo eminentemente tropical, restrita às Américas (MICHENER, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2007). A tribo tem cerca de 270 espécies, agrupadas em dois gêneros: *Centris* Fabricius, 1804 (subgêneros: *Acritocentris*, *Centris*, *Heterocentris*, *Melacentris*, *Paracentris*, *Ptilotopus*, *Trachina*, *Xanthemisia*) e *Epicharis* Klug, 1807 (subgêneros: *Anepicharis*, *Cyphepicharis*, *Epicharana*, *Epicharis*, *Epicharitides*, *Epicharoides*, *Hoplepicharis*, *Parepicharis*, *Triepicharis*) (SILVEIRA *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006; MOURE *et al.*, 2007).

### 1.1.2. Família Crabronidae

Crabronidae é considerada uma família monofilética e grupo-irmão de Apidae *s.l.* (MELO, 1999). A família é constituída de cinco subfamílias: Astatinae, Bembicinae, Crabroninae, Pemphredoninae e Philanthinae.

Crabroninae é a maior subfamília de Crabronidae, com aproximadamente 3.400 espécies descritas em todo o mundo, das quais 910 são encontradas na Região Neotropical (AMARANTE, 2005).

Trypoxylini é a segunda maior tribo de Crabroninae e formada por cinco gêneros, *Aulacophilus*, *Pison*, *Pisonopsis*, *Pisoxylon* e *Trypoxylon*, todos com espécies na Região Neotropical (AMARANTE, 2005).

O gênero *Trypoxylon* Latreille, 1796, o segundo maior de Crabronidae, é dividido nos subgêneros *Trypoxylon* e *Trypargilum*. Tem mais de 660 espécies descritas em todo o mundo, 165 conhecidas para a Região Neotropical (AMARANTE, 2005). O subgênero *Trypoxylon* ocorre no mundo todo, enquanto o *Trypargilum* é restrito ao Novo Mundo e possui 96 espécies descritas, sendo 86 neotropicais e 64 ocorrem apenas na América do Sul (RICHARDS, 1934; BOHART; MENKE, 1976, AMARANTE, 1991, 1995). As espécies de *Trypargilum* são agrupadas nos grupos *superbum*, *albitarse*, *punctulatum*, *nitidum* e *spinosum* (RICHARDS, 1934). Bohart e Menke (1976) propuseram a união dos grupos *punctulatum* e *spinosum* ao grupo *nitidum*.

A maioria das espécies de *Trypoxylon* é solitária, porém as espécies do grupo *albitarse* (*Trypargilum*) podem nidificar em grandes agregados (BROCKMANN, 1992; BROCKMANN; GARFEN, 1992; MOLUMBY, 1995, 1997; CAMILLO, 1999), e ninhos comunais podem ser encontrados no grupo *fabricator* (*Trypoxylon*) (RICHARDS 1934; SAKAGAMI *et al.*, 1990; CRESPI; YANEGA, 1995). Os *Trypoxylon* constroem seus ninhos em cavidades preexistentes, como ninhos abandonados de outras vespas ou em cavidades em madeira, ou totalmente expostos.

### 1.2. Morfologia geral do sistema reprodutor masculino de Hymenoptera

O sistema reprodutor masculino dos Hymenoptera pode variar em tamanho, número e presença ou ausência dos órgãos que o compõe. Ele é

formado por um par de testículos, um par de ductos deferentes, um par de vesículas seminais, um ducto ejaculatório e, em geral, um par de glândulas acessórias. Os testículos são constituídos por folículos, que podem variar em número, forma e tamanho nos diferentes grupos. Os testículos são bastante desenvolvidos nas pupas e nos adultos jovens, sendo que em muitas espécies eles degeneram gradativamente, até a completa regressão no final da maturidade sexual (CRUZ-LANDIM, 2008).

Na maioria dos Apidae estudados, cada testículo é constituído por quatro folículos (FERREIRA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2006; FIORILLO *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2010b), com exceção de *Apis mellifera*, que apresenta cerca de 200 folículos por testículo (LOUVEAUX, 1977; CRUZ-LANDIM; BARRETO, 1991; CHAPMAN, 1998) e *Hypanthidium foveolatum* (Apidae: Megachilinae), que apresenta 28 folículos por testículo (GRACIELLE *et al.*, 2009). Em Mellitinae e em alguns Megachilinae também são encontrados quatro folículos por testículos (ROIG-ALSINA; MICHENER, 1993; FERREIRA *et al.*, 2004). Em Andreninae, Colletinae, Halictinae, Crabronidae, Vespidae e alguns Megachilinae, são encontrados três folículos por testículo (DIRKS; STEMBURG, 1972; ROIG-ALSINA; MICHENER, 1993; FERREIRA *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2005; BUSHROW *et al.*, 2006; ZAMA *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2010a). Em Formicidae, esse número varia de 1 a 25 (WHEELER; KRUTZSCH, 1990). Em vespas Parasitica dos gêneros *Pegoscapus*, *Elasmus* e *Eurytomidae* (Chalcidoidea) e nas espécies *Lymeon dieloceri* e *Pachysomoides* sp. (Ichneumonidae), só existe um folículo por testículo (FIORILLO *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2010; GOMES, observação pessoal).

Na maioria dos Hymenoptera estudados as vesículas seminais são regiões especializadas tubulares-enoveladas, dilatadas dos ductos deferentes (FERREIRA *et al.*, 2004; GRACIELLE *et al.*, 2009), exceto nos Meliponini, onde esses órgãos são esféricos (DALLACQUA; CRUZ-LANDIM, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005a,b; BRITO *et al.*, 2010).

A morfologia das glândulas acessórias nos Hymenoptera pode ser esférica, ovalada ou tubular, dependendo do táxon, com exceção das abelhas da tribo Meliponini que não têm esses órgãos (KERR, 1969; FERREIRA *et al.*, 2004; CRUZ-LANDIM, 2008; FIORILLO *et al.*, 2008). Ainda são poucos os

estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino de Hymenoptera. Ferreira *et al.* (2004) compararam a morfologia dos sistemas reprodutores masculino de 51 espécies de abelhas, representando as subfamílias Colletinae, Andreninae, Halictinae, Megachilinae, Melittinae e Apinae, e classificaram-nos em quatro tipos, de acordo com as diferenças anatômicas das estruturas reprodutivas. O tipo I é comum nas subfamílias mais basais (Colletinae, Andreninae e Halictinae) e Megachilinae, sendo caracterizado por testículos e ductos genitais totalmente envolvidos pela membrana escrotal, formando uma única unidade globular. Os tipos II e III são comuns nos Apinae, embora o tipo II também seja observado em espécies de Megachilinae e em Melittinae. Nestes padrões, apenas os testículos e as partes dos ductos deferentes que vão até as vesículas seminais são encapsulados pela membrana escrotal. O tipo II aparece como uma unidade globular, enquanto no tipo III cada testículo e ducto deferente são envolvidos por membranas escrotais distintas, formando duas unidades globulares. O tipo IV, exclusivo dos Meliponini (Apinae), é basicamente caracterizado pela ausência de glândulas acessórias. Neste tipo, os testículos e os ductos deferentes são encapsulados juntos, como no tipo I.

### **1.3. Morfologia geral dos espermatozoides de Hymenoptera**

Os espermatozoides são células altamente especializadas, no entanto apresentam grande diversidade morfológica entre os grupos de Hymenoptera. Eles variam no tamanho, na morfologia e na ultraestrutura. A variação no tamanho pode ser no comprimento total ou apenas do núcleo ou do flagelo; morfológicamente eles podem ser lineares ou espiralados e ultraestruturalmente podem variar na forma, no tamanho e na localização de seus componentes. Nos Hymenoptera, como na maioria dos insetos, os espermatozoides apresentam forma alongada, diâmetro reduzido, citoplasma escasso e as regiões da cabeça e do flagelo distintas, geralmente conectadas pelo adjunto do centríolo (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972). A cabeça é formada pelo acrossomo e pelo núcleo. O acrossomo, a estrutura mais anterior da cabeça, é formado pela vesícula acrossômica e pelo *perforatorium*. A vesícula acrossômica é semelhante a um cone e recobre o *perforatorium* até a

extremidade anterior do núcleo. O *perforatorium*, presente na maioria dos Hymenoptera, é um bastão eletrondenso com a extremidade posterior inserida em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo. O núcleo é alongado, com a extremidade anterior afilada e a posterior truncada ou afilada e com cromatina compactada e eletrondensa na maioria das espécies. Em alguns grupos de Hymenoptera (por exemplo, Chalcidoidea), recobrando o acrossomo e a região anterior do núcleo, há uma bainha extracelular da qual irradiam inúmeros filamentos. O adjunto do centríolo é uma estrutura localizada na região de transição cabeça-flagelo que une essas duas partes do espermatozoide. Na maioria dos Hymenoptera, essa estrutura é compacta, eletrondensa, aproximadamente cilíndrica e localizada paralelamente à porção posterior do núcleo e às extremidades anteriores de um ou de ambos os derivados mitocondriais e do axonema. Na grande maioria dos Hymenoptera, o flagelo é formado por um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Com raras exceções, o axonema possui o arranjo padrão de 9 + 9 + 2 microtúbulos, sendo nove acessórios simples, nove duplas periféricas e um par central. Os derivados mitocondriais flanqueiam o axonema e geralmente diferem em comprimento e, ou, diâmetro, com exceção de Siricoidea (“Symphyta”), Ichneumonoidea e em Chalcidoidea, nos quais são equivalentes em diâmetro, e em Scelionidae, que tem somente um derivado mitocondrial. Os derivados podem conter ou não inclusões paracristalinas. Os corpos acessórios são estruturas alongadas, eletrondensas, que começam e terminam em diferentes locais do flagelo e são localizadas entre os derivados mitocondriais e o axonema.

Nos insetos, incluindo os Hymenoptera, estudos sobre a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides com fins taxonômicos e filogenéticos têm despertado o interesse de vários pesquisadores (BACCETTI, 1970, 1972; PHILLIPS, 1970; DALLAI, 1974, 1979; DALLAI; AFZELIUS, 1990, 1995; QUICKE *et al.*, 1992; CARCUPINO *et al.*, 1995; JAMIESON *et al.*, 1999; LINO-NETO *et al.*, 2000a,b; ZAMA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009). Quicke *et al.* (1992) foram os primeiros a realizar um estudo comparativo da morfologia dos espermatozoides em Hymenoptera. Nesse estudo consta uma matriz com 13 caracteres relacionados à estrutura dessas células em 14 famílias de “Symphyta”, Aculeata e Parasitica, mas nenhuma

filogenia foi proposta por esses autores com base nesses caracteres. Um bom exemplo do emprego da morfologia espermática auxiliando a taxonomia pode ser visto em Pereira *et al.* (2008). Os autores conseguiram identificar e agrupar machos e fêmeas de diferentes espécies de vespa do gênero *Idarnes* pela morfologia dos espermatozoides. Em Hemiptera, o tamanho dos espermatozoides, considerando tanto o comprimento total quanto o do núcleo, foi usado para separar tribos de Auchenorrhyncha (KUBO-IRIE *et al.*, 2003; CHAWANJI *et al.*, 2005, 2006).

Apesar de os Hymenoptera constituírem uma das maiores e mais diversas ordens de insetos, ainda se conhece pouco sobre os espermatozoides destes insetos e os trabalhos existentes são restritos a poucos grupos da ordem.

#### **1.4. Aspectos gerais do polimorfismo de espermatozoides em insetos**

Polimorfismo espermático é a produção de diferentes tipos de espermatozoides por um mesmo indivíduo. Ele é conhecido em várias ordens de insetos, como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Heteroptera, Hymenoptera e Lepidoptera (JAMIESON *et al.*, 1999; PRESGRAVES *et al.*, 1999; SWALLOW; WILKINSON, 2002; CHAWANJI *et al.*, 2005; SASAKAWA, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2011). Nos insetos, os espermatozoides podem variar em comprimento, como em Diptera e Hymenoptera; em morfologia, como em Hemiptera, Heteroptera e Hymenoptera; em morfologia e função, como em Lepidoptera; ou em número de cromossomos, como em Coleoptera (JAMIESON, 1987; JAMIESON *et al.*, 1999; PRESGRAVES *et al.*, 1999; SWALLOW; WILKINSON, 2002; CHAWANJI *et al.*, 2005; SASAKAWA, 2009). Geralmente, nos casos de polimorfismo espermático, somente um dos tipos de espermatozoide é capaz de fertilizar os ovócitos (BIRKHEAD; MOLLER, 1998; SIMMONS, 2001).

A função do polimorfismo espermático ainda é desconhecida e as explicações apresentadas são meras hipóteses, como se seguem: 1) funcionar como “plug de acasalamento”, evitando que a fêmea copule com outros machos aumentando assim o sucesso de fertilização dos ovos pelos espermatozoides do macho que copular primeiro (BAKER; BELLIS, 1988, 1989; LADLE; FOSTER, 1992); 2) fornecer nutrientes para as fêmeas

(RIEMANN; GASSNER, 1973; SIVINSKI, 1980, 1984); 3) ser uma estratégia de fertilização (JOLY *et al.*, 1991; TILL-BOTTRAUD *et al.*, 2005).

Em Lepidoptera, a hipótese mais aceita para a produção dos dois tipos de espermatozoides, eupirene (com núcleo) e apirene (sem núcleo), é a de que os apirenes estão envolvidos na competição espermática (SILBERGLIED *et al.*, 1984; COOK; WEDELL, 1996, 1999). A competição espermática pode ser separada em três categorias, nas quais os espermatozoides apirenes teriam a função de: 1) eliminar os eupirenes predepositados na espermateca da fêmea; 2) preencher (*cheap filler*) a espermateca da fêmea e, desta forma, impedir a entrada do ejaculado de outros machos em cópulas subsequentes; e 3) bloquear a espermateca (SWALLOW; WILKINSON, 2002).

Diante do exposto, constata-se que o sistema reprodutor masculino e os espermatozoides de Hymenoptera têm variabilidade suficiente que justifica estudos sobre sua estrutura, composição química e fisiologia. Esses estudos podem contribuir para uma melhor compreensão da biologia reprodutiva e como fonte de dados para construção de matrizes de caracteres que auxiliem na elucidação das relações de parentesco entre os grupos dessa ordem de insetos. Contudo, diante da grande diversidade desse grupo, os estudos existentes são pouco representativos, necessitando de serem ampliados para que o conjunto dos resultados possa auxiliar a compreensão da evolução e da biologia reprodutiva dos Hymenoptera.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Ampliar as informações sobre a morfologia dos sistemas reprodutores masculinos e dos espermatozoides dos Hymenoptera, visando contribuir para o melhor entendimento da biologia reprodutiva e identificar caracteres que possam ser utilizados em estudos de sistemática deste grupo de insetos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Descrever a anatomia e a histologia dos sistemas reprodutores masculinos e a morfologia dos espermatozoides em algumas espécies de abelhas do gênero *Centris*.

- Descrever a morfologia e a citoquímica (E-PTA) dos espermatozoides da abelha *Epicharis (Epicharoides) picta*.

- Descrever a morfologia e a citoquímica (E-PTA) dos espermatozoides polimórficos das vespas *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons*, *T. (Trypargilum) lactitarse* e *T. (Trypargilum) rogenhoferi*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE, S. T. P. Three new Neotropical species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera, Sphecidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 35, p. 429-437, 1991.
- AMARANTE, S. T. P. *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) *mojuba* sp. n., an unusual Trypoxylini from South America (Hymenoptera, Sphecidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 39, p. 157-160, 1995.
- AMARANTE, S. T. P. A synonymic catalog of the neotropical Crabronidae and Sphecidae (Hymenoptera: Apoidea). *Arquivos de Zoologia*, v. 34, p. 1-139, 2002.
- AMARANTE, S. T. P. Addendum and corrections to a synonymic catalog of Neotropical Crabronidae and Sphecidae. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 45, p. 1-18, 2005.
- ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 137-141, 2005a.
- ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. 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.*, v. 22, p. 193-201, 2005b.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron*, v. 40, p. 719-723, 2009.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. *J. Insect Sci.*, v. 10, p. 1-10, 2010a.

- ARAÚJO, V. A.; FREITAS, F. V.; MOREIRA, J.; NEVES, C. A.; LINO-NETO, J. Morphology of Male Reproductive System of Two Solitary Bee Species (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop. Entomol.*, v. 39, p. 595-600, 2010b.
- ARAÚJO, V. A.; LINO-NETO, J.; RAMALHO, F. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron*, v. 42, p. 560-567, 2011.
- BACCETTI, B. *The Spermatozoon of Arthropoda*. IX. The sperm cell as an index of phylogenesis. In: Baccetti, B. Comparative spermatology. New York: Academic Press, 1970. p. 169-182.
- BACCETTI, B. Insect sperm cell. *Adv. Insect. Physiol.*, v. 9, p. 315-397, 1972.
- BOHART, R. M.; MENKE, A. S. *Sphecid wasps of the world*. A generic revision. Berkeley: University of California Press, 1976.
- BAKER, R. R.; BELLIS, M. A. Kamikaze sperm in mammals. *Anim. Behav.*, v. 36, p. 936-939, 1988.
- BAKER, R. R.; BELLIS, M. A. Elaboration of the kamikaze sperm hypothesis – a reply. *Anim. Behav.*, v. 37, p. 865-867, 1989.
- BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. *Sperm competition and sexual selection*. London: Academic Press, 1998. 826 p.
- BRITO, P.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus* sp. (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 175-176, 2005.
- BRITO, P.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae): histological and physiological development during sexual maturation. *Apidologie*, v. 41, p. 203-215, 2010.
- BROCKMANN, H. J. Male behavior, courtship and nesting in *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Hymenoptera: Sphecidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, v. 65, p. 66-84, 1992.
- BROCKMANN, H. J.; GRAFEN, A. Sex ratios and life-history patterns of a solitary wasp, *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Hymenoptera: Sphecidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, v. 30, p. 7-27, 1992.
- BROTHERS, D. J.; CARPENTER, J. M. Phylogeny of Aculeta, Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). *J. Hym. Res.*, v. 2, p. 227-304, 1993.
- BROTHERS, D. J. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zool. Scr.*, Oslo, v. 28, p. 233-249, 1999.
- BUSHROW, E. S.; FLLER, C. L.; COWAN, D. P.; BYR, C. A. Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invert. Biol.*, v. 125, p. 354-362, 2006.
- CAMILO, E. Bionomics of *Trypoxylon (Trypargilum) antropovi* and *Trypoxylon (Trypoxilon) aestivale* (Hymenoptera, Sphecidae). *Iheringia*, v. 87, p. 29-36, 1999.

- CARCUPINO, M.; PROFILI, G.; KATHIRITHAMBY, J.; MAZZINI, M. Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance. In: JAMIESON, B. G. M. *et al.* (Ed.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mém. Mus. Natn. Hist. Nat.*, v, 16, p.: 291-296, 1995.
- CHAPMAN, R. F. *Insects: Structure and function*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1998. 770 p.
- CHAWANJI, A. S.; HODGSON, A. N.; VILLET, M. H. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell*, v. 37, p. 257-267, 2005.
- CHAWANJI, A. S.; HODGSON, A. N.; VILLET, M. H. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell*, v. 38, p. 373-388, 2006.
- COOK, P. A.; WEDELL, N. Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success. *Proc. Royal Soc.*, London, v. B 263, p. 1047-1051, 1996.
- COOK, P. A.; WEDELL, N. Non-fertile sperm delay female remating. *Nature*, v. 397, p. 486, 1999.
- CRESPI, B. J.; YANEGA, D. The definition of eusociality. *Beh. Ecol.*, v. 6, p. 109-115, 1995.
- CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Unesp, 2008. 408 p.
- CRUZ-LANDIM, C.; BARRETO, M. D. The post-embryonic development of male gonads in *Apis mellifera* L. *Naturalia*, v. 16, p. 183-191, 1991.
- DALLACQUA, R. P.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med.*, Series C, v. 32, p. 276-281, 2003.
- DALLAI, R. Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta Apterygota. *Pedobiology*, v. 14, p. 148-156, 1974.
- DALLAI, R. An overview of a typical spermatozoa in insects. In: Fawcett, D.M., Bedford, J.M. 1979. *The Spermatozoon. Urban and Schwarzenberg*, Baltimore, 253-256, 1979.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Microtubular diversity in insect spermatozoa. Results obtained with a new fixative. *J. Struct. Biol.*, v. 103, p. 164-179, 1990.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Phylogeny significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: JAMIESON, B. G. M. *et al.* (Ed.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mém. Mus. Natn. Hist. Nat.*, Paris, v. 16, p. 291-296, 1995.
- DAY, M. C. The enigmatic genus *Heterogyna* Nagy (Hymenoptera: Sphecidae; Heterogyninae). *Syst. Entomol.*, v. 9, p. 293-307, 1984.
- DIRKS, T. F.; STERNBURG, J. G. Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, v. 1, p. 315-320, 1972.

- ENGEL, M. S. A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *B. Amer. Mus. Nat. Hist.*, New York, v. 259, p. 1-192, 2001.
- FERNÁNDEZ, F.; SHARKEY, M. J. (Ed.). *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, 2006.
- FERREIRA, A.; ABDALLA, F. C.; KERR, W. E.; CRUZ-LANDIM, C. Systematics, morphology and physiology. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.*, v. 33, p. 569-576, 2004.
- FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron*, v. 39, p. 1271-1280, 2008.
- FIORILLO, B. S.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). *Acta Zool.*, v. 89, p. 1463-1470, 2009.
- GRACIELLE, I. M. S.; FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron*, v. 40, p. 719-723, 2009.
- GRISWOLD, T.; PARKER, F. D.; HANSON, P. E. The bees (Apidae). In: HANSON, P. E.; GAULD, I. D. (Ed.). *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford: Oxford University Press, 1995. 893 p.
- JAMIESON, B. G. M. *The ultrastructure and phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 320 p
- JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, 1999. 555 p.
- JOLY, D.; CARIOU, M. L.; LACHAISE, D. Can sperm competition explain polymorphism in *Drosophila teissieri*? *Evol. Biol.*, v. 5, p. 25-44, 1991.
- KERR, W. E. Some aspects of the evolution of social bee (Apidae). *Evol. Biol.*, v. 3, p. 119-175, 1969.
- KUBO-IRIE, M.; IRIE, M.; NAKAZAWA, T.; MOHRI, H. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *J. Insect. Physiol.*, v. 49, p. 983-991, 2003.
- LADLE, R. J.; FOSTER, E. Are giant sperm copulatory plugs? *Acta Oecol.*, v. 13, p. 635-638, 1992.
- LIMA, M. A. P.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L. A. O. Sexual maturation in *Melipona mondury* males (Apidae: Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 23, p. 369-375, 2006.

- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatma and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.*, v. 81, p. 205-211, 2000a.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, v. 32, p. 322-327, 2000b.
- LOUVEAUX, J. Anatomie de l'abeille: X-L'appareil reproducteur du male. *B.T.A.*, v. 4, p. 43-48, 1977.
- MELO, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers of the Natural History Museum of the University of Kansas*, v. 14, p. 1-55, 1999.
- MELO, G. A. R.; GONÇALVES, R. B. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae *sensu lato*). *Rev. Bras. Zool.*, v. 22, p. 153-159, 2005.
- MENKE, A. S.; FERNÁNDEZ, F. C. Claves ilustradas para las subfamilias, tribus y géneros de esfécidos neotropicales (Apoidea: Sphecidae). *Rev. Biol. Trop.*, v. 44, p.1-68, 1996.
- MICHENER, C. D. *The bees of the world*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.
- MICHENER, C. D. *The bees of the world*. 2. ed., Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007. 953 p.
- MOLUMBY, A. Dynamics of parasitism in the organ-pipe wasp, *Trypoxylon politum*: effects of spatial scale on parasitoid functional response. *Ecol. Entomol.* 20: 159-168, 1995.
- MOLUMBY, A. Why make daughter larger? Maternal sex-allocation and sex-dependent selection for body size in a mass-provisioning wasp, *Trypoxylon politum*. *Behav. Ecol.*, v. 8, p. 279-287, 1997.
- MOREIRA, P. A.; ARAÚJO, ZAMA, U.; LINO-NETO, J. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.*, v. 37, p. 429-435, 2008.
- MOREIRA, J.; ARAÚJO, V. A.; BÁO, S. N.; LINO-NETO, J. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron*, v. 41, p. 187-192, 2010.
- MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Org.). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. *Soc. Brasil. Entomol.*, Curitiba, Brasil, 2007. 1058 p.
- PEREIRA, R. A. S.; LINO-NETO, J.; PRADO, A. P. Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. *Symbiosis*, v. 45, p. 143-147, 2008.
- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, v. 44, p. 243-277, 1970.

- PRESGRAVES, D. C.; BAKER, R. H.; WILKINSON, G. S. Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 266: 1041–1047, 1999.
- QUICKE, D. L. J.; INGRAM, S. N.; BAILLIE, H. S.; GAITENS, P. V. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scrip.* 21: 381-402, 1992.
- RICHARDS, O. W. The American species of the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecoidea). *T. Roy. Entomol. Soc. Lond.*, v. 82, p. 173-362, 1934.
- RIEMANN, J. G.; GASSNER, G. Ultrastructure of lepidopteran sperm within the spermathecae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 66, p. 154-159, 1973.
- ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C. D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kans. Sci. Bull.*, v. 55, p. 23-163, 1993.
- ROUBIK, D. W. *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge: Cambridge University, 1989. 514 p.
- SAKAGAMI, S. F.; GOBBI, N.; ZUCCHI, R. Nesting biology of a quasisocial sphecoid wasp *Trypoxylon fabricator*. I. Nests and inhabitants. *Jpn. J. Entomol.*, v. 58, p. 846-862, 1990.
- SASAKAWA, K. Marked sperm dimorphism in the ground beetle *Scarites terricola*: a novel type of insect sperm polymorphism. *Physiol. Entomol.*, v. 34, p. 387-390, 2009.
- SILBERGLIED, R. R.; SHEPHERD, J. G.; DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am. Naturalist.*, v. 123, p. 255-265, 1984.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. *Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação*. Belo Horizonte, MG: IDM Composição e Arte, 2002. 253 p.
- SIMMONS, L. W. *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton and Oxford: Princeton University Press, 2001. 434 p.
- SIVINSKI, J. Sexual selection and insect sperm. *Fla. Entomol.*, v. 63, p. 99-111, 1980.
- SIVINSKI, J. Sperm in competition. In: SMITH, R. L. (Ed.). *SPERM COMPETITION AND EVOLUTION OF ANIMAL MATING SYSTEMS*. New York: Acad. Press, 1984. p. 85-115.
- SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol. Rev.*, v. 77, p. 153-182, 2002.
- TILL-BOTTRAUD, I.; JOLY, D.; LACHAISE, D.; SNOOK, R. R. Pollen and sperm heteromorphism: convergence across kingdoms? *J. Evol. Biol.*, v. 18, p. 1-18, 2005.
- WHEELER, D. E.; CRICHTON, G.; KRUTZSCH, P. H. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.*, v. 206, p. 343-350, 1990.

ZAMA, U.; MOREIRA, J.; BÁO, S. N.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera, Apoidea, Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arth. Struct. Dev.*, v. 36, p. 304-316, 2007.

## **Morphology of the male reproductive system and spermatozoa in *Centris* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Apidae, Centridini)**

### **Authors:**

Luiz Fernando Gomes<sup>a,d</sup>, Juliana P. Badke<sup>b</sup>, Uyrá Zama<sup>c</sup>, Heidi Dolder<sup>b</sup> and José Lino-Neto<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão-IFMA, Maranhão, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Campinas-UNICAMP, São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP, Minas Gerais, Brazil.

<sup>d</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa-UFV, Minas Gerais, Brazil.

1. Introduction
  2. Material and methods
    - 2.1. Light microscopy
    - 2.2. Transmission electron microscopy
  3. Results
  4. Discussion
- References

**Running title:** *Centris* male reproductive system and spermatozoa morphology

### **Research highlights**

- ▶ Ultrastructure of spermatozoa from four species of *Centris* was described.
- ▶ Ultrastructure of seminal vesicle from four species of *Centris* was described.
- ▶ Information obtained from the spermatozoa can use for systematic studies.

**Correspondence to:** José Lino-Neto, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa-UFV, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, CEP: 36570-000, Brazil. Tel.: + 55 31 38993367, e-mail: linoneto@ufv.br.

## Morphology of the male reproductive system and spermatozoa in *Centris* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Apidae, Centridini)<sup>1/</sup>

### Abstract

The genera *Centris* and *Epicharis* constitute the Centridini and are widely distributed in the Neotropical region. *Centris* is also found in the southern portion of the Nearctic region, although both genera are more abundant in the humid tropical regions. To describe the structure of the male reproductive system and spermatozoa, light and transmission electron microscopy were used. The male reproductive system of *Centris* sp. is formed by a pair of testes, a pair of deferent ducts, a pair of seminal vesicles, a pair of accessory glands and an ejaculatory duct connected to the external genitalia, the aedeagus. In this species, testes and the pre-vesicular deferens ducts as well as the seminal vesicles are encapsulated in a single conjunctive capsule, the scrotal membrane. Each testis consists of four testicular follicles, made up of cysts with up to 64 germinative cells. Histologically, the seminal vesicles are formed by a simple cylindrical epithelium, basal membrane and muscular tunic. The spermatozoa of *Centris analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata* and *Centris* sp. are morphologically similar. They have two easily distinguishable regions: the head and flagellum. The head is formed by the two-layer acrosome, the linear nucleus and the flagellum, the centriole adjunct, the axoneme of pattern 9 + 9 + 2 microtubules, two asymmetric mitochondrial derivatives and two accessory bodies. These *Centris* species share various morphological characteristics of the male reproductive system and spermatozoa with the other bees previously described, indicating that several characteristics are synapomorphic for the family Apidae. Studies on the morphology of the male reproductive system and spermatozoa in Hymenoptera have demonstrated the diversity of the information provided by these reproductive structures, which can be used in taxonomy studies and the phylogeny of this important group of insects.

**Keywords:** bees; ultrastructure; seminal vesicle; testes.

---

<sup>1/</sup> Artigo aceito para publicação na revista Micron.

## 1. Introduction

The wasps, Ampulicidae, Heterogynaidae, Sphecidae and Crabronidae, and bees form the monophyletic group Apoidea (Melo, 1999; Melo and Gonçalves, 2005), with more than 25,000 species described (Hanson and Menke, 2006) and distributed throughout nearly all terrestrial ecosystems (Michener, 2000). The bees are the group with the most number of Apoidea, comprising around 16,000 species in approximately 500 genera, although the estimated number of species may be higher (Bohart, 1970; Michener, 2000; Griswold et al., 2006).

The genera *Centris* Fabricius, 1804 and *Epicharis* Klug, 1807 constitute the Centridini (Michener, 2000) and are widely distributed in the Neotropical region. *Centris* is also found in the southern portion of the Nearctic region, although both genera are more abundant in the humid tropical regions (Silveira et al., 2002; Moure et al., 2007a, b). The Centridini tribe bees, with approximately 270 described species, are among the main pollinators in the Neotropics and are one of the groups of non-corbiculate bees most intensively studied in this region (Griswold et al., 2006).

The genus *Centris* comprises numerous species of solitary bees, characterized by their sturdy and hairy appearance, and ranging from medium- to large-sized in a variety of colours (Michener, 2000; Silveira et al., 2002). This genus is composed of several sub-genera, whose phylogenetic relationships have been studied by Ayala (1998), who recognised the existence of three groups: (1) the *Centris* group, constituting the subgenera *Acritocentris*, *Centris* (*sensu stricto*), *Exallocentris*, *Paracentris*, *Xanthemisia* and *Xerocentris*; (2) the *Melacentris* group, constituting the subgenera *Melacentris*, *Ptilocentris*, *Wagenknechtia*, *Ptilotopus*, *Aphemisia* and *Schistemisia*; and (3) the *Trachina* group, constituting the subgenera *Hemisiella*, *Heterocentris*, *Trachina* and *Paremisia*. According to Silveira et al. (2002), Ayala's proposal (1998) agrees partially with the phylogenetic relationships suggested by Michener (1951). However, many aspects of the systematics of this group remain controversial, including the recognition of some of the subgenera.

The most recent study on *Centris* phylogeny was conducted by Vivallo (2010). In this study, the phylogenetic relationships between the Centridini, Ericrocidini and Rhathymini tribes were evaluated. The cladistic analysis, with

216 characteristics of the external morphology of males and females including the male genitalia and sting, showed that the three tribes are monophyletic, although only Centridini and Ericrocidini form a natural group. The internal phylogenetic relationships of Centridini and Ericrocidini showed that all the genera and subgenera are monophyletic, except for *Centris (Melacentris)*, which is paraphyletic in relation to *Centris (Aphemisia)*, and *Centris (Paracentris)*, which is paraphyletic in relation to *Centris (Penthemisia)* and *Centris (Xanthemisia)*. The author suggested that these last two subgenera should be considered together with *Centris (Aphemisia)*. Another suggestion was to create a new subgenus to include the Hyptidis group species, which belongs to an independent strain close to *Centris (Wagenknechtia)*.

The male reproductive system in the Hymenoptera is composed of a pair of testes connected to the external medium through genital ducts, which are frequently associated with accessory glands. The seminal vesicles represent specialized areas of the deferent ducts, which store the spermatozoa produced in the testes until their release during copulation (Cruz-Landim, 2008). Ferreira et al. (2004) compared the morphology of the male reproductive system of 51 bee species, which belong to six families based on the classification by Michener (1965), and identified four types (I, II, III and IV) according to the anatomical differences of the reproductive structures. This grouping of families based on these characteristics shows that they are potentially useful in studies of the phylogenetic relationships in these bees.

In insects, including Hymenoptera, characteristics obtained from the spermatozoa structure are used in phylogenetic studies (Baccetti, 1970; Dallai, 1974; Jamieson, 1987; Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999). The morphology of the Hymenoptera spermatozoa is known in various groups (Newman and Quicke, 1999a, 2000; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto and Dolder, 2001b; Zama et al., 2005b, 2007; Mancini et al., 2006, 2009; Moya et al., 2007; Brito et al., 2009; Araújo et al., 2010; Moreira et al., 2010; Oliveira et al., 2010). In bees, the most detailed studies are restricted to the Apidae (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Bao et al., 2004; Araújo et al., 2005c; Badke et al., 2005; Fiorillo et al., 2009), some Halictidae (Fiorillo et al., 2005), Megachilidae and Andrenidae (Quicke et al., 1992).

This study describes for the first time the structure and ultrastructure of organs of the internal male reproductive system and spermatozoa in *Centris*, aiming to contribute to the knowledge of reproductive biology, as well as to provide information on the systematic studies of this group.

## 2. Material and methods

Adult males of *Centris (Heterocentris) analis* Fabricius, *C. (Trachina) fuscata* Lepeletier, *C. (Hemisiella) tarsata* Smith and *Centris* sp. were collected on flowers at the campus of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

In this study, the results on the morphology and structure of the male reproductive system refer to those of the species *Centris* sp. The results on the ultrastructure of the testes, seminal vesicles and spermatozoa refer to those of all the four species studied.

### 2.1. Light microscopy

To describe the general morphology of the male reproductive system of the *Centris* sp., adult males were dissected in a buffer solution of 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.2, and this system was removed, photographed in a Zeiss stereoscope microscope (SPEM 2000C0).

To describe the structure of the male reproductive system of the *Centris* sp., adult males were dissected and this system removed, fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in a buffer solution of 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.2, for 12 to 24 hours, dehydrated in solutions of increasing ethanol concentrations and then infiltrated and embedded in glycolmetacrylate resin (Historesin, Leica). Semi-thin sections 2 to 5  $\mu\text{m}$  thick were stained with 1% toluidine blue-sodium borate and haematoxylin & eosin and mounted with Entelan (Merck). The analysis and photographs were made with an Olympus BX-60 microscope.

To determine the total size and nucleus of the spermatozoa of the four *Centris* species, adult males were dissected, the seminal vesicles removed and opened, and the spermatozoa extracted and spread on histological slides, fixed with solution of 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, for 15 minutes, washed in running water and dried at room temperature. The slides were examined and the spermatozoa were photographed in an

Olympus BX-60 photomicroscope equipped with phase contrast. To determine the size of the nuclei, some of these preparations were stained for 15 minutes with 0.2 mg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in PBS, washed in distilled water and mounted with 50% sucrose. The analysis and photographic records were made in an epifluorescence microscope (Olympus, BX-60), equipped with a BP360-370 nm excitation filter. All the measurements were obtained using the software Image Pro-Plus, version 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA) and the lengths were averaged from the total number of spermatozoa analyzed.

## 2.2. Transmission electron microscopy

To analyse the ultrastructure of the testes, seminal vesicles and spermatozoa of the four *Centris* species, adult males were dissected and the testes and seminal vesicles separated and fixed for 24 hours in a solution of 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid, 3% sucrose and 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. The material was post-fixed in a 1% osmium tetroxide solution for 2 hours, dehydrated in solutions of increasing acetone concentrations, and then infiltrated and embedded in Epoxy resin (Epon 812). Ultrathin sections were contrasted with 3% uranyl acetate and 2% lead citrate, and photographed in a transmission electron microscope, JEOL 1011, operating at 80kV.

## 3. Results

The internal male reproductive system of *Centris* sp. is formed by a pair of testes, a pair of deferent ducts, a pair of seminal vesicles, a pair of accessory glands and an ejaculatory duct (Figs. 1A, B and 2A). Each testis consists of four fusiform follicles (or seminiferous tubules) (Fig. 1B), which are filled with the testicular cysts formed by the cystic cells, involving up to 64 germinative cells (Fig. 3A). From each follicle, an efferent duct evolves and the four merge into the deferent duct (Fig. 1B).

Each deferent duct is partially differentiated into a seminal vesicle. Thus, each deferent duct is divided into seminal vesicle and pre- and post-vesicular regions (Figs. 1B, 2B and C). The post-vesicular regions merge into the tubular ejaculatory duct, which is connected to the external genitalia, the aedeagus (Figs. 1A, 2A, B and D). In this species, the two testes, the pre-vesicular

deferent ducts and seminal vesicles are enveloped by a single conjunctive capsule, the scrotal membrane (Figs. 1A, B and 2A).

The seminal vesicles are specialized tubular-coiled dilated regions of the deferent ducts, where the spermatozoa are stored until copulation. Histologically, they are composed of simple epithelium, with cylindrical cells of spherical and basal nuclei, basal lamina and muscular tunic (Figs. 2C and 3C). The nuclei of the epithelial cells present a de-condensed chromatin and large nucleoli (Fig. 3B and C). A well-developed Golgi complex is found next to the nuclei (Fig. 3B and C). Many mitochondria are observed in the apical cytoplasm of the epithelial cells, while microvilli are seen at the apical plasma membrane (Fig. 3B and D). Between the adjacent epithelial cells, septate junctions are observed (Fig. 3C). The basal plasma membrane presents hemidesmosome-type junctions and various invaginations, in which the thick basal membrane appears to be inserted (Fig. 3C).

The accessory glands have a tubular shape and are slightly dilated in the further most anterior region, merging into the post-vesicular deferent ducts (Figs. 1A, 2A and D). Associated with the reproductive system, the musculature fixes it to the internal abdominal wall (Fig. 2A, B and D).

The spermatozoa of *Centris analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata* and *Centris* sp. are morphologically similar. These cells are elongated, almost uniform in diameter throughout its length, except at both ends, where they are more tapered (Fig. 4A). They have two easily distinguishable regions, the head and flagellum. The head is formed by a two-layer acrosome and the linear nuclei (Figs. 1C and 4B-H). The flagellum is formed by the centriole adjunct, the axoneme of 9 + 9 + 2 microtubules pattern, two asymmetric mitochondrial derivatives and two accessory bodies (Figs. 1D-F and 4N-P). The spermatozoon of *Centris (Hemisiella) tarsata* is 540  $\mu$ m long, and the nucleus and flagellum are 42 and 498  $\mu$ m long, respectively (Fig. 4A and B).

The acrosome is formed by a cone-shaped acrosomal vesicle that covers the perforatorium up to the anterior end of the nucleus (Figs. 1C and 4C). The posterior end of the acrosomal vesicle is chamfered and juxtaposed to the anterior end of the nucleus (Fig. 4C and E). At the base of the acrosome, the perforatorium appears inserted into a short nuclear cavity (Figs. 1C, 4C and G). In cross sections of the acrosome, one can see that the acrosomal vesicle is

electron-dense and ellipsoidal-shaped, while the perforatorium is circular. Between these two structures lies an electron-lucid region (Fig. 4D). In the acrosome-nucleus transition, the ends of each structure appear in the same section, indicating that they are symmetrical and chamfered (Fig. 4E). The part of the perforatorium inserted into the nucleus remains circular but its diameter is gradually reduced like an inverted cone (Fig. 4C, G and H).

The nucleus is dense and elongated (Figs. 1C, 4B and I) and is found in some individuals with completely compact chromatin, and in others, with several de-compacting areas identified both in cross-sections (Fig. 4F, J and K) and in longitudinal sections (Fig. 4I). The most posterior region of the nucleus is laterally projected towards the anterior end of the larger mitochondrial derivative, with which it associates through the centriole adjunct, finally becoming aligned and partially inserted into the centriolar region (Figs. 1D and 4L).

The centriolar region is located immediately below the nucleus and laterally to the centriole adjunct and to the larger mitochondrial derivative. It consists of nine accessory microtubules surrounding nine pairs of microtubules (Figs. 1D and 4M).

The centriole adjunct is electron-dense, cone-shaped with a very pointed anterior end, and located between the posterior region of the nucleus and the anterior region of the larger mitochondrial derivative (Fig. 1D). It lies parallel to the latter structure and to the axoneme, finally becoming juxtaposed to the smaller mitochondrial derivative (Fig. 1D). In cross sections, this is initially circular and with a quite reduced area (Fig. 4N), later turning into a larger area with a triangular shape (Fig. 4O).

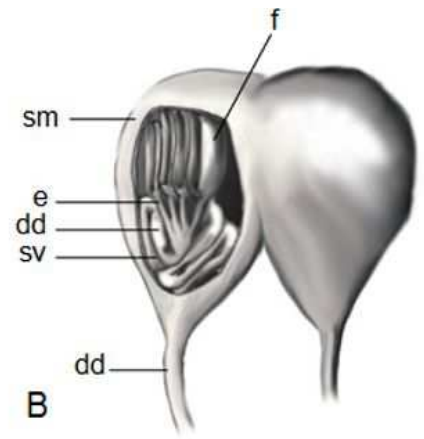
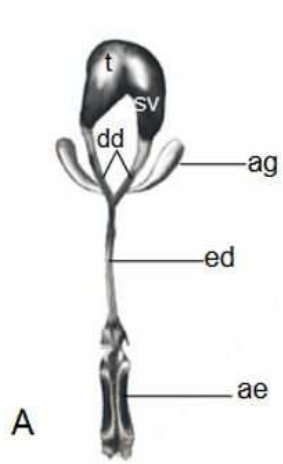
The mitochondrial derivatives are asymmetrical in length and diameter (Fig. 1D and F). The larger mitochondrial derivative starts before and next to the nuclear projection (Figs. 1D and 4L), around the centriole adjunct (Fig. 4N and O), ending after the smaller one at the end of the flagellum (Figs. 1F, 4Q and R). In cross sections, the anterior part of the larger mitochondrial derivative, at the height of the centriolar region, is more or less circular (Fig. 4M), while its middle portion is pyriform with an area almost two times larger than the anterior part (Fig. 4P). The larger mitochondrial derivative presents the following four regions in its median portion: (1) the electron-dense amorphous region

(proximal to the axoneme), (2) the electron-lucid amorphous region (central), (3) the paracrystalline region (distal to the axoneme) and (4) the region with mitochondrial cristae (near the outer mitochondrial membrane) (Fig. 4P). The smaller mitochondrial derivative starts subjacent to the posterior end of the centriole adjunct (Fig. 1D). In cross sections, it has a roughly circular shape and, unlike the larger one, does not have a paracrystalline region, only the other three regions (Fig. 4P).

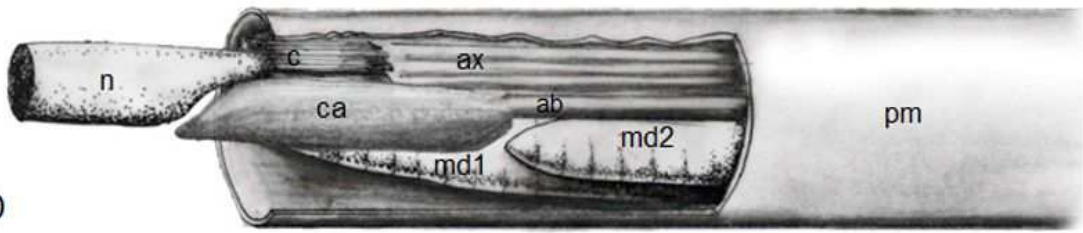
The axoneme has a 9 + 9 + 2 microtubule arrangement (Fig. 4P). This starts from the anterior region of the flagellum (Figs. 1D and 4M), becoming gradually disorganized at the end where the central and pair microtubules are initially lost, followed by each of the accessories (Fig. 4S).

The accessory bodies are electron-dense elongated structures that begin and end in different locations of the flagellum. One starts below the centriolar region, together with the beginning of the larger mitochondrial derivative and ends immediately before its end (Figs. 1D, F, 4M and R), while the other begins only after the end of the centriole adjunct, with the beginning of the smaller mitochondrial derivative, and ends immediately before its end (Fig. 1D and F). In cross sections, they exhibit a triangular shape and are located between the mitochondrial derivatives and axoneme, but not between the axoneme and centriole adjunct (Fig. 4P).

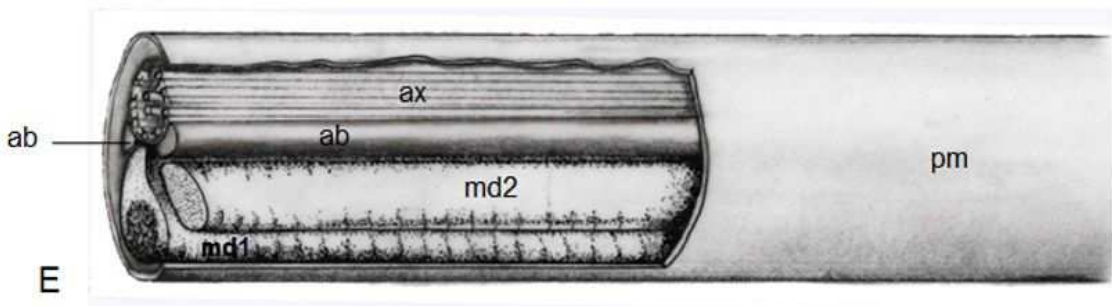
**Figure 1.** Schematic representation of the anatomical structure of the male reproductive system of *Centris* sp.. (A and B) and the sperm ultrastructure of *C. analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata* and *Centris* sp.. (C to F). (A) Schematic representation of the general morphology. (B) Schematic representation of the interior of the region surrounded by the scrotal membrane, where the testicular follicles, efferent ducts, pre-vesicular deferent ducts and seminal vesicles can be seen. (C) Head region. (D) Head flagellum transition region. (E) Flagellum medium region. (F) Posterior flagellum region. ae: aedeagus; ab: accessory body; ag: accessory gland; av: acrosomal vesicle; ax: axoneme; ca: centriole adjunct; c: centriolar region; dd: deferent duct; e: efferent duct; ed: ejaculatory duct; f: testicular follicle; md1: larger mitochondrial derivative; md2: smaller mitochondrial derivative; n: nucleus; p: perforatorium; pm: plasma membrane; sm: scrotal membrane; sv: seminal vesicle; t: testis.



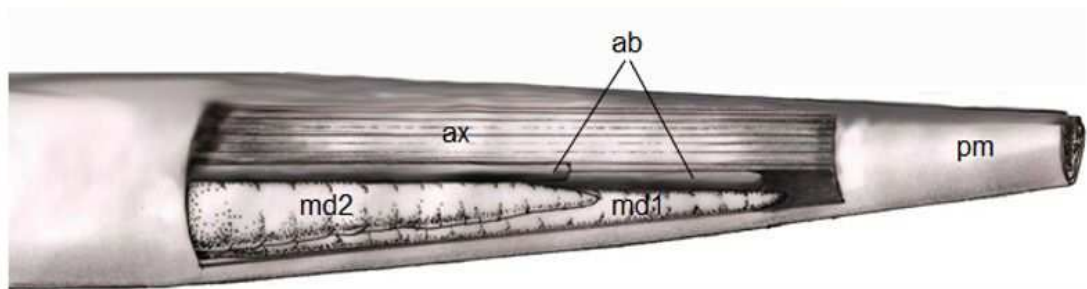
C



D

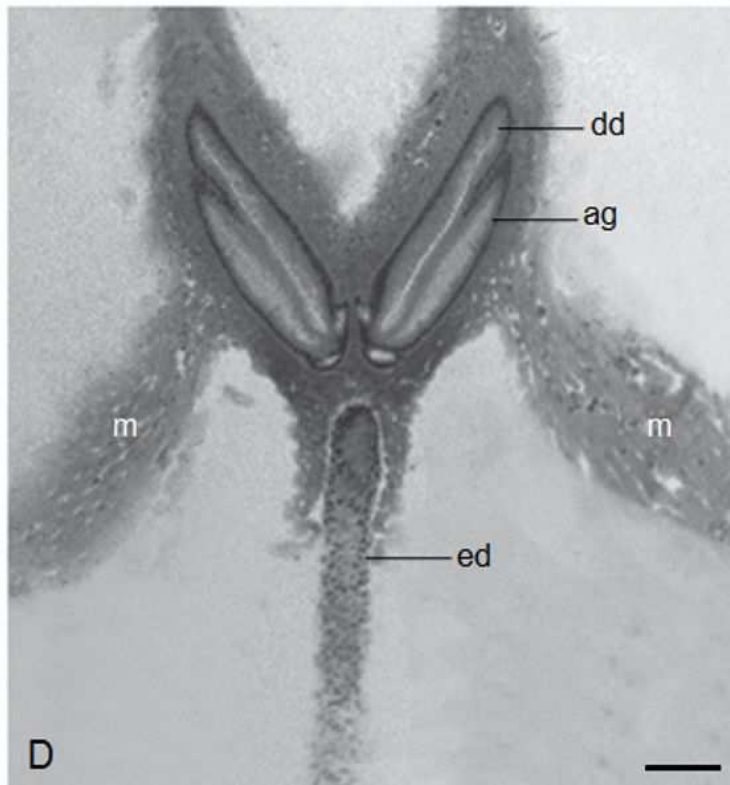
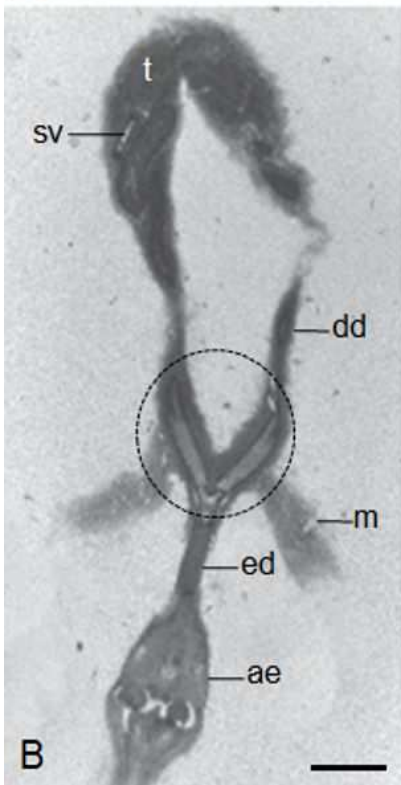
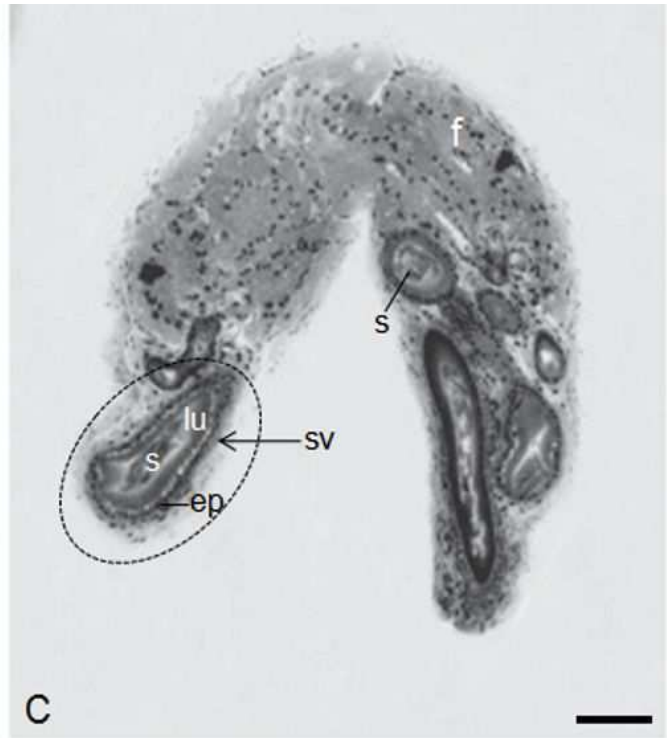
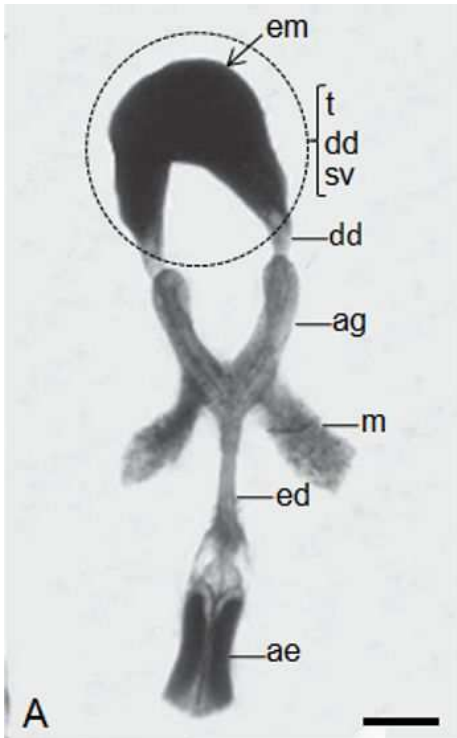


E

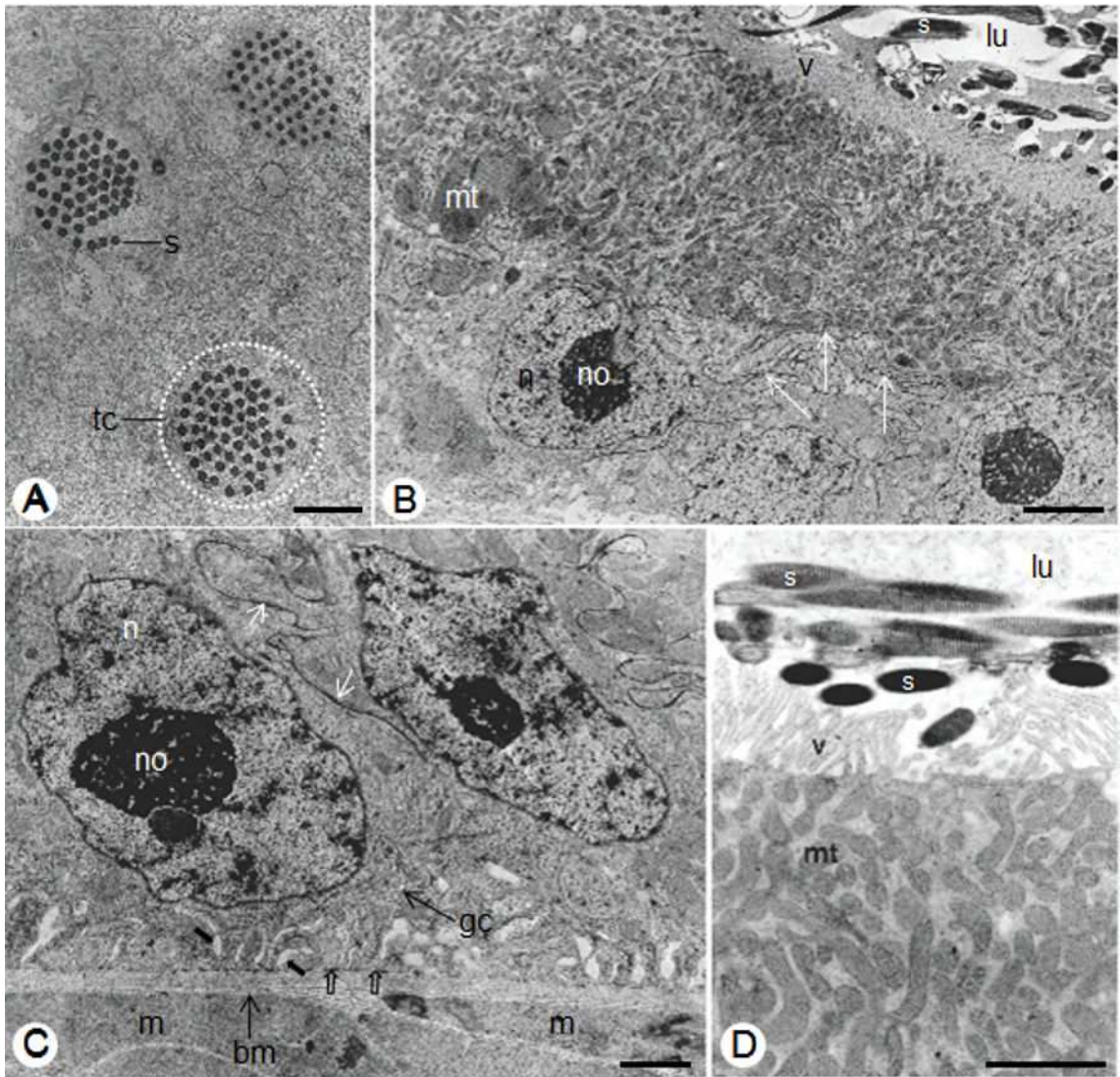


F

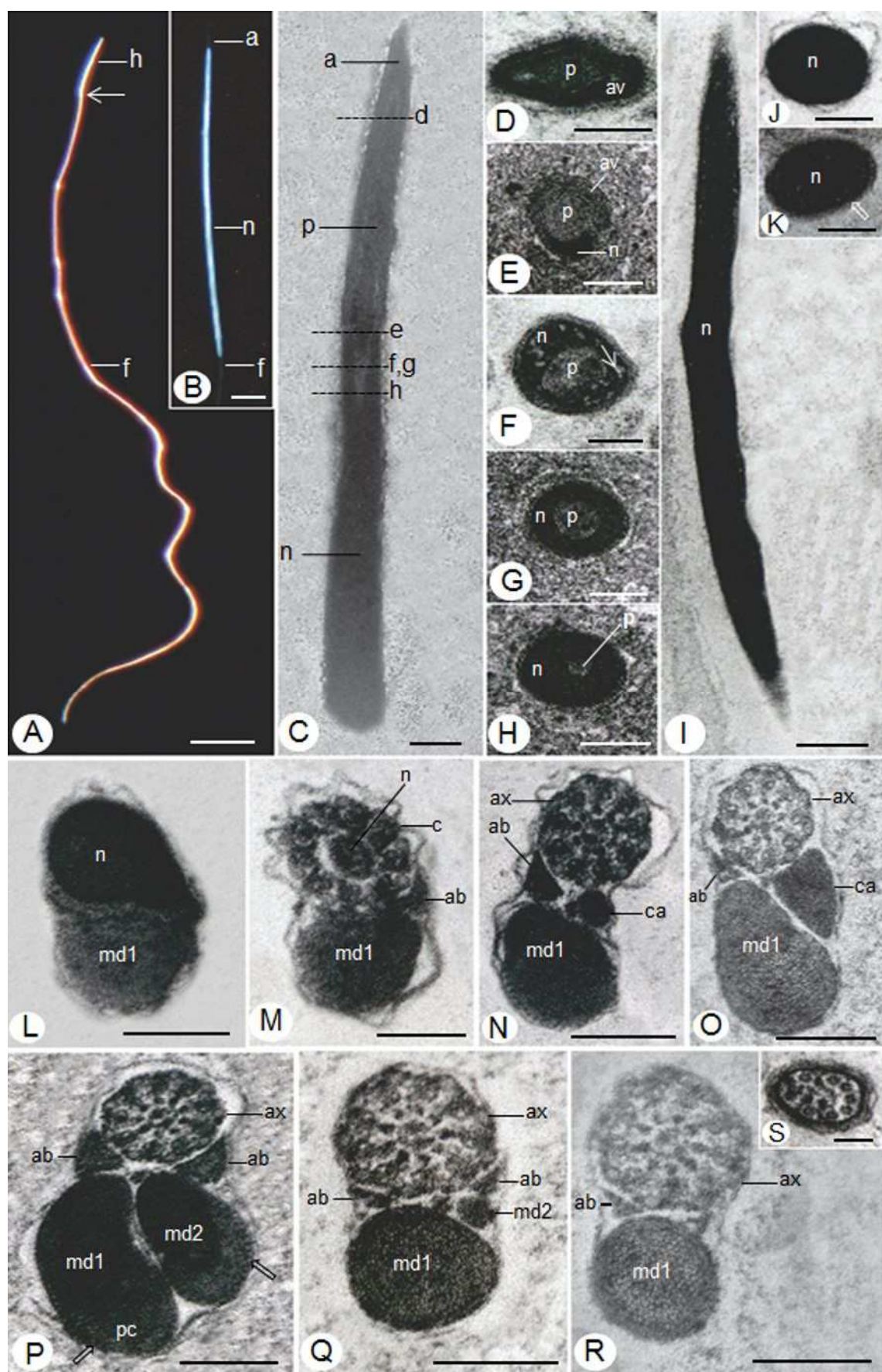
**Figure 2.** Light micrographs of the general morphology (A) and semi-thin sections of the male reproductive system (B to D) of *Centris* sp.. ae: aedeagus; ag: accessory gland; dd: deferent duct; ed: ejaculatory duct; sm: scrotal membrane; ep: epithelium; f: testicular follicle; lu: lumen; m: muscle; s: sperm; sv: seminal vesicle; t: testis. Scale bars: (A) and (B) = 333  $\mu$ m; (C) = 125  $\mu$ m; (D) = 85  $\mu$ m.



**Figure 3.** Transmission electron micrographs of the testes (A) and seminal vesicles (B to D) of *C. analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata* and *Centris* sp.. (A) Cross section of the testis. (B) Section of the simple cylindrical epithelium of the seminal vesicle. (C) Basal region of two epithelial cells separated from the muscular tunic (m) by the basal membrane (bm). (D) Increase in the apical region of the cell shown in (B). bm: basal membrane; gc: Golgi complex; lu: lumen; m: muscular tunic; mt: mitochondria; n: nucleus; no: nucleole; s: sperm; tc: testicular cyst; v: microvilli; white arrows: septate junctions; black full arrows: basal plasma membrane invaginations; black empty arrows: hemidesmosome-type junctions. Scale bars: (A) and (B) = 2  $\mu\text{m}$ ; (C) = 1  $\mu\text{m}$ ; (D) = 0.5  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4.** Light (A and B) and transmission electron (C to S) micrographs of the sperm of *Cenris analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata* and *Centris* sp. (A) Phase contrast. The white arrow shows the boundary between the head and flagellum. (B) Nucleus stained with DAPI. (C) Longitudinal section of the head region. Note the posterior end of the perforatorium inserted into the cavity of the anterior nucleus region. (D to H) Cross sections at various levels from the anterior towards the posterior end of the head indicated by dotted lines in (C). (D) Acrosome region where the ellipsoidal acrosome vesicle, perforatorium and the electron-lucid layer separating these two structures (seen as two white points between them) can be seen. (E) Boundary between the end of the acrosomal vesicle and the start of the nucleus. (F to H) Region where the perforatorium is inserted into the nucleus. (F and G) Same cross section level indicated in (C), while in (F), the nucleus exhibits a de-compacted chromatin region (white arrow). (I) Longitudinal and (J and K) cross sections of the nucleus. (K) Various de-compacted chromatin points (white empty arrows). Cross sections of the transition region between the head and flagellum (L to O) and of the flagellum region (P to S). (M) Note the anterior projection of the nucleus inserted into the centriolar region. (P) Median flagellum region. The paracrystalline material region occurs only in the larger mitochondrial derivative, while the mitochondrial cristae region (black empty arrows) occurs in both mitochondrial derivatives. (Q to S) Flagellum end regions. The smaller mitochondrial derivative finalizes before the larger one and the accessory microtubules are the last to finalize. a: acrosome; ab: accessory body; av: acrosomal vesicle; ax: axoneme; ca: centriole adjunct; c: centriolar region; f: flagellum; h: head; md1: larger mitochondrial derivative; md2: smaller mitochondrial derivative; n: nucleus; p: perforatorium; pc: paracrystalline material. Scale bars: (A) = 25µm; (B) = 4 µm; (C) and (I) = 0.5 µm; (D), (E), (G), (H), (K to M), (P to Q) = 0.2 µm; (F), (R to S) = 0.1 µm; (J), (M to O) = 0.3 µm.



#### 4. Discussion

The general morphological structure of the male reproductive system of the *Centris* species studied in this work is similar to that described in several other Hymenoptera species (Dirks and Stemburg, 1972; Dallacqua and Cruz-Landim, 2003; Ferreira et al., 2004; Bushrow et al., 2006; Fiorillo et al., 2008, 2009; Gracielle et al., 2009; Araújo et al., 2010a, b; Moreira et al., 2008, 2010).

The internal male reproductive system of *Centris* sp. is similar to that of *C. violacea* (Ferreira et al., 2004). Based on the classification by Ferreira et al. (2004), the reproductive system of these two species are of type II, as they present both testes and the two deferent ducts (pre-vesicular and seminal vesicle) enveloped by a single scrotal membrane, forming only one globular unit. On the other hand, in *C. fuscata*, *C. tarsata* and *C. vittata* (Ferreira et al., 2004), the reproductive system is of type III, presenting each testis and deferent duct (pre-vesicular and seminal vesicle) enveloped by a separate scrotal membrane to form two globular units. The type II reproductive system is considered the anatomical standard, a phylogenetic intermediary to types I and III, indicating a tendency for the separation of the units enveloped by the scrotal membrane with a greater development of the ejaculatory duct (Ferreira et al., 2004). The occurrence of these two types of system in *Centris* is not surprising, especially for being subgenera of different groups: *C. fuscata*, *C. tarsata* and *C. vittata* are included in the group Trachina, while *C. violacea* belongs to the group Melacentris (Ayala, 1998). *Centris* sp. may belong to the group Melacentris (*sensu* Ayala, 1998). This grouping according to the anatomical differences of the male reproductive system shows that these characteristics are potential objects for phylogenetic studies.

Except for *Apis mellifera* Apinae) (Louveaux, 1977) and *Hypanthidium foveolatum* (Megachilinae) (Gracielle et al., 2009), which have around 200 and 28 follicles per testis, respectively, other Apidae studied have three or four follicles per testis. For instance, *Centris*, as well as other Apinae (Ferreira et al., 2004; Lima et al., 2006; Fiorillo et al., 2009; Brito et al., 2010), Anthophorinae (Araújo et al., 2010b), Melittinae and some Megachilinae (Roig-Alsina e Michener, 1993; Ferreira et al., 2004), present four follicles per testis. On the other hand, Andreninae, Colletinae, Halictinae, the majority of the Megachilinae (Ferreira et al., 2004) and the wasps Crabronidae (Zama et al., 2007; Moreira et

al., 2008) and Vespidae (Dirks e Stemburg, 1972; Brito et al., 2005; Bushrow et al., 2006; Araújo et al., 2010a) present three follicles per testis. In Formicidae, this number ranges from 1 to 25 (Wheeler and Krutzsch, 1992) and in parasitic wasps (Fiorillo et al., 2008; Moreira et al., 2010) there is only one follicle per testis.

Organization of cysts in the testicular follicles is a common feature of insects. However, the number of spermatozoa formed by cysts varies considerably. In Hymenoptera, during spermatogenesis, only two spermatids are formed from each haploid spermatogonium (Cruz-Landim, 2008). If all the spermatids are viable and transformed into spermatozoa during spermiogenesis, the maximum number of spermatozoa per cysts is the same as that of the spermatids, determined by the number of mitotic cycles through which that single initial spermatogonium underwent. Thus, one can determine the number of mitotic cycles from the number of spermatids and/or spermatozoa formed. In some groups of Hymenoptera, such as Meliponini (Conte et al., 2005; Lino-Neto et al., 2008) and *Apis mellifera* (Cruz-Landim, 2001), half of the spermatids are eliminated during spermiogenesis. Thus, in each cyst, the maximum number of spermatozoa found corresponds to half the final number of cells that have developed in synchrony within the cysts from a single spermatogonium.

The presence of up to 64 spermatozoa per cyst, as in *Centris*, is also observed in other Apidae such as Euglossini (Zama et al., 2005a), Bombini (Zama, 2003) and Xylocopini (Fiorillo et al., 2009). However, in the Anthidiini *Hypanthidium foveolatum* (Gracielle et al., 2009) and in the Apidae Meliponini, up to 128 spermatozoa per cyst are observed (Cruz-Landim, 2001; Zama et al., 2001; Lino-Neto et al., 2008), indicating that 64 spermatozoa per cyst is the basal (plesiomorphic) condition for the bees. In the Crabronidae *Trypoxylon* (Moreira et al., 2008; Araújo et al., 2009) and *Microstigmus* (Zama et al., 2007) up to 32 and 64 spermatozoa are found per cyst, respectively, while in the Sphecidae *Sceliphron* (Zama et al., 2005b) and in the Vespidae *Myschocyttarus* (Brito et al., 2005) and *Polistes* (Araújo et al., 2010a), 128 spermatozoa per cyst are found.

The seminal vesicles in *Centris* are specialized coiled-tubular dilated regions of the deferent ducts, similar to that observed in most bees (Ferreira et al., 2004; Gracielle et al., 2009), except in Meliponini, where they form a

spherical structure (Dallacqua and Cruz-Landim, 2003; Ferreira et al., 2004; Araújo et al., 2005a, b; Brito et al., 2010). The histological structure of the seminal vesicles of *Centris* sp. is quite similar to that described for *A. mellifera* (Cruz-Landim and Cruz-Höfling, 1969a, b) and Meliponini *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Dallacqua and Cruz-Landim, 2003), *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Araújo et al., 2005a, b), *Partamona helleri* Friese (Banin et al., 2005), *Melipona mondury* Smith (Lima et al., 2006) and *Friesella schrottky* Friese (Bruto et al., 2010). However, the authors describe the occurrence of numerous lipid vesicles and myelin structures in the epithelial cells, indicative of autophagic activity of the epithelium that becomes more abundant in more mature individuals (Cruz-Landim and Cruz-Höfling, 1969a, b; Dallacqua and Cruz-Landim, 2003; Araújo et al., 2005a, b; Banin et al., 2005). The absence of these structures in *Centris* sp. indicates a morpho-functional difference of this organ, since in many solitary bees the spermatozoa production is continuous and the individuals copulate several times during adulthood. On the other hand, in social bees such as the ones previously mentioned, the spermatozoa production occurs only once and the males mate only once. The ultrastructural characteristics, de-condensed chromatin, large nucleoli, many mitochondria, a developed Golgi complex, many microvilli, septate junctions between adjacent cells, hemidesmosome-type junctions and several invaginations in the basal membrane of the epithelial cells of the seminal vesicle indicate that they may be absorptive, perform transport and have high metabolic activity. Some of these characteristics are also present in other Hymenoptera, such as in the bees *A. mellifera* (Cruz-Landim and Cruz-Höfling, 1969a, b), *Melipona bicolor bicolor* (Dallacqua and Cruz-Landim, 2003), *Xylocopa frontalis* (Fiorillo et al., 2009) and *Pegoscapus* wasp genus (Chalcidoidea) (Fiorillo et al., 2008).

The ultrastructure of the spermatozoa with a two-layer acrosome (acrosomal vesicle and perforatorium), as in *C. analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata* and *Centris* sp., is a synapomorphic characteristic of all the bees studied (Cruz-Höfling et al., 1970; Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al. 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Zama, 2003; Báó et al., 2004; Araújo et al. 2005c; Badke et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al., 2009), as well as of the other groups of Aculeata: Sphecidae (Zama et al., 2005b), Crabronidae (Araújo et al., 2009), Formicidae (Thompson and Blum, 1967; Wheeler et al., 1990;

Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007) and Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009). In most of these Aculeata, in cross sections of the acrosome, the acrosomal vesicle is electron-dense and ellipsoidal, while the perforatorium is circular. However, in Meliponini (Zama et al., 2001, 2004; Araújo et al., 2005c; Badke et al., 2005) and Formicidae (Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007), the acrosomal vesicle observed in cross section is circular, acquiring a triangular shape as it approaches the nucleus. On the other hand, in *A. mellifera*, there is an exclusive projection of the acrosomal vesicle at the anterior end, where it is very long and slender, and the perforatorium is rectangular in cross sections (Cruz-Höfling et al., 1970; Peng et al., 1993). This characteristic can be considered an autapomorphy for this species.

Nuclei with altered chromatin compaction, as observed in these *Centris* species, have been described for some meliponids, where it is compressed into flakes, giving the nucleus a loose chromatin appearance (Zama et al., 2004; Badke et al. 2005). Numerous paracrystalline incrustations were observed in the sperm nucleus of Halictidae (Fiorillo et al., 2005), while *Exomalopsis auropilosa* Spinola (Exomalopsini) and *Paratetrapedia* sp. Michener and Moure (Tapinotaspidini) present small clear or electron-lucid regions (Báo et al., 2004). Similar changes have also been observed in Formicidae (Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007). However, in these Aculeata, in contrast to *Centris*, changes in chromatin pattern (homogeneous and compact) are observed in all individuals, indicating the typical morphological aspect of the nucleus in these species. However, in *Centris*, this compaction variation occurs in different individuals of the same species, indicating a relationship with some of their physiological conditions.

In Aculeata, the asymmetrical projection on the posterior part of the nucleus aligned with the centriole is a synapomorphic characteristic. In most cases, the posterior end of this projection is juxtaposed to the centriole, as in Apidae (Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Zama, 2003; Báo et al., 2004; Araújo et al., 2005c; Gracielle et al., 2009), Bethyridae (Oliveira et al., 2010), Crabronidae (Araújo et al., 2009), Formicidae (Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007), Halictidae (Fiorillo et al., 2005) and Sphecidae (Zama et al., 2005b), or inserted into the centriole, as in *A. mellifera* (Apidae) (Lino-Neto et al., 2000b), *Xylocopa frontalis* (Apidae) (Fiorillo et al., 2009), *Microstigmus arlei*

e *M. nigrophthalmus* (Crabronidae) (Zama et al., 2007), *Agelaia vicina* and *Vespa crabro* (Vespidae) (Mancini et al., 2006, 2009) and in the *Centris* species studied in this work.

The centriole adjunct in *Centris* is similar to that of *A. mellifera* (Lino-Neto et al., 2000b). In these bees, this structure is cone-shaped and anteriorly circular in cross section, posteriorly acquiring a triangular shape. In other bees, the centriole adjunct appears as an electron-dense rod continually triangular in cross sections (Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Bao et al., 2004; Araújo et al., 2005c; Badke et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al., 2009). In *Centris* and other Apidae studied, the centriole adjunct begins adjacent to the posterior region of the nucleus, extending parallel to the anterior axoneme regions and to the larger mitochondrial derivative, ending over the anterior end of the smaller mitochondrial derivative. This characteristic is synapomorphic of the family.

The mitochondrial derivatives asymmetric in diameter and length and only the largest one presents a paracrystalline region located distally in relation to the axoneme, as observed in *Centris*, occur in most aculeatan (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005a, b; Zama, 2003; Bao et al., 2004; Araújo et al. 2005c; Badke et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2009; Gracielle et al., 2009; Araújo et al., 2009; Mancini et al., 2006, 2009). Ants (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007) and the wasp *Prorops nasuta* (Chrysoidea: Bethyidae) (Oliveira et al., 2010) are exceptions, since the mitochondrial derivatives are symmetrical in cross sections and the paracrystalline material occurs in both. In *Centris* and in almost all the Hymenoptera studied, the smaller mitochondrial derivative ends before the larger one. Vespidae *Vespa crabro* (Mancini et al., 2009) and Eulophidae *Melittobia hawaiiensis* and *M. Australia* (Parasitic) (Brito et al., 2009) are the only exceptions so far, since it is the larger mitochondrial derivative that ends before the smaller one. In addition, the parasitic wasps *Trissolcus basalıs* and *Telenomus podisi* (Platygastroidea) (Lino-Neto and Dolder, 2001b) are the only species so far that have only one mitochondrial derivative.

The axoneme of *Centris* and most Aculeata studied become gradually disorganized at the end, where the central microtubules initially end, followed by the doublets, and finally, by each of the accessories (Lino-Neto et al., 2000b;

Zama et al., 2001, 2004, 2005a, b, 2007; Bao et al., 2004; Badke et al., 2005; Fiorillo et al., 2005, 2008; Mancini et al., 2006, 2009; Araújo et al., 2009; Gracielle et al., 2009; Oliveira et al., 2010). On the other hand, in parasitic wasps (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto and Dolder, 2001a; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010) the accessory microtubules end before the microtubules of the nine doublets. Of all the hymenopteran species studied so far, only the ants of the genus *Pseudomyrmex* display an axoneme with a 9 + 9 + 1 microtubule arrangement (Moya et al., 2007), which differ from the axonemal pattern 9 + 9 + 2 observed in insects in general.

The accessory bodies in *Centris*, as also observed in other aculeatan species (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005a, b, 2007; Bao et al., 2004; Araújo et al., 2005c, 2009; Fiorillo et al., 2005, 2009; Mancini et al., 2006, 2009; Moya et al., 2007; Gracielle et al., 2009), are elongated structures, triangular in cross sections, and located between the axoneme and the mitochondrial derivatives, but not between the axoneme and the centriole adjunct. In Hymenoptera, these structures are well conserved and exceptionally large in the *Centris* species.

The *Centris* species analyzed in this study share several morphological characteristics of the male reproductive system and spermatozoa with the other bees previously described, indicating that several characteristics are synapomorphic for the Apidae family. This information reinforces the suggestion by Melo and Gonçalves (2005) that all bees belong to the Apidae family.

The morphological studies of the male reproductive system and spermatozoa in Hymenoptera demonstrate the diversity of information provided by these reproductive structures and their validity in the elucidation of taxonomy and phylogenetic issues remaining in this important group of insects.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Centre for Microscopy and Microanalysis of the Federal University of Viçosa (UFV) and the University of Campinas (UNICAMP). This research was funded by CAPES, CNPq, FAPEMA and FAPEMIG.

## References

- Araújo, V.A., Zama, U., Neves, C.A., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2005a. 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.
- Araújo, V.A., Zama, U., Neves, C.A., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2005b. Seminal vesicle in Meliponini: passive organ to storage spermatozoa? *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 181-182.
- Araújo, V.A., Zama, U., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2005c. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 137-141.
- Araújo, V.A., Moreira, J., Lino-Neto, J., 2009. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron* 40, 719-723.
- Araújo, V.A., Moreira, J., Lino-Neto, J., 2010a. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. *J. Insect Sci.* 10, 1-10.
- Araújo, V.A., Freitas, F.V., Moreira, J., Neves, C.A., Lino-Neto, J., 2010b. Morphology of male reproductive system of two solitary bee species (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop. Entomol.* 39, 595-600.
- Ayala, R., 1998. Sistemática de los Taxa Supra específicos de las Abejas de la tribu Centridini (Hymenoptera: Anthophoridae). PhD thesis, National Autonomous University of Mexico.
- Baccetti, B., 1970. The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: Baccetti, B. (Ed.), *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, pp. 169–182.
- Badke, J.P., Banin, T.M., Scorza, L.C.T., Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2005. Ultrastructure of Spermatozoa in *Partamona helleri* Friese (1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 64-65.
- Banin, T.M., Badke, J.P., Scorza, L.C.T., Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2005. The seminal vesicle epithelium in *Partamona helleri* Friese (1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 67.
- 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 and Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36, 23-28.
- Bohart, G.E., 1970. The evolution of parasitism among bees. Utah State University Honor Lecture, The Faculty Association, 1-30.
- Brito, P., Moreira, J., Lino-Neto, J., 2005. Morphology of male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus* sp. (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 175-176.
- Brito, P., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2009. Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue Cell* 41, 113-117.

- Brito, P., Zama, U., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2010. New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae): histological and physiological development during sexual maturation. *Apidologie* 41, 203-215.
- Bushrow, E.S., Filler, C.L., Cowan, D.P., Byr, C.A., 2006. Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invert. Biol.* 125, 354-362.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Conte, M., Lino-neto, J., Dolder, H., 2005. Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): fate of the atypical spermatids. *Caryologia* 58, 183-188.
- Cruz-Landim, C., 2001. Organization of the cysts in bees (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringea, Sér. Zool.* 91, 183-189.
- Cruz-Landim, C., 2008. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Unesp, São Paulo, 408.
- Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A., 1969a. Observações sobre a ultraestrutura dos vasos deferentes de *Apis mellifera* L. *Rev. Brasil. Biol.* 29, 181-190.
- Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A., 1969b. Electron microscopy observations on honeybee seminal vesicles (*Apis mellifera adansonii*, Hymenoptera, Apidae). *Papeis Avulsos Zool. S. Paulo* 22, 145-151.
- Cruz-Höfling, M.A., Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1970. The fine structure of spermatozoa from the honey bee. *An. Acad. Brasl. Cienc.* 42, 69-78.
- Cruz-Landim, C., Barreto, M.D., 1991. The post-embryonic development of male gonads in *Apis mellifera* L. *Naturalia* 16, 183-191.
- Dallacqua, R.P., Cruz-Landim, C., 2003. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med. Series C* 32, 276-281.
- Dallai, R., 1974. Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta Apterygota. *Pedobiology* 14, 148-156.
- Dirks, T.F., Sternburg, J.G., 1972. Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 1, 315-320.
- Ferreira, A., Abdalla, F.C., Kerr, W.E., Cruz-Landim, C., 2004. Systematics, morphology and physiology. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* 33, 569-576.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.M., Lino-Neto, J., Bão, S.N., 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37, 75-81.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J., Bão, S.N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39, 1271-1280.

- Fiorillo, B.S., Zama, U., Lino-Neto, J., Bao, S.N., 2009. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). *Acta Zool.* 89, 1463-1470.
- Gracielle, I.M.S., Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J., Bao, S.N., 2009. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* 40, 719-723.
- Griswold, T., P.E. Hanson & I. Alves-dos-Santos, 2006. Las abejas. Hymenoptera Del Neotrópico. *Memoirs of the American Entomological Institute*, (Hanson, P.E. & I.D. Gauld, eds.) 77, 734-785.
- Hanson, P.E., Menke, A.S., 2006. Las avispas apoideas: Ampulicidae, Spicidae, Crabronidae. Hymenoptera del Neotrópico. *Memoirs of the American Entomological Institute*, (Hanson, P.E. & I.D. Gauld, eds.) 77, 694-733.
- Jamieson, B.G.M., 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, 320.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 555.
- Lima, M.A.P., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., 2006. Sexual maturation in *Melipona mondury* males (Apidae: Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.* 23, 369-375.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001a. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolini* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 82, 159-164.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001b. Structural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scrip.* 30, 89-96.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell* 34, 124-128.
- Lino-Neto, J., Bao, S.N., Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of 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. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatma and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81, 205-211.
- Lino-Neto, J., Bao, S.N., 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., Araújo, V.A., Dolder, H., 2008. Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* 51, 163-172.
- Louveaux, J., 1977. Anatomie de l'abeille: X-L'appareil reproducteur du male. *B.T.A.* 4, 43-48.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of *Agelais vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insect Soc.* 53, 333-338.

- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., Dallai, R., 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arth. 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 of the Natural History Museum of the University of Kansas* 14, 1-55.
- Melo, G.A.R., Gonçalves, R.B., 2005. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae *sensu lato*). *Rev. Bras. Zool.* 22, 153-159.
- Michener, C.D., 1951. Subgeneric groups of *Hemisia* (Hymenoptera, Apoidea). *J. Kansas Entomol. Soc.* 24, 1-11.
- Michener, C.D., 1965. A classification of the bees of the Australian and South Pacific Regions. *American Museum of Natural History, Bulletin* 130, 1-362.
- Michener, C.D., 2000. *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 913.
- Moreira, P.A., Araújo, Zama, U., Lino-Neto, J., 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37, 429-435.
- Moreira, J., Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2010. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron* 41, 187-192.
- Moya, J., Mancini, K., Lino-Neto, J., Delabie, J., Dolder, H., 2007. Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.* 88, 181-187.
- Moure, J.S., Melo, G.A.R., 2007a. Ericrocidini Cockerell & Atkins, 1902. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, Brasil. (Moure, J.S., Urban, D. and G.A.R. Melo, orgs.) 158-166.
- Moure, J.S., Melo, G.A.R., 2007b. Rhathymini Lepeletier, 1841. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, Brasil. (Moure, J.S., Urban, D. and G.A.R. Melo, orgs.) 605-608.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 1999a. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.* 8, 35-47.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.* 8, 197-203.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 2000. Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *J. Hym. Res.* 9, 62-70.
- Oliveira, C.M., Mancini, K., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyilidae). *Tissue Cell* 42, 242-246.

- 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. Scrip.* 21, 381-402.
- Roig-Alsina, A., Michener, C.D., 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas Sci. Bull.* 55, 123-162.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte, 253.
- Thompson, T.E., Blum, M.S., 1967. Structure and behavior of spermatozoa of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60, 632-642.
- Vivallo, F., 2010. *Sistemática e filogenia da tribo de abelhas Centridini e suas relações filogenéticas com as tribos cleptoparasitas Ericrocidini e Rhathymini (Hymenoptera: Apidae)*. PhD thesis, Federal University of Paraná.
- Wheeler, D.E., Crichton, E.G., Krutzsch, P.H., 1990. Comparative Ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.* 206, 343-350.
- Wheeler, D.E., Krutzsch, P.H., 1992. Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* 211, 307-317.
- Zama, U., 2003. *Estudo estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com considerações filogenéticas*. PhD thesis, State University of Campinas.
- 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 Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect Soc.* 52, 122-131.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., Bão, 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, 313-321.
- Zama, U., Moreira, J., Bão, 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. *Arth. Struct. Dev.* 36, 304-316.

## Ultraestrutura e citoquímica dos espermatozoides de *Epicharis* (*Epicharoides*) *picta* Smith, 1874 (Hymenoptera: Apidae, Centridini)

### Resumo

Este trabalho é o primeiro sobre espermatozoides no gênero *Epicharis*. Os espermatozoides de *Epicharis picta* são filiformes, medem 250 µm e apresentam duas regiões facilmente distinguíveis, cabeça e flagelo. A cabeça é formada pelo acrossomo e pelo núcleo e mede 27 µm. O acrossomo é formado pela vesícula acrossomal cônica e pelo *perforatorium* alongado, cuja extremidade posterior é inserida em uma cavidade assimétrica na região anterior do núcleo. A vesícula acrossomal é E-PTA positiva e o *perforatorium* é E-PTA negativo. O núcleo é eletrondenso, compacto, e E-PTA negativo. Ele gradualmente torna-se delgado em direção da extremidade anterior e é oval em corte transversal. A cabeça e o flagelo são conectados pelo adjunto do centríolo compacto, eletrondenso e predominantemente E-PTA negativo, com somente a área periférica E-PTA positiva. O flagelo é formado por um axonema de padrão 9 + 9 + 2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Os derivados mitocondriais são assimétricos em comprimento e diâmetro, com uma região paracristalina exclusiva no derivado mitocondrial maior e a única E-PTA negativa. O axonema é E-PTA positivo e forma-se a partir do centríolo que se localiza imediatamente abaixo do núcleo. Na porção final do flagelo, o axonema se desorganiza gradualmente, onde inicialmente terminam os microtúbulos centrais, seguidos pelos das duplas e por fim os acessórios. Os corpos acessórios são alongados, eletrondensos, E-PTA positivos e, em seções transversais, se apresentam triangulares e localizados entre os derivados mitocondriais e o axonema. Os espermatozoides de *E. picta* compartilham várias características com aqueles das demais abelhas já descritas, sugerindo que vários caracteres sejam sinapomórficos para a família Apidae.

**Palavras-chave:** abelha; ultraestrutura; E-PTA; sinapomorfias.

Destaques da pesquisa:

- ▶ Descrição da ultraestrutura do espermatozoide de *Epicharis picta*.
- ▶ Citoquímica (E-PTA) ultraestrutural do espermatozoide de *Epicharis picta*.
- ▶ Ultraestrutura dos espermatozoides fornecem características promissoras para estudos de sistemática.

## 1. Introdução

A superfamília Apoidea é um grupo monofilético constituído pelas abelhas, todas pertencentes à família Apidae e as vespas Ampulicidae, Heterogynaidae, Sphecidae e Crabronidae (MELO, 1999; MELO; GONÇALVES, 2005). Esta superfamília tem cerca de 30.000 espécies descritas (HANSON; MENKE, 2006) distribuídas em praticamente todos os ecossistemas terrestres (MICHENER, 2007). As abelhas (Apidae *sensu lato*) são o grupo mais diverso com cerca de 16.000 espécies, descritas em aproximadamente 500 gêneros, embora o número estimado de espécies seja muito maior (GRISWOLD *et al.*, 2006; MICHENER, 2007).

Centridini é uma tribo de abelhas solitárias, não corbiculadas, com cerca de 270 espécies agrupadas em dois gêneros, *Centris* Fabricius, 1804 e *Epicharis* Klug, 1807 (MICHENER, 2007; MOURE *et al.*, 2007). Ambos os gêneros estão amplamente distribuídos na região Neotropical, principalmente na América do Sul, sendo *Centris* também encontrado ao sul da região Neártica (MOURE *et al.*, 2007).

A importância ecológica dos Centridini está relacionada mais intimamente com a polinização das plantas com flores que produzem óleos, como as da família Malpighiaceae, Krameriaceae, Scrophulariaceae, Melastomataceae, Solanaceae, entre outras (BUCHMANN, 1987). Essas abelhas utilizam os óleos florais para alimentação das larvas e para a impermeabilização dos ninhos e do interior das células de cria (MICHENER, 2007).

O gênero *Epicharis* é constituído de nove subgêneros (MICHENER, 2007). Os principais trabalhos sobre *Epicharis* estão mais relacionados a descrições dos aspectos biológicos, etológicos, ecológicos e biologia da polinização (ROUBIK; MICHENER, 1980; HILLER; WITTMANN, 1994; INOUE, 2000; GAGLIANONE, 2003, 2005; SIGRIST; SAZIMA, 2004; THIELE; INOUE, 2007; ROCHA-FILHO *et al.*, 2008).

Os espermatozoides são células altamente especializadas, no entanto existem muitas diferenças em detalhes de sua morfologia entre os grupos de Hymenoptera que podem ser utilizadas em estudos de sistemática. Este trabalho é o primeiro sobre os espermatozoides no gênero *Epicharis* e tem

como objetivo descrever a morfologia dos espermatozoides de *Epicharis (Epicharoides) picta* buscando contribuir para estudos de sistemática desse importante grupo de insetos, bem como para os Hymenoptera como um todo.

## **2. Material e métodos**

Machos adultos de *Epicharis (Epicharoides) picta* Smith, 1874 foram coletados na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **2.1. Microscopia de luz**

Para determinação do tamanho total e do núcleo dos espermatozoides, machos adultos de *E. picta* foram dissecados, as vesículas seminais foram retiradas e abertas e os espermatozoides extraídos e espalhados sobre lâminas histológicas. Em seguida, foram fixados com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 20 minutos, lavados em água corrente e secos à temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas e os espermatozoides fotografados em fotomicroscópio Olympus BX-60, equipado com contraste de fase. Para determinação do tamanho dos núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml, lavadas com água destilada e montadas com sacarose 50%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em fotomicroscópio Olympus BX-60, sob epifluorescência, com filtro de excitação BP360-370 nm. Cem espermatozoides e 100 núcleos foram medidos utilizando o software Image Pro-Plus (versão 4.5; Media Cybernetics Inc., MD, EUA) e o comprimento total, do flagelo e do núcleo foram calculados a partir da média do número total de espermatozoides analisados.

### **2.2. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para descrição ultraestrutural dos espermatozoides, machos adultos de *E. picta* foram dissecados e as vesículas seminais fixadas, por 24 horas, em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, o material foi

lavado com o mesmo tampão, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas, desidratado em série crescente de acetona e infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **2.2.1. Citoquímica ultraestrutural: ácido fosfotúngstico-etanólico (E-PTA)**

Para detecção de proteínas básica ao nível ultraestrutural foi utilizada a técnica do E-PTA. O ácido fosfotúngstico (PTA) em meio alcoólico se liga principalmente a proteínas ricas em lisina, arginina e histidina.

Machos adultos de *E. picta* foram dissecados e as vesículas seminais fixadas, por 24 horas, em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e  $\text{CaCl}_2$  5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, o material foi lavado com o mesmo tampão, desidratado em série crescente de etanol e tratado em bloco com solução de E-PTA 2% em etanol absoluto por duas horas, em temperatura ambiente, e então infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante e coletados em telas de cobre. As análises e os registros fotográficos foram feitos em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## **3. Resultados**

Os espermatozoides de *Epicharis picta* medem 250  $\mu\text{m}$ . São filiformes e apresentam a extremidade da cabeça e o quarto posterior do flagelo mais delgados (Fig. 1A). A cabeça do espermatozoide mede 27  $\mu\text{m}$  e é formada pelo acrossomo e pelo núcleo (Fig. 1A-D). O flagelo é formado por um axonema,

dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios (Fig. 2A-D). A cabeça e o flagelo são conectados pelo adjunto do centríolo (Fig. 1E e K).

O acrossomo é formado por uma vesícula acrossomal e pelo *perforatorium* (Fig. 1C, F e G). A vesícula acrossomal é cônica, eletrondensa e recobre o *perforatorium* até a extremidade anterior do núcleo (Fig. 1C). O *perforatorium* é eletrondenso, alongado, levemente dilatado na porção mediana e localizado no centro do acrossomo (Fig. 1C e F). Nas seções transversais do acrossomo a vesícula acrossomal é circular na região anterior e oval à medida que se aproxima do núcleo, enquanto o *perforatorium* é circular em toda sua extensão (Fig. 1F e G). A região de transição acrossomo-núcleo é assimétrica. Seções transversais dessa região mostram a vesícula acrossomal, o *perforatorium* e o núcleo (Fig. 1G). A vesícula acrossomal e a área periférica do *perforatorium* são E-PTA positivas (Fig. 1G).

O núcleo é uma estrutura eletrondensa e compacta (Fig. 1D e H). Longitudinalmente, ele é alongado e gradualmente mais delgado para a extremidade anterior (Fig. 1A e B) e transversalmente é oval, tornando-se circular à medida que se distancia do acrossomo (Fig. 1H e I). A extremidade posterior do núcleo tem duas endentações de tamanhos diferentes diametralmente opostas (Fig. 1D e E). A endentação maior é adjacente às extremidades anteriores do adjunto do centríolo e do derivado mitocondrial maior, enquanto a menor é adjacente somente ao adjunto do centríolo (Fig. 1D, E e K). A extremidade posterior do núcleo tem forma de um cone invertido e finaliza alinhada e parcialmente inserida no centríolo (Fig. 1D, E, L e M). O núcleo é E-PTA negativo (Fig. 1E, I e M).

A região de transição cabeça-flagelo é formada pela base do núcleo, o adjunto do centríolo e as porções anteriores do derivado mitocondrial maior e do axonema (Fig. 1D e E).

O centríolo é localizado logo abaixo do núcleo e lateralmente à extremidade anterior do derivado mitocondrial maior e posterior do adjunto do centríolo (Fig. 1D, E, L e M). O centríolo é E-PTA positivo (Fig. 1M).

O adjunto do centríolo é eletrondenso e compacto (Figs. 1E, K e 2A). A sua região anterior é interposta à endentação maior da extremidade posterior do núcleo e à extremidade anterior do derivado mitocondrial maior, estende-se ao redor do núcleo e se encaixa na endentação menor, segue paralelamente

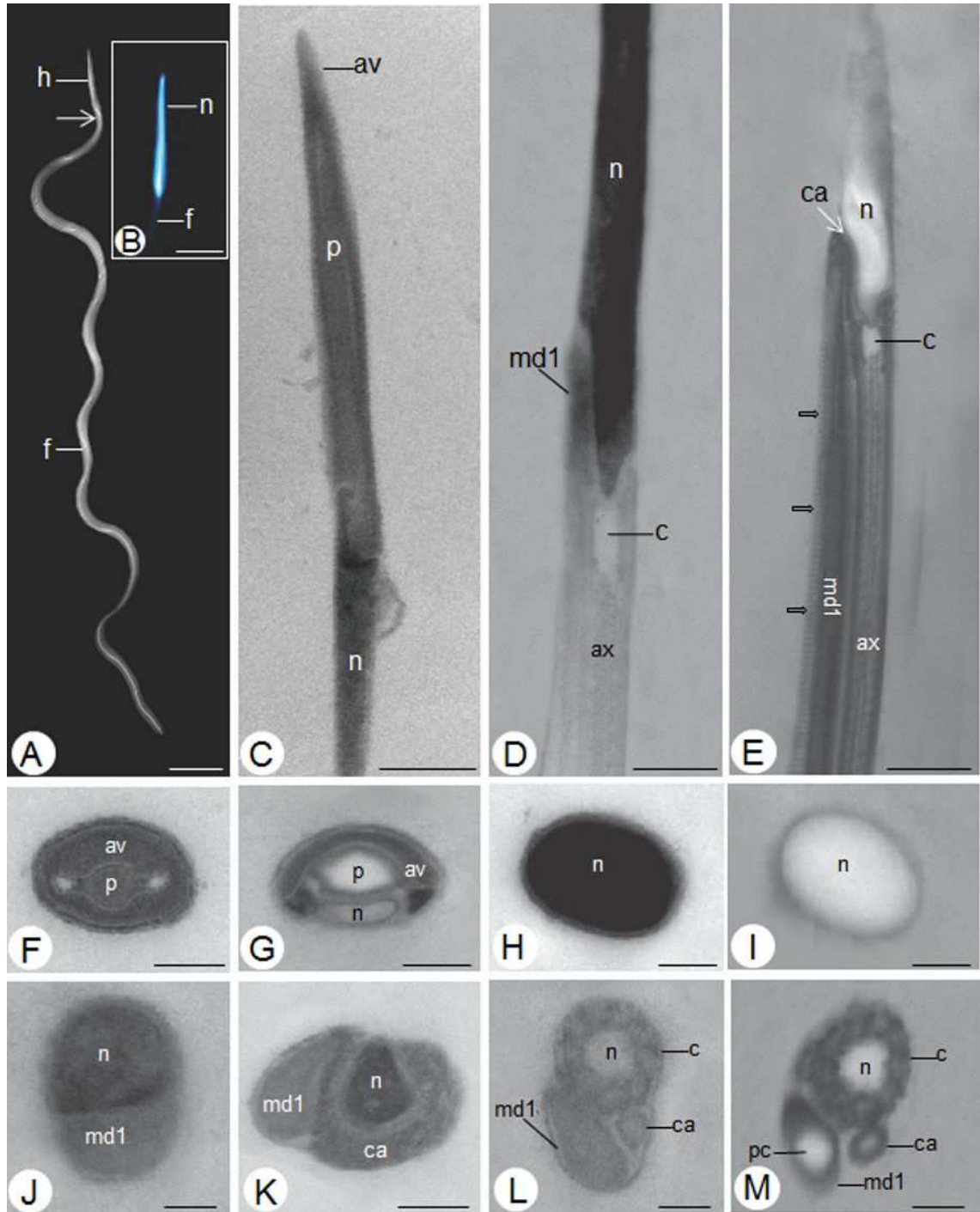
ao derivado mitocondrial maior, ao axonema e ao corpo acessório proximal ao derivado mitocondrial maior e termina justaposto ao derivado mitocondrial menor (Figs. 1D, E, K-M, 2A e C). Nas seções transversais mais anteriores da região de transição cabeça-flagelo, o adjunto do centríolo envolve quase que totalmente o núcleo e tem formato da letra “U”, mais posteriormente tem forma aproximadamente triangular (Figs. 1K e 2A). O adjunto do centríolo é predominantemente E-PTA negativo, com somente a área periférica E-PTA positiva (Fig. 2C).

Os derivados mitocondriais são assimétricos em comprimento e diâmetro. São estruturas longas e, em seções transversais, piriformes (Figs. 1D, E, 2C e D). O derivado mitocondrial maior começa adjacente à endentação do núcleo e à extremidade anterior do adjunto do centríolo, segue paralelo a este e ao axonema e termina depois do derivado mitocondrial menor e antes do início da desorganização do axonema, no final do flagelo (Figs. 1D, E, 2A-GB). O derivado mitocondrial menor começa subjacente à extremidade posterior do adjunto do centríolo, segue paralelo ao axonema e termina antes do derivado mitocondrial maior (Fig. 2C-E). As cristas mitocondriais são perpendiculares ao eixo maior dos derivados mitocondriais e separadas entre si por intervalos constantes (Fig. 1E). Nas seções transversais dos derivados mitocondriais, em suas porções medianas, identificam-se quatro regiões no maior e três no menor: a amorfa eletrondensa (b), proximal ao axonema e em volta das regiões circular de eletrondensidade média e da paracristalina; a circular de eletrondensidade média (a), central; a paracristalina (pc), distal ao axonema; e a de cristas mitocondriais (setas vazias pretas), periféricas à metade distal dos derivados mitocondriais (Fig. 2C e D). A região paracristalina é exclusiva do derivado mitocondrial maior e a única que é E-PTA negativa (Fig. 2D e E).

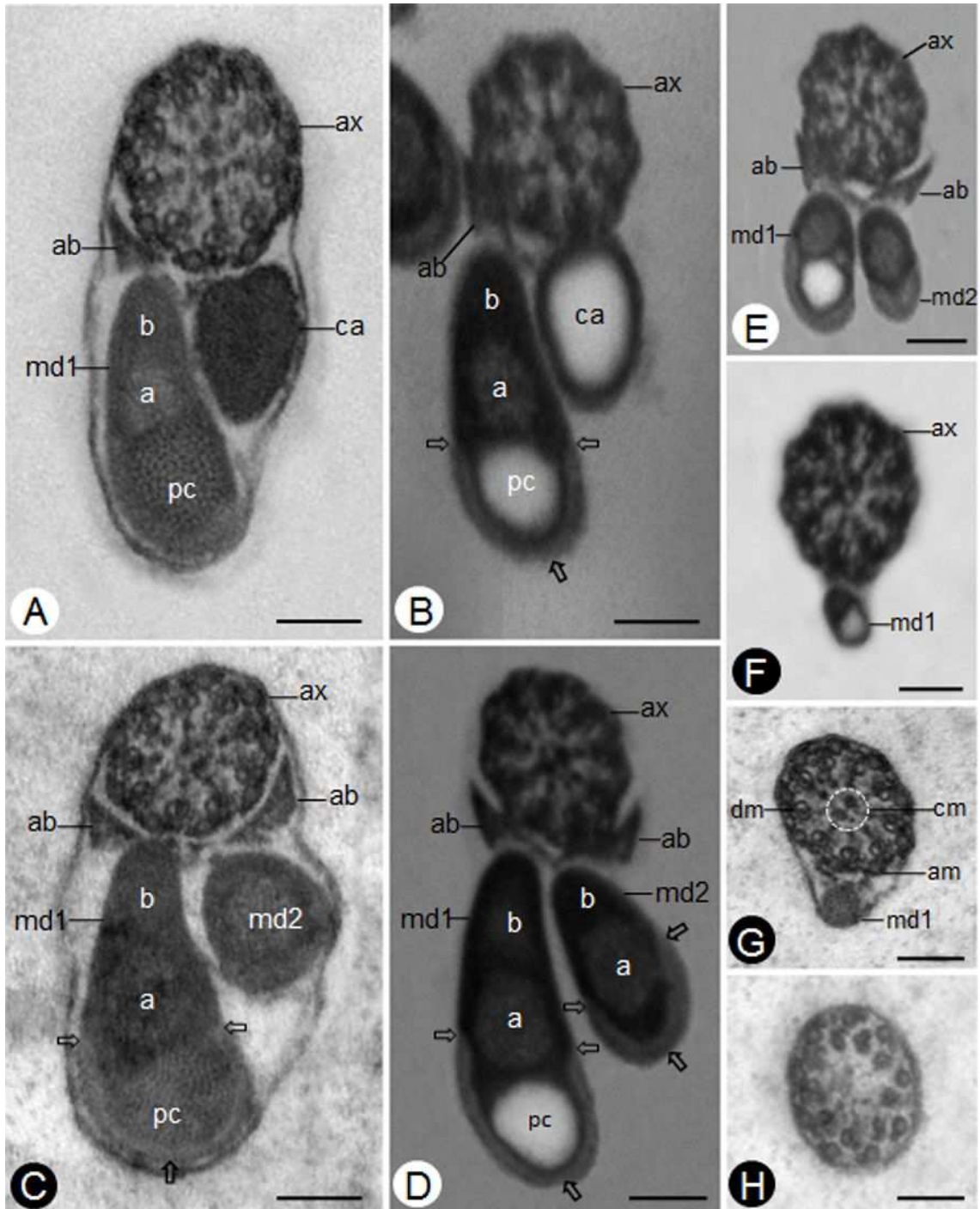
O axonema é o componente mais longo do flagelo, inicia no centríolo, na região anterior do flagelo, e exibe a configuração de 9 + 9 + 2 microtúbulos, sendo nove microtúbulos acessórios simples externos, nove duplas periféricas e um par de microtúbulos central (Fig. 2A-F). O axonema é gradualmente desorganizado na porção final do flagelo, onde inicialmente são perdidos os microtúbulos centrais, seguidos pelos das duplas e, por fim, pelos os acessórios (Fig. 2G). O axonema é totalmene E-PTA positivo (Fig. 2C-E).

Os corpos acessórios são estruturas longas e eletrondensas. Os locais de início e término dessas duas estruturas no flagelo são diferentes. O maior começa ao nível do centríolo e termina imediatamente antes do término do derivado mitocondrial maior, enquanto o menor começa somente após o término do adjunto do centríolo, junto com o início do derivado mitocondrial menor, e termina imediatamente antes do término deste (Fig. 2A-G). Em cortes transversais, exibe formato triangular e vê-se que são localizados entre os derivados mitocondriais e o axonema, mas não entre o axonema e o adjunto do centríolo (Fig. 2B e D). Os corpos acessórios são E-PTA positivos (Fig. 2C e D).

**Figura 1.** Micrografia de luz (A e B) e eletrônica de transmissão (C–M) do espermatozoide de *E. picta*. (A) Contraste de fase. A seta branca indica o limite entre cabeça (h) e flagelo (f). (B) Epifluorescência de núcleo (n) corado com DAPI. (C) Seção longitudinal da região da cabeça, mostrando o acrossomo com a vesícula acrossomal (av) e o *perforatorium* (p). Observe a extremidade posterior do *perforatorium* inserida na cavidade da região anterior do núcleo (n). (D-E) Seções longitudinais da região de transição cabeça-flagelo, mostrando o núcleo, o adjunto do centríolo (ca), o derivado mitocondrial maior (md1) e suas cristas mitocondriais (setas vazias pretas), o centríolo (c) e o axonema (ax). (F-I) Seções transversais da região da cabeça. (F) Região do acrossomo, mostrando a vesícula acrossomal, o *perforatorium* e a camada eletrólucida que separa estas duas estruturas, vista como dois pontos brancos entre estas. (G) Limite entre o fim da vesícula acrossomal e o início do núcleo, mostrando o *perforatorium* inserido na extremidade anterior do núcleo. (H-I) Núcleos eletrondensos e com cromatina compacta. (J-M) Seções transversais da região de transição cabeça-flagelo, mostrando o núcleo, o derivado mitocondrial maior, o adjunto do centríolo e o centríolo. (E, G, I e M) Tratamento com a metodologia do E-PTA. Note que o *perforatorium*, o núcleo, o adjunto do centríolo e a região paracristalina (pc) do derivado mitocondrial maior são E-PTA negativos. Barras de escala: (A)= 20  $\mu\text{m}$ ; (B)= 10  $\mu\text{m}$ ; (C-E)= 0,5  $\mu\text{m}$ ; (F-M)= 0,1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Micrografia eletrônica de transmissão do espermatozoide de *E. picta*. (A e B) Início do flagelo imediatamente abaixo do centríolo, mostrando o axonema (ax), um corpo acessório (ab), o derivado mitocondrial maior (md1) e o adjunto do centríolo (ca). (C e D) Região mediana do flagelo, mostrando o axonema, os dois corpos acessórios, o derivado mitocondrial maior e o derivado mitocondrial menor (md2). Note que a região de material paracristalino (pc) só existe no derivado mitocondrial maior, enquanto as regiões amorfa eletrondensa (b), circular de eletrondensidade média (a) e de cristas mitocondriais (setas vazias pretas) têm nos dois derivados mitocondriais. (E-H) Regiões do fim do flagelo. Note que o derivado mitocondrial menor finaliza antes do derivado mitocondrial maior e que os microtúbulos centrais são os primeiros a finalizarem na desorganização do axonema. (B, D-F) Tratamento com a metodologia do E-PTA. Note que o adjunto do centríolo e a região paracristalina do derivado mitocondrial maior são E-PTA negativos, enquanto o axonema, os corpos acessórios e as outras três regiões dos derivados mitocondriais são E-PTA positivos. Barras de escala: (A-H)= 0,1  $\mu\text{m}$ .



#### 4. Discussão

Os espermatozoides em Hymenoptera variam no tamanho, na morfologia e ultraestrutura. A variação no tamanho pode ser no comprimento total, do núcleo e do flagelo. Morfologicamente eles podem ser lineares ou espiralados. Ultraestruturalmente eles podem variar na forma, tamanho e localização de seus componentes. Os espermatozoides de *Epicharis picta* com 250  $\mu\text{m}$  de comprimento estão dentro do intervalo encontrado em outras abelhas, que varia de 80  $\mu\text{m}$  em *Scaptotrigona xanthotricha* (ARAÚJO *et al.*, 2005) a 1.500  $\mu\text{m}$  em *Euglossa mandibularis* (ZAMA *et al.*, 2005a). Em “Symphyta”, o tamanho varia de 20 a 161  $\mu\text{m}$  (QUICKE *et al.*, 1992; MOREIRA *et al.*, 2011), em vespas Parasitica de 8 a 620  $\mu\text{m}$  (QUICKE *et al.*, 1992; LINO-NETO *et al.*, 1999) e em Aculeata de 13 a 1.500  $\mu\text{m}$  (QUICKE *et al.*, 1992; ZAMA *et al.*, 2005a). O tamanho dos espermatozoides pode ser usado em taxonomia uma vez que varia mesmo entre espécies proximamente relacionadas.

O acrossomo é uma estrutura presente nos espermatozoides de praticamente todos os Hymenoptera estudados. A organização do acrossomo em uma vesícula acrossomal e um *perforatorium*, como o de *E. picta*, é uma característica sinapomórfica para todos os Apoidea e quase a totalidade dos Hymenoptera. Ocorre em “Symphyta” (QUICKE *et al.*, 1992; LINO-NETO *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2011), em vespas Parasitica (LINO-NETO *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2010), em formigas (LINO-NETO; DOLDER, 2002; MOYA *et al.*, 2007), em vespas não Parasitica (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007; MANCINI *et al.*, 2006, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009) e em abelhas (ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004, ARAÚJO *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). O acrossomo da maioria das vespas Parasitica tem uma camada extracelular, que cobre parte ou toda a vesícula acrossomal e parte do núcleo (QUICKE *et al.*, 1992; NEWMAN; QUICKE, 1998, 1999; LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a; LINO-NETO; DOLDER, 2001a; BRITO *et al.*, 2009; FIORILLO *et al.*, 2008). Entretanto, na vespa Parasitica *Telenomus podisi* (Scelionidae) não foi observado o acrossomo (LINO-NETO; DOLDER, 2001b).

Embora a estrutura básica do acrossomo seja a mesma em Hymenoptera, existem diferenças em detalhes de sua morfologia entre os grupos dessa ordem. Em abelhas, incluindo *E. picta*, a vesícula acrossomal é

cônica longitudinalmente (ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). Em *Apis mellifera*, o acrossomo é muito longo e a extremidade anterior da vesícula acrossomal é bastante pontiaguda (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 1970; LENSKY *et al.*, 1979; PENG *et al.*, 1992, 1993). Nas seções transversais do acrossomo de *E. picta* e de algumas outras abelhas, o *perforatorium* é circular e a vesícula acrossomal é circular na porção anterior e oval à medida que se aproxima do núcleo (BÁO *et al.*, 2004; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). Já em Meliponini e Tapinoaspidini, a vesícula acrossomal é circular na porção anterior e à medida que se aproxima do núcleo é triangular (ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005). Em *A. mellifera*, tanto a vesícula acrossomal quanto o *perforatorium* são elipsoidais ao longo de todo o seu comprimento (HOAGE; KESSEL, 1968; CRUZ-HÖFLING *et al.*, 1970; LENSKY *et al.*, 1979; PENG *et al.*, 1992, 1993).

Semelhante ao observado na maioria das abelhas estudadas, em *E. picta*, na região de transição acrossomo-núcleo, a vesícula acrossomal e o núcleo são assimétricos e complementares (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 1970; LENSKY *et al.*, 1979; PENG *et al.*, 1992, 1993; ZAMA *et al.*, 2005a; FIORILLO *et al.*, 2009), com exceção em Meliponini, onde estas estruturas são simétricas (ZAMA *et al.*, 2001, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005). No acrossomo de *E. picta*, em Bombini (ZAMA, 2003), em Euglossini (ZAMA *et al.*, 2005a) e no Sphecidae *Sceliphron fistularium* (ZAMA *et al.*, 2005a), o *perforatorium* é E-PTA negativo e a vesícula acrossomal é E-PTA positiva, enquanto em Meliponini tanto a vesícula acrossomal quanto o *perforatorium* são E-PTA negativos (ZAMA *et al.*, 2004). Em *Microstigmus* (Crabronidae) e em vespas Parasitica, o acrossomo varia de E-PTA negativo a levemente positivo (LINO-NETO *et al.*, 1999; ZAMA *et al.*, 2007).

A cavidade na extremidade anterior do núcleo onde a extremidade posterior do *perforatorium* fica inserida e a projeção na extremidade posterior do núcleo ocorre em praticamente todos os Hymenoptera (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 1970; LENSKY *et al.*, 1979; PENG *et al.*, 1992, 1993; LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). No entanto, a

profundidade dessa cavidade varia. É rasa em *E. picta* e na maioria das abelhas: *A. mellifera* (PENG *et al.*, 1992, 1993), Exomalopsis e Paratetrapedia (BÁO *et al.*, 2004) e Meliponini (ZAMA *et al.*, 2001, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005), enquanto em Euglossini (ZAMA *et al.*, 2005) e Xylocopini (FIORILLO *et al.*, 2009) é mais profunda. Em *E. picta* e nos também Apidae *A. mellifera* (LINO-NETO *et al.*, 2000b) e *Xylocopa frontalis* (FIORILLO *et al.*, 2009) a projeção da parte posterior do núcleo é alinhada e inserida no centríolo, enquanto nos demais Apidae estudados é alinhada e justaposta ao centríolo (ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; GRACIELLE *et al.*, 2009). Em *E. picta*, diferentemente dos também Apidae Bombini, Euglossini e Meliponini, o núcleo é totalmente E-PTA negativo, enquanto nestes ele apresenta, nas seções transversais, uma porção em forma de lua crescente, que é E-PTA positiva (ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a). Já em vespas dos gêneros *Sceliphron* e *Microstigmus* (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007) e em várias espécies de vespas Parasitica (LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a; FIORILLO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2009), os núcleos também são totalmente E-PTA negativos.

O adjunto do centríolo é uma estrutura presente nos espermatozoides de praticamente todos os Hymenoptera estudados, com exceção das vespas do gênero *Trichogramma* (Scelionidae) (LINO-NETO; DOLDER, 2001b). O de *E. picta* é semelhante ao da maioria das outras abelhas. Nessas abelhas essa estrutura tem formato de um bastão eletrondenso nas seções longitudinais e triangular nas seções transversais (ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.* 2009), diferente do de *A. mellifera*, que é cônico nas seções longitudinais e nas seções transversais é inicialmente circular e posteriormente assume o formato triangular (LINO-NETO *et al.*, 2000b). Em *E. picta* e nas demais abelhas estudadas, o adjunto do centríolo começa adjacente à região posterior do núcleo, estende-se paralelamente às regiões anteriores do axonema e do derivado mitocondrial maior e termina sobre a extremidade anterior do derivado mitocondrial menor (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). Essa característica é sinapomórfica para as abelhas. Tal como em Meliponini (ZAMA *et al.*,

2004) e Euglossini (ZAMA *et al.*, 2005a), o adjunto do centríolo de *E. picta* é predominantemente E-PTA negativo, com somente a superfície E-PTA positiva. Já em *A. mellifera* (LINO-NETO *et al.*, 2000b) e Bombini (ZAMA, 2003), essa estrutura é E-PTA positiva. Em vespas dos gêneros *Sceliphron* e *Microstigmus*, essa estrutura é E-PTA negativa também (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007). Assim como em Aculeata, em vespas Parasitica o adjunto do centríolo é E-PTA positivo em algumas espécies (FIORILLO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2009) e E-PTA negativo em outras (LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a).

Derivados mitocondriais assimétricos em tamanho e diâmetro, com o maior iniciando paralelamente à projeção posterior do núcleo e o menor subjacente ao adjunto do centríolo, como em *E. picta*, são características sinapomórficas para abelhas (QUICKE *et al.*, 1992; LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). Nas seções transversais dos derivados mitocondriais das abelhas distinguem-se quatro regiões no maior e três no menor. No entanto, o tamanho e a localização dessas regiões variam. A região clara circular e a de cristas mitocondriais têm o tamanho e a localização semelhantes na maioria das abelhas, com exceção de *A. mellifera* (LINO-NETO *et al.*, 2000b). A região amorfa eletrondensa e a paracristalina, salvo as diferenças de tamanho, também são semelhantes entre as abelhas (ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). Em todas as abelhas estudadas, a região paracristalina só existe no derivado mitocondrial maior, portanto é considerada uma característica sinapomórfica para Apidae. Em *E. picta*, completamente diferente do observado em Meliponini e *Sceliphron*, somente a região paracristalina do derivado mitocondrial é E-PTA negativa, enquanto nestes essa região é a única E-PTA positiva (ZAMA *et al.*, 2004, 2005a). Em *A. mellifera*, Bombini e Euglossini, somente a região amorfa eletrondensa proximal ao axonema é E-PTA positiva (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2005a). Em *Microstigmus*, somente a região de cristas mitocondriais é E-PTA positiva (ZAMA *et al.*, 2007). Já em vespas Parasitica, os derivados mitocondriais são levemente E-PTA positivos (LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a).

O padrão 9 + 9 + 2 microtúbulos do axonema é conservado em Hymenoptera (BACCETTI, 1972; JAMIESON *et al.*, 1999). De todos os Hymenoptera estudados até agora, inequivocamente, somente em formigas do gênero *Pseudomyrmex* foi descrito padrão axonemal diferente, onde são observados 9 + 9 + 1 microtúbulos (MOYA *et al.*, 2007). A sequência de desorganização desses microtúbulos na porção final do flagelo varia entre grupos da ordem. Em *E. picta* e na maioria dos Aculeata, o par central de microtúbulos e os microtúbulos das nove duplas terminam antes que os microtúbulos acessórios (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a, b, 2007; BÁO *et al.*, 2004 ; ARAÚJO *et al.*, 2005, 2009; BADKE *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2008, MANCINI *et al.*, 2006, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em formigas todos os microtúbulos terminam praticamente juntos (WHEELER *et al.*, 1990; LINO-NETO; DOLDER, 2002; MOYA *et al.*, 2007). Já em vespas Parasitica, os microtúbulos acessórios terminam primeiro que os demais microtúbulos (LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a; LINO-NETO; DOLDER, 2001b; FIORILLO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2010).

O padrão de marcação E-PTA dos microtúbulos axonemais de *E. picta* é diferente de todos os Apoidea já estudados. Nesta abelha, todos os microtúbulos são E-PTA positivos, enquanto nas demais somente os microtúbulos acessórios são E-PTA positivos, com exceção de Bombini, que além desses tem os centrais também E-PTA positivos (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a). Em *E. picta*, como descrito em Bombini e Euglossini, o material intertubular é E-PTA positivo, enquanto em *A. mellifera* e Meliponini é E-PTA negativo (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a). Em vespas *Microstigmus* todos os microtúbulos são E-PTA negativos e o material intertubular positivo, enquanto na vespa *Sceliphron fistularium* o padrão é o mesmo das abelhas *A. mellifera* e Meliponini (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007). Em vespas Parasitica dos gêneros *Bephratelloides* e *Pegoscapus*, semelhante do observado em *E. picta* e em Bombini, todos os microtúbulos do axonema são E-PTA-positivos (LINO-NETO *et al.*, 1999; FIORILLO *et al.*, 2008), enquanto em vespas do gênero *Trichogramma* todos são E-PTA-negativos, mas o axonema é coberto por um material E-PTA positivo (LINO-NETO *et al.*, 2000a).

Os corpos acessórios estão presentes em “Symphyta” e em Aculeata e ausentes na maioria das vespas Parasítica, com exceção de *Bephratelloides pomorum* (LINO-NETO *et al.*, 1999). Em *E. picta* e nos demais Hymenoptera que têm essas estruturas, elas apresentam o mesmo formato e a mesma localização no flagelo dos espermatozoides. Em *E. picta*, *A. mellifera* e Bombini eles são E-PTA positivos (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003), enquanto em Euglossini e Meliponini são E-PTA-negativos (ZAMA *et al.*, 2004, 2005a). Em *Microstigmus* eles são E-PTA negativos enquanto, em *Sceliphron fistularium* são levemente positivos (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007).

Como descrito, os espermatozoides de *E. picta* têm muitas características em comum com as das demais abelhas já estudadas, assim como algumas que distinguem esta espécie das demais, como reação à metodologia do E-PTA dos: 1) derivados mitocondriais; 2) núcleo; 3) microtúbulos e material intertubular do axonema. Esses estudos demonstram a diversidade de características que essa célula pode fornecer e a importância dessas informações como ferramentas para estudos de sistemática dos Hymenoptera.

### Referências bibliográficas

- ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 137-141, 2005.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron*, v. 40, p. 719-723, 2009.
- BACCETTI, B. Insect sperm cell. *Adv. Insect. Physiol.*, v. 9, p. 315-397, 1972.
- BADKE, J. P.; BANIN, T. M.; SCORZA, L. C. T.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructure of Spermatozoa in *Partamona helleri* Friese (1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 64-65, 2005.
- BÁO, S. N.; GONÇALVES SIMÕES, D.; LINO-NETO, J. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia) sp.* Michener and Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 36, p. 23-28, 2004.
- BRITO, P.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus sp.* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 175-176, 2005.

- BRITO, P.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue Cell*, v. 41, p. 113-117, 2009.
- BUCHMANN, S. L. The ecology of oil flowers and their bees. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 18, p. 343-69, 1987.
- CRUZ-HÖFLING, M.A.; CRUZ-LANDIM, C.; KITAJIMA, E. W. The fine structure of spermatozoa from the honey bee. *An. Acad. Brasl. Cienc.*, v. 42, p. 69-78, 1970.
- FIORILLO, B. S.; COELHO, A. M.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 37, p. 75-81, 2005.
- FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscopus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron*, v. 39, p. 1271-1280, 2008.
- FIORILLO, B. S.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). *Acta Zool.*, v. 89, p. 1463-1470, 2009.
- GAGLIANONE, M. C. Abelhas da tribo Centridini na Estação Ecológica de Jataí (Luiz Antônio, SP): composição de espécies e interações com flores de Malpighiaceae. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANDOS, I. (Ed.). *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESCO, Brasil, 2003. p. 279-284.
- GAGLIANONE, M. C. Nesting biology, seasonality and flower hosts of *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Centridini), with a comparative analysis for the genus. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 40, p. 191-200, 2005.
- GRACIELLE, I. M. S.; FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron*, v. 40, p. 719-723, 2009.
- GRISWOLD, T.; HANSON, P. E.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Las abejas. Hymenoptera del Neotrópico. In: HANSON, P. E.; GAULD, I. D. (Ed.). *Memoirs of the American Entomological Institute*, v. 77, p. 734-785, 2006.
- HANSON, P. E.; MENKE, A. S. Las avispa apoideas: Ampulicidae, Specidae, Crabronidae. Hymenoptera del Neotrópico. In: HANSON, P. E.; GAULD, I. D. (Ed.). *Memoirs of the American Entomological Institute*, v. 77, p. 694-733, 2006.
- HILLER, B.; WITTMANN, D. Seasonality, nesting biology and mating behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii*. *Biociências*, v. 2, p. 107-124, 1994.
- HOAGE, T. R.; KESSEL, R. G. An electron microscopical study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee with special reference to replication and elimination. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 24, p. 6-32, 1968.
- INOUYE, B. D. Use of the olfactory cues for individual nest hole recognition by the solitary bee *Epicharis metatarsalis* (Apidae: Anthophorinae). *J. Insect Behav.*, v. 13, p. 231-238, 2000.

- JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, 1999. 555 p.
- LENSKY, Y. E.; BEN-DAVID, E.; SCHINDLER, H. Ultrastructure of the spermatozoa of the mature drone bee. *J. Apic. Res.*, v. 18, p. 264-271, 1979.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolini* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.*, v. 82, p. 159-164, 2001a.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Structural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scrip.*, v. 30, p. 89-96, 2001b.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell*, v. 34, p. 124-128, 2002.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Euritomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, v. 28, p. 253-259, 1999.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatma and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81, 205-211, 2000a.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, v. 32, p. 322-327, 2000b.
- LINO-NETO, J.; ARAÚJO, V. A.; DOLDER, H. Inviability of the Spermatids with Little Cytoplasm in Bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology*, v. 51, p. 163-172, 2008.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of *Agelaisia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insect. Soc.*, v. 53, p. 333-338, 2006.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H.; DALLAI, R. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arth. Struct. Dev.*, v. 38, p. 54-59, 2009.
- MELO, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers of the Natural History Museum of the University of Kansas*, v. 14, p. 1-55, 1999.
- MELO, G. A. R.; GONÇALVES, R. B. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Rev. Bras. Zool.*, v. 22, p. 153-159, 2005.
- MICHENER, C. D. *The bees of the world*. 2 ed., Baltimore: The John Hopkins University Press, 2007. 953 p.

- MOREIRA, J.; ARAÚJO, V. A.; BÃO, S. N.; LINO-NETO, J. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron*, v. 41, p. 187-192, 2010.
- MOREIRA, J.; ARAÚJO, V. A.; LINO-NETO, J. Morphological aspects of tests and sperm ultrastructure in the “Symphyta” digelasimus diversipes Kirby, 1882 (Hymenoptera: Argidae: Dielocerinae). *Microsc. Res. Techniq. J.*, 2011 (no prelo).
- MOYA, J.; MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; DELABIE, J.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus Pseudomyrmex (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.*, v. 88, p. 181-187, 2007.
- MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Org.). *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region*. Curitiba, Brasil: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007. 1058 p.
- NEWMAN, T. M.; QUICKE, D. L. J. Sperm development in the imaginal testes of Aleiodes coxalis (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *J. Hym. Res.*, v. 7, p. 25-37, 1998.
- NEWMAN, T. M.; QUICKE, D. L. J. Ultrastructure of spermatozoa in Leptopilina (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.*, v. 8, p. 197-203, 1999.
- OLIVEIRA, C. M.; MANCINI, K.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Sperm morphology of the Prorops nasuta (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae). *Tissue Cell*, v. 42, p. 242-246, 2010.
- PENG, C. Y. S.; YIN, C. M.; YIN, L. R. S. Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.*, v. 17, p. 269-276, 1992.
- PENG, C. Y. S.; YIN, C. M.; YIN, L. R. S. Ultrastructure of honey bee, Apis mellifera, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.*, v. 18, p. 93-101, 1993.
- QUICKE, D. L. J.; INGRAM, S. N.; BAILLIE, H. S.; GAITENS, P. V. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scrip.*, v. 21, p. 381-402, 1992.
- ROCHA FILHO, L. C.; DA SILVA, C. L.; GAGLIANONE, M. C.; AUGUSTO, S. C. Nesting behavior of Epicharis (Epicharis) bicolor Smith 1854 (Hymenoptera Apidae). *Trop. Zool.*, v. 21, p. 227-242, 2008.
- ROUBIK, D.; MICHENER, C. D. The seasonal cycle and nests of Epicharis zonata a bee whose cells are below the wet-season water table (Hymenoptera, Anthophoridae). *Biotropica*, v. 12, p. 56-60, 1980.
- SIGRIST, M. R.; SAZIMA, M. Pollination and reproductive biology of twelve species of Neotropical Malpighiaceae: Stigma morphology and its implications for the breeding system. *Ann. Bot.*, v. 94, p. 33-41, 2004.
- THIELE, R.; INOUE, B. Nesting biology, seasonality and mating behavior of Epicharis metatarsalis (Hymenoptera: Apidae) in Northeastern Costa Rica. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 100, p. 596-602, 2007.

- WHEELER, D. E.; CRICHTON, E. G.; KRUTZSCH, P. H. Comparative Ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.*, v. 206, p. 343-350, 1990.
- ZAMA, U. *Estudo estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com considerações filogenéticas*. Ph. D. thesis, State University of Campinas, 2003.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.*, v. 10, p. 261-270, 2001.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell*, v. 36, p. 29-41, 2004.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; MELO, S. M.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H. Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.*, v. 52, p. 122-131, 2005a.
- ZAMA, U.; BRITO, P.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H.; BÁO, S. N. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 37, p. 313-321, 2005b.
- ZAMA, U.; MOREIRA, J.; BÁO, S. N.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera, Apoidea, Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arth. Struct. Dev.*, v. 36, p. 304-316, 2007.

## Ultraestrutura e citoquímica dos espermatozoides polimórficos de três espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae)

### Resumo

Este trabalho descreve a segunda ocorrência de polimorfismo espermático em Hymenoptera. *Trypoxylon aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* produzem dois tipos de espermatozoides que diferem nos comprimentos totais, dos flagelos e dos núcleos. Os espermatozoides de núcleos mais curtos e mais espessos são denominados tipo 1 e os de núcleos mais longos e menos espessos, tipo 2. Eles são filiformes, espiralados e apresentam duas regiões facilmente distinguíveis, a cabeça e o flagelo. A cabeça é formada pelo acrossomo e pelo núcleo. O acrossomo é formado pela vesícula acrossomal e pelo *perforatorium*, cuja extremidade posterior é inserida em uma cavidade rasa e simétrica na região anterior do núcleo. O núcleo é eletrondenso, compacto, com o terço posterior bastante delgado e a extremidade levemente curvada e sobrejacente ao início do axonema. A cabeça e o flagelo são conectados pelo adjunto do centríolo compacto e eletrondenso. O flagelo é formado por um axonema de padrão 9 + 9 + 2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais assimétricos em comprimento e diâmetro e com uma região paracristalina exclusiva do derivado mitocondrial maior e dois corpos acessórios. O axonema se desorganiza na porção final do flagelo, onde inicialmente terminam os microtúbulos centrais, seguidos pelos das duplas e por fim os acessórios. Os corpos acessórios são alongados, eletrondensos e, em seções transversais, se apresentam triangulares e localizados entre os derivados mitocondriais e o axonema. Pela metodologia do E-PTA, somente os corpos acessórios, a região circular de eletrondensidade média (central) dos derivados mitocondriais e o material intertubular do axonema são E-PTA positivos. Cada cisto testicular tem até 32 espermatozoides e, no mesmo cisto, são encontrados tanto os espermatozoides tipo 1 quanto o tipo 2 em proporções aproximadas de 1:2, respectivamente.

**Palavras-chave:** vespas; polimorfismo espermático; cisto testicular.

Destaques da pesquisa:

- ▶ Morfologia dos espermatozoides polimórficos de *Trypoxylon*.
- ▶ Características morfológicas dos espermatozoides são promissoras para estudos de sistemática.
- ▶ Polimorfismo espermático e estratégia reprodutiva.

## 1. Introdução

Crabronidae é uma das maiores famílias de Apoidea, com mais de 9.000 espécies descritas. Crabroninae é a maior subfamília de Crabronidae, com aproximadamente 3.400 espécies descritas em todo o mundo, das quais 910 são encontradas na Região Neotropical (AMARANTE, 2005). Trypoxylini é a segunda maior tribo de Crabroninae e contém cinco gêneros, *Aulacophilus*, *Pison*, *Pisonopsis*, *Pisoxylon* e *Trypoxyton*, todos têm espécies que ocorrem na Região Neotropical (Amarante, 2005). O gênero *Trypoxyton* Latreille, 1796, segundo maior de Crabronidae, é dividido nos subgêneros *Trypoxyton* e *Trypargilum*. Tem mais de 660 espécies descritas em todo o mundo, 165 conhecidas para a Região Neotropical (AMARANTE, 2005). O subgênero *Trypoxyton* ocorre em todo o mundo, enquanto o *Trypargilum* é restrito ao Novo Mundo e possui 96 espécies descritas, sendo 86 Neotropicais e 64 ocorrem apenas na América do Sul (RICHARDS, 1934; BOHART; MENKE, 1976, AMARANTE, 1991, 1995). A maioria das espécies de *Trypoxyton* é solitária e a fêmea constrói e aprovisiona seu próprio ninho com aranhas. Algumas espécies constroem ninhos de barro, outras utilizam cavidades tubulares preexistentes, dividindo-as em uma série linear de células, com partições de barro. Em *Trypoxyton* (*Trypargilum*), os machos se acasalam com as fêmeas durante a construção e o aprovisionamento do ninho, guardando-o até que seja concluído (COVILLE, 1982; AMARANTE, 1991).

Polimorfismo espermático é conhecido em várias ordens de insetos como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Heteroptera, Hymenoptera e Lepidoptera (JAMIESON *et al.*, 1999; PRESGRAVES *et al.*, 1999; SWALLOW; WILKINSON, 2002; CHAWANJI *et al.*, 2005; SASAKAWA, 2009). Nos insetos, os espermatozoides podem variar em comprimento, como em Diptera e Hymenoptera; em morfologia, como em Hemiptera e Hymenoptera; em morfologia e função, como em Lepidoptera; ou em número de cromossomos, como em Coleoptera (HEALY; JAMIESON, 1981; JAMIESON, 1987; JAMIESON *et al.*, 1999; PRESGRAVES *et al.*, 1999; SWALLOW; WILKINSON, 2002; CHAWANJI *et al.*, 2005; SASAKAWA, 2009). Geralmente, nos casos de polimorfismo espermático, somente um dos tipos de espermatozoide é capaz de fertilizar os ovócitos (BIRKHEAD; MOLLER, 1998; SIMMONS, 2001).

A função do polimorfismo espermático ainda é desconhecida e as explicações apresentadas são meras hipóteses. Em Lepidoptera, a hipótese mais aceita para a produção dos dois tipos de espermatozoides, eupirene (com núcleo) e apirene (sem núcleo), é a de que os apirenes estão envolvidos na competição espermática (SILBERGLIED *et al.*, 1984; COOK; WEDELL, 1996, 1999). Em espécies de *Drosophila* que produzem espermatozoides de tamanhos diferentes, as fêmeas armazenam em suas espermatecas preferencialmente os espermatozoides maiores (BRESSAC; HAUSCHTECK-JUNGEN, 1996) e em *D. Obscura* foi observado que apenas os espermatozoides maiores fertilizam os ovos (SNOOK; KARR, 1998).

Até agora, polimorfismo espermático em Hymenoptera só havia sido observado no Chalcidoidea *Dahlbominus fuscipennis* (LEE; WILKES, 1965). Neste trabalho descrevemos a morfologia dos espermatozoides polimórficos em três espécies de vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*), buscando contribuir para o conhecimento da espermatologia e da biologia reprodutiva deste gênero e dos Hymenoptera em geral.

## **2. Material e métodos**

Machos adultos de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* Shuckard, *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *lactitarse* Saussure e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *rogenhoferi* Kol foram coletados em ninhos-armadilhas instalados no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **2.1. Microscopia de luz**

Para determinação do comprimento total, do flagelo e do núcleo dos espermatozoides, machos adultos de *T. aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* foram dissecados, as vesículas seminais foram retiradas e abertas e os espermatozoides extraídos e espalhados sobre lâminas histológicas. Em seguida, foram fixados com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 20 minutos, lavados em água corrente e secos à temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas e os espermatozoides fotografados em fotomicroscópio Olympus BX-60, equipado com contraste de

fase. Para determinação do tamanho dos núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml, lavadas com água destilada e montadas com sacarose 50%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em fotomicroscópio Olympus BX-60, sob epifluorescência, com filtro de excitação BP360-370 nm. De cada espécie, 100 espermatozoides e 100 núcleos foram medidos utilizando o software Image Pro-Plus (versão 4.5; Media Cybernetics Inc., MD, EUA) e os comprimentos totais, dos flagelos e dos núcleos foram calculados a partir da média do número total de espermatozoides analisados.

## **2.2. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para descrição ultraestrutural dos espermatozoides, machos adultos de *T. aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* foram dissecados e as vesículas seminais fixadas, por 24 horas, em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, o material foi lavado com o mesmo tampão, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas, desidratado em série crescente de acetona e infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss LEO 906), do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

### **2.2.1. Citoquímica ultraestrutural: ácido fosfotúngstico-etanólico (E-PTA)**

Para detecção de proteínas básica ao nível ultraestrutural foi utilizada a técnica do E-PTA. O ácido fosfotúngstico (PTA) em meio alcoólico se liga principalmente a proteínas ricas em lisina, arginina e histidina.

Machos adultos de *E. picta* foram dissecados e as vesículas seminais fixadas, por 24 horas, em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, o material foi lavado com o mesmo tampão, desidratado em série

crescente de etanol e tratado em bloco com solução de E-PTA 2% em etanol absoluto por duas horas, em temperatura ambiente, e então infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante e coletados em telas de cobre. As análises e os registros fotográficos foram feitos em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss LEO 906), do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

### 3. Resultados

Em *Trypoxylon aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* foram encontrados dois tipos de espermatozoides que diferem nos comprimentos totais, dos flagelos e dos núcleos. Nessas três espécies, os espermatozoides maiores são denominados tipo 1 e os menores, tipo 2. Nos do tipo 1, os núcleos são mais curtos e mais espessos e nos do tipo 2, mais longos e menos espessos. Os valores do comprimento total dos espermatozoides, dos flagelos, dos núcleos e a razão núcleo/flagelo estão apresentados na Tabela 1.

Nas três espécies, tanto os espermatozoides do tipo 1 quanto os do tipo 2 são filiformes e apresentam duas regiões facilmente distinguíveis, a cabeça e o flagelo. Nos do tipo 2, a região da cabeça é bem mais delgada que a região do flagelo e nos do tipo 1, essas duas regiões são praticamente da mesma espessura (Fig. 1A-D).

O comprimento total dos espermatozoides do tipo 2 é muito semelhante nas três espécies, assim como o comprimento dos flagelos, dos núcleos e a razão núcleo/flagelo das espécies *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi*, mas esses valores são bastante diferentes em *T. aurifrons*, em que o flagelo é mais longo e o núcleo é mais curto do que os das outras duas espécies. Já em relação aos espermatozoides do tipo 1, essas diferenças são maiores nas três espécies, e como nos do tipo 2, maior em *T. aurifrons* do que nas outras duas espécies (Tabela 1).

Ambos os tipos de espermatozoides são espiralados, contudo, nos do tipo 1 o espiralamento é mais evidente que nos do tipo 2, possivelmente devido à maior proximidade entre as voltas da espiral naqueles do que nestes (Fig. 1I).

**Tabela 1** – Médias dos comprimentos totais, dos flagelos e dos núcleos ( $\mu\text{m}$ ) e razão núcleo/flagelo dos espermatozoides de *Trypoxylon aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi*. Espermatozoides tipo 1- são maiores e de núcleos mais curtos e mais espessos. Espermatozoide tipo 2- são menores e de núcleos mais longos e mais delgados

Espécies	Comprimento Total		Comprimento do Flagelo		Comprimento do Núcleo		Razão Núcleo/Flagelo	
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 1	Tipo 2
<i>T. aurifrons</i>	413	351	386	281	27	70	0,07	0,25
<i>T. lactitarse</i>	392	352	337	206	55	146	0,16	0,71
<i>T. rogenhoferi</i>	405	350	345	207	60	143	0,17	0,69

A região da cabeça é composta pelo acrossomo e pelo núcleo (Fig. 1E-H). A região do flagelo é composta pelo axonema, pelos dois derivados mitocondriais e pelos dois corpos acessórios (Fig. 2A). A região de transição cabeça-flagelo é composta pelo adjunto do centríolo, pela região delgada do terço posterior do núcleo e pelas porções anteriores do axonema e dos dois derivados mitocondriais (Fig. 1J-P). Essa região é diferente nos dois tipos de espermatozoides. Nos do tipo 1, o axonema começa antes dos derivados mitocondriais (Fig. 1N-P), enquanto nos do tipo 2, os derivados mitocondriais começam antes do axonema (Fig. 1M).

O acrossomo é alongado e localizado anterior ao núcleo. Ele é formado pela vesícula acrossomal e pelo *perforatorium* (Fig. 1E-H). A vesícula acrossomal é cônica e envolve o *perforatorium* até a extremidade anterior do núcleo (Fig. 1E). O *perforatorium* é alongado, localizado no centro do acrossomo e tem a extremidade posterior inserida numa curta cavidade simétrica na região anterior do núcleo (Fig. 1E e H). Entre a vesícula acrossomal e o *perforatorium* tem uma região eletrólúcida ampla na porção anterior e reduzida à medida que se aproxima do núcleo (Fig. 1F e G). Nas seções transversais do acrossomo, a vesícula acrossomal é circular na região anterior e oval à medida que se aproxima do núcleo e o *perforatorium* é circular em toda sua extensão (Fig. 1F-H).

Os núcleos dos dois tipos de espermatozoides são espiralados, com cromatina homoganeamente compacta e eletrondensa (Fig. 1I). Eles são alongados e, transversalmente, ovais próximos ao acrossomo e circulares à medida que se afastam deste (Fig. 1I e 3B). A região anterior do núcleo tem

uma cavidade rasa simétrica e a do terço posterior é delgada, com a extremidade levemente curvada e sobrejacente ao axonema (Fig. 1E e J).

O adjunto do centríolo é eletrondenso, alongado, tem uma pequena e estreita projeção na região anterior e uma chanfradura na região posterior (Fig. 1J). Ele é encaixado na região delgada do núcleo, com a projeção anterior se estendendo além dessa região nuclear e a posterior adjacente às extremidades anteriores dos derivados mitocondriais e do axonema (Fig. 1J-P). Aproximadamente dois terços do adjunto do centríolo são adjacentes somente ao núcleo, envolvendo-o parcialmente enquanto o terço posterior é adjacente aos derivados mitocondriais e ao axonema, envolvendo-os parcialmente, como se preenchesse os espaços entre essas estruturas (Fig. 1J-P). Nas seções transversais da região anterior do adjunto do centríolo vê-se que ele é delgado e o núcleo é desenvolvido e à medida que se aproxima do flagelo, o adjunto do centríolo é bem desenvolvido e o núcleo é bastante delgado (Fig. 1K-M).

Os derivados mitocondriais são assimétricos em comprimento e diâmetro, sendo o mais longo também o de maior diâmetro. Eles começam inseridos na extremidade posterior do adjunto do centríolo, se estendem ao longo do axonema e terminam antes do início da desorganização deste (Fig. 1M, O, P, 2A-D). Ambos os derivados mitocondriais são alongados e, em seções transversais, o menor é circular e o maior tem uma constrição mediana que lhe confere o formato do número oito (Fig. 2A). Nas seções transversais dos derivados mitocondriais identificam-se três regiões no menor e quatro no maior: 1) a amorfa eletrondensa (proximal ao axonema), 2) a amorfa de eletrondensidade média (central), 3) a paracristalina (distal ao axonema) e 4) a de cristas mitocondriais (na periferia do terço distal ao axonema) (Fig. 2A). Somente o derivado mitocondrial maior tem a região paracristalina (Fig. 2A).

Os corpos acessórios começam quase simultaneamente após o término do adjunto do centríolo e terminam praticamente juntos com o derivado mitocondrial maior (Fig. 2A e B). Eles são alongados e, transversalmente, triangulares e localizados entre o axonema e os derivados mitocondriais (Fig. 1J, 2A).

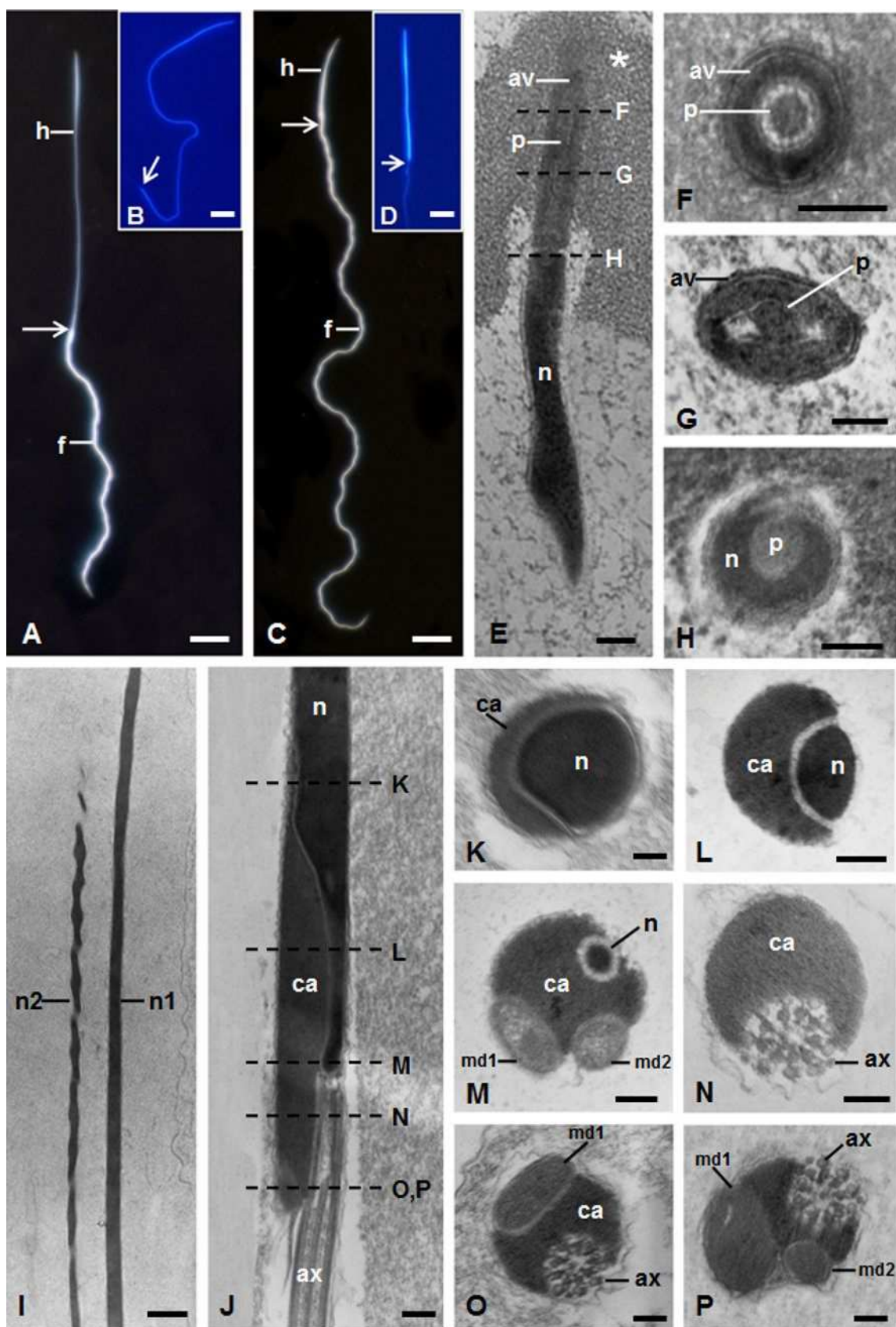
O axonema começa logo abaixo do núcleo e apresenta 9 + 9 + 2 microtúbulos (Fig. 2A). O axonema se desorganiza na porção final do flagelo,

onde inicialmente terminam os microtúbulos centrais, seguidos pelos das duplas e por fim os acessórios (Fig. 2C e D).

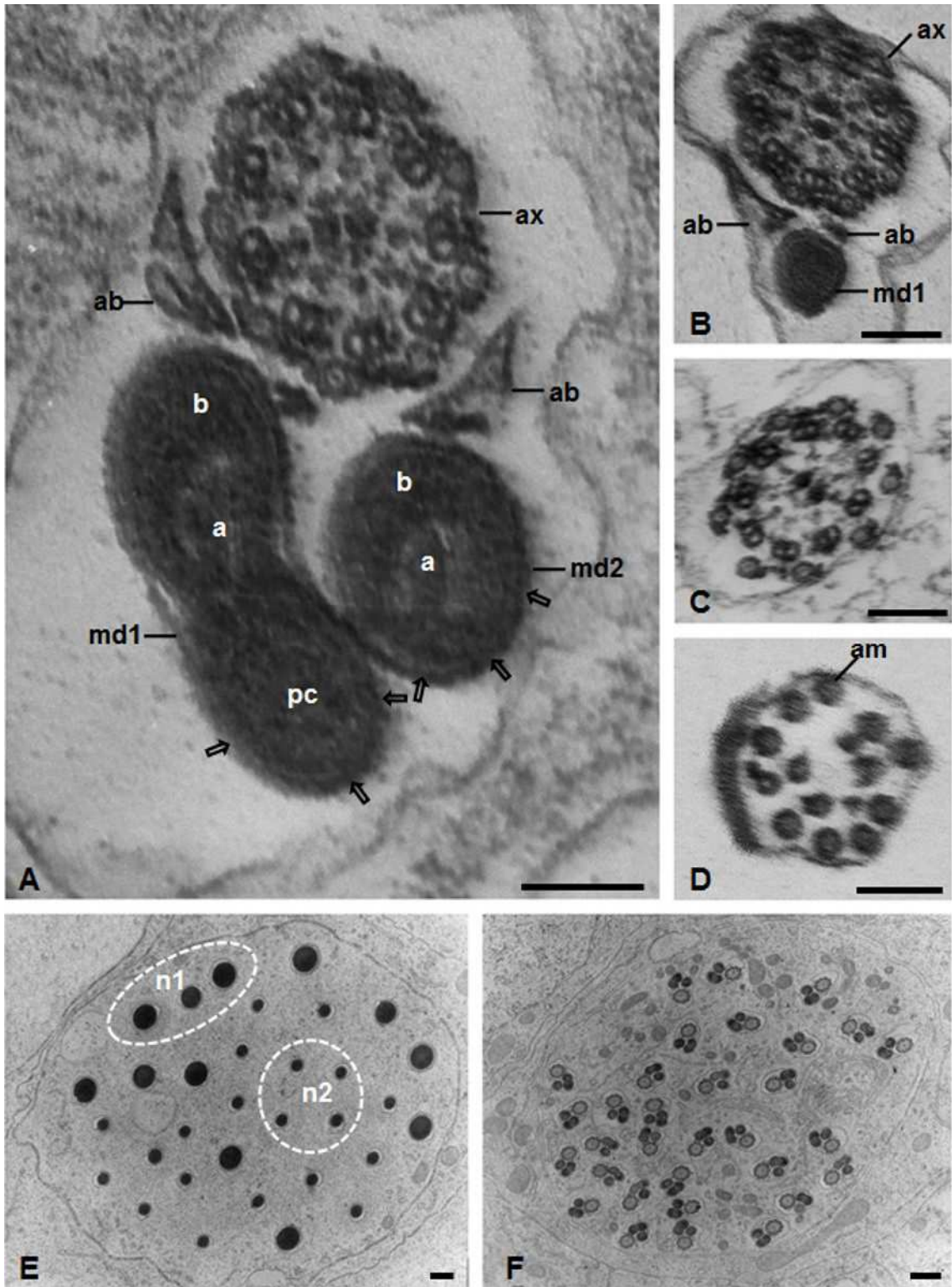
Pela metodologia do E-PTA, os corpos acessórios, a região circular de eletrondensidade média (central) dos derivados mitocondriais e o material intertubular do axonema são E-PTA positivos. O núcleo, a vesícula acrossomal e o adjunto do centríolo são predominantemente E-PTA negativos, com apenas a área periférica de cada uma dessas estruturas E-PTA positivas. Já o *perforatorium*, os microtúbulos do axonema e as demais regiões dos derivados mitocondriais são E-PTA negativos (Fig. 3A-E).

Cada cisto testicular é formado pelas células císticas e até 32 espermatozoides que se mantêm agrupados em feixes até chegarem à vesícula seminal, onde o feixe se desfaz e cada espermatozoide torna-se individualizado. A organização em feixe ou espermatodesmata é mantida por uma matriz extracelular, onde a região da cabeça dos espermatozoides fica inserida (Fig. 1E). Seções transversais dos cistos testiculares na região dos núcleos dos espermatozoides mostram que no mesmo cisto tem tanto espermatozoides do tipo 1 quanto do tipo 2 em proporções aproximadas de 1:2, respectivamente (Fig. 2E e F).

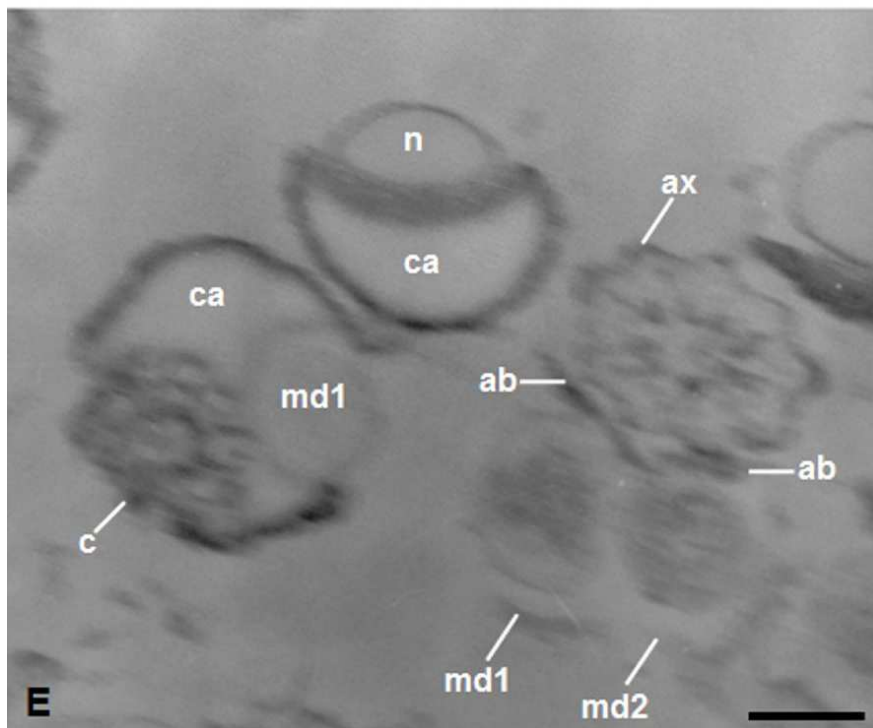
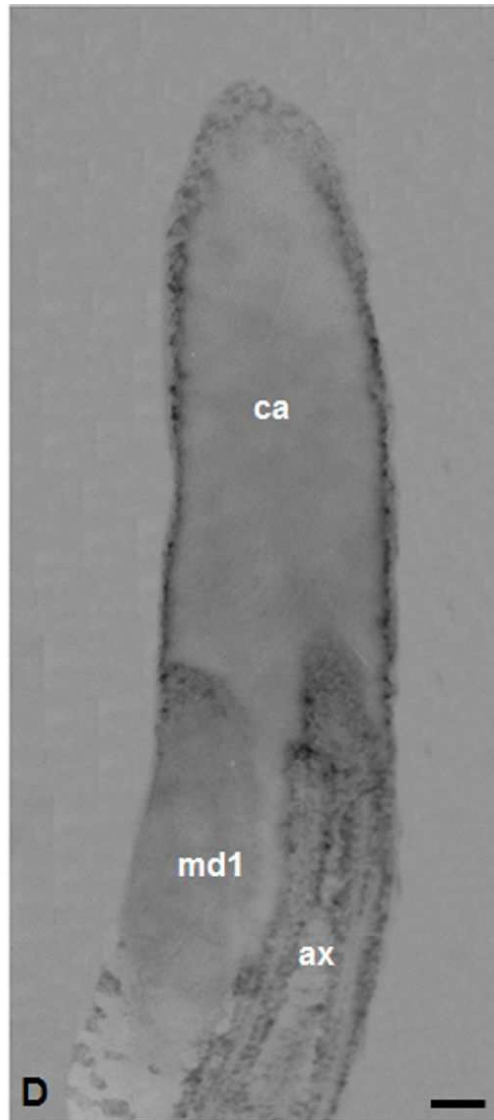
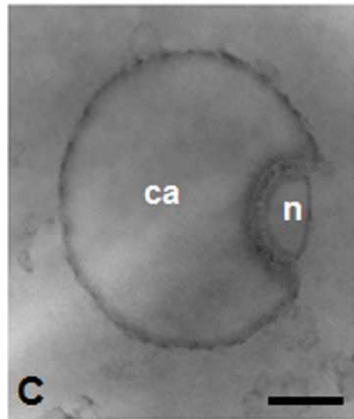
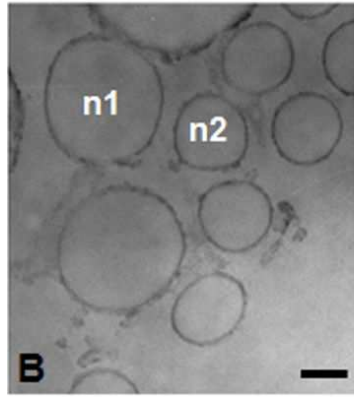
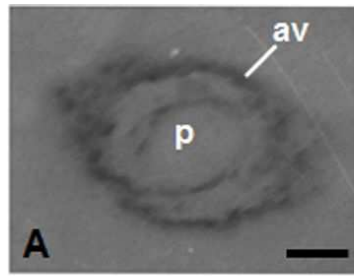
**Figura 1** – Micrografia de luz (A-D) e eletrônica de transmissão (E-P) dos espermatozoides de *Trypoxylon*. (A e C) - contraste de fase e (B e D) - epifluorescência de núcleos (n) corados com DAPI dos espermatozoides de *T. lactitarse*. (A e B) – espermatozoide tipo 2 e (C e D) – espermatozoide tipo 1. A seta branca indica o limite entre cabeça (h) e flagelo (f). (E) - seção longitudinal da região da cabeça mostrando o acrossomo inserido numa matriz extracelular (asterisco). (F-H) - seções transversais em vários níveis a partir da extremidade anterior para a posterior da cabeça, indicadas por linhas pontilhadas em (E). (F) - região do acrossomo onde a vesícula acrossomal (av) e o *perforatorium* (p) exibem formato circulares e, a camada eletrólucida interposta a essas duas estruturas, vista como uma área clara. (G) – região mediana do acrossomo onde a vesícula acrossomal exhibe formato elipsoidal. (H) - limite entre o fim da vesícula acrossomal e o início do núcleo, onde se vê o *perforatorium* inserido na extremidade anterior do núcleo. (I) – seções longitudinais dos núcleos tipo 1 (n1) e tipo 2 (n2). (J) – seção longitudinal da região de transição cabeça-flagelo, onde se vê o núcleo (n), o adjunto do centríolo (ca) e o axonema (ax). (K-P) - seções transversais em vários níveis a partir da extremidade anterior para a posterior da região de transição cabeça-flagelo, indicadas por linhas pontilhadas em (J). Veja que à medida que o adjunto do centríolo aumenta de diâmetro o núcleo reduz e que mais posteriormente surgem o axonema, o derivado mitocondrial maior (md1) e o derivado mitocondrial menor (md2). Barras de escala: (A-B) = 20  $\mu\text{m}$ ; (C-D) = 10  $\mu\text{m}$ ; (E,I) = 0,5  $\mu\text{m}$ ; (F-H, K-P) = 0,1  $\mu\text{m}$ ; (J) = 0,2  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2** – Micrografia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *Trypoxylon*. (A) – seção transversal da região do flagelo, onde se vê o axonema (ax), os corpos acessórios (ab), o derivado mitocondrial maior (md1) e o derivado mitocondrial menor (md2). Observe que a região de material paracristalino (pc) ocorre somente no derivado mitocondrial maior, enquanto a amorfa eletrondensa (b), a amorfa eletrólúcida (a) e a de cristas mitocondriais (setas vazias pretas) ocorrem nos dois derivados mitocondriais. (B-D) – seções transversais da região posterior do flagelo. Observe que o derivado mitocondrial menor termina antes do derivado mitocondrial maior e que os microtúbulos acessórios são os últimos a finalizarem. (E-F) - seções transversais de cistos testiculares seccionados nas regiões da cabeça e do flagelo, respectivamente. Veja a diferença de diâmetro dos núcleos (n1 e n2), mas não dos flagelos dos dois tipos de espermatozoides. Barras de escala: (A-D) = 0,1  $\mu\text{m}$ ; (E-F) = 0,5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3** – Micrografia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *Trypoxylon* tratados pelo método do E-PTA. (A-C) – seções transversais da região da cabeça mostrando a vesícula acrossomal (av), o *perforatorium* (p), os dois tipos de núcleos (n1 e n2) e o adjunto do centríolo (ca). (D) – seção longitudinal da região de transição cabeça-flagelo mostrando o adjunto do centríolo, o derivado mitocondrial maior (md1) e o axonema (ax). (E) – seção transversal da região de transição cabeça-flagelo e do flagelo mostrando o núcleo (n), o adjunto do centríolo, a região centriolar (c), o axonema, os corpos acessórios (ab), o derivado mitocondrial maior (md1) e o derivado mitocondrial menor (md2). Observe que os corpos acessórios, a região circular eletrólúcida (a) dos derivados mitocondriais e o material intertubular do axonema são E-PTA positivos. O núcleo, a vesícula acrossomal e o adjunto do centríolo são predominantemente E-PTA negativos, com apenas a área periférica de cada uma dessas estruturas E-PTA positiva e o *perforatorium* e os microtúbulos do axonema são E-PTA negativos. Barras de escala: (A-E) = 0,1  $\mu$ m.



#### 4. Discussão

A produção de mais de um tipo de espermatozoide já foi descrita em espécies de várias ordens de insetos. Eles podem diferir em tamanho, forma ou número de cromossomos, sendo o polimorfismo do comprimento do flagelo e do núcleo os mais comuns (LEE; WILKES, 1965; PRESGRAVES *et al.*, 1997, 1999; OTRONEN *et al.*, 1997; BIRKHEAD; MOLLER, 1998; MANCINI; DOLDER, 2001, 2004; SIMMONS, 2001; CHAWANJI *et al.*, 2005, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2011). O Polimorfismo espermático descrito aqui em *T. aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi*, é o segundo registro nos Hymenoptera, o primeiro foi feito por Lee e Wilkes (1965) no Chalcidoidea *Dahlbominus fuscipennis*. Nessa espécie foram encontrados cinco tipos de espermatozoides, dos quais dois diferem no comprimento total, em outro falta uma das duas estruturas helicoidais na região da cabeça e os outros dois tipos diferem na direção das estruturas helicoidais nas regiões da cabeça e do flagelo.

A função do polimorfismo espermático ainda é desconhecida e as explicações existentes são meras hipóteses. Alguns autores sugerem que os espermatozoides que não fecundam os ovos degeneram no trato reprodutivo das fêmeas e sejam usados como fonte de energia para os espermatozoides férteis, para a fêmea ou para o zigoto em desenvolvimento (SIVINSKI, 1980; SNOOK; MARKOW, 1996). Para Lepidoptera, existem várias hipóteses para a produção dos espermatozoides eupirenes (com núcleo) e apirenes (sem núcleo), mas a mais aceita é a que os apirenes estão envolvidos na competição espermática (SILBERGLIED *et al.*, 1984; COOK; WEDELL, 1996, 1999; PITNICK *et al.*, 2003). A competição espermática pode ser separada em três categorias, onde os espermatozoides apirenes teriam a função de: 1) eliminar os eupirenes predepositados na espermateca da fêmea; 2) preenchimento (*cheap filler*) da espermateca da fêmea e, dessa forma, impedir a entrada do ejaculado de outros machos em cópulas subseqüentes; e 3) bloquear a espermateca (SWALLOW; WILKINSON, 2002).

Assim como em outros grupos de insetos, em *Trypoxylon* ainda é desconhecido se o polimorfismo espermático tem algum valor adaptativo e os dados de apenas três espécies não dão suporte para afirmar qual a função do

polimorfismo espermático, mas possivelmente represente uma estratégia reprodutiva para assegurar uma prole maior perante a competição entre machos pela mesma fêmea. Além disso, o polimorfismo nesses *Trypoxylon* é predominantemente do comprimento e da espessura dos núcleos, diferente dos observados em *Drosophila* e Hemiptera, onde a variação é mais do comprimento dos flagelos, enquanto em Coleoptera e Lepidoptera, o polimorfismo é do número de cromossomos e de presença ou ausência de núcleos, respectivamente (JAMIESON, 1987; JAMIESON *et al.*, 1999; PRESGRAVES *et al.*, 1999; SWALLOW; WILKINSON, 2002; CHAWANJI *et al.*, 2005; SASAKAWA, 2009). Desta forma, a função do polimorfismo espermático, se existe, possivelmente não seja a mesma nas diferentes ordens visto que os tipos de polimorfismo são diferentes entre elas.

Visto que todas as células germinativas de um cisto testicular são clones de uma única espermatogônia, provavelmente o processo que leva à formação de espermatozoides polimórficos nestas espécies de *Trypoxylon* ocorra na espermiogênese. Este processo talvez seja regulado por fatores de transcrição citoplasmáticos que controlam a expressão de genes diferentes nas espermátides que formarão cada tipo de espermatozoide.

O tamanho dos espermatozoides em Hymenoptera varia de 8 µm no Braconidae *Meteorus* sp. (QUICKE *et al.*, 1992) a 1.500 µm no Apidae *Euglossa mandibularis* (ZAMA *et al.*, 2005a). Essa variação ocorre até mesmo entre espécies da mesma família e do mesmo gênero, mostrando que essa característica pode ser usada em taxonomia. Na família Crabronidae, o tamanho dos espermatozoides varia de 98 µm em *Trypoxylon* sp. (QUICKE *et al.*, 1992) a 813 µm em *Microstigmus arlei* (ZAMA *et al.*, 2007) e no gênero *Trypoxylon*, de 98 µm em *Trypoxylon* sp. (QUICKE *et al.*, 1992) a 413 µm em *Trypoxylon aurifrons* (presente trabalho). O tamanho dos espermatozoides das espécies de *Trypoxylon* analisadas neste trabalho é maior que o de *Trypoxylon* sp., com 98 µm (QUICKE *et al.*, 1992) e o de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, com 150 µm (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Espermatozoides espiralados são comuns entre as vespas Parasitica, mas nenhum caso foi descrito em “Symphyta” e, em Aculeata, além das espécies de *Trypoxylon* deste trabalho, o único registro são duas espécies de vespas do gênero *Microstigmus* (Crabronidae) (LEE; WILKES, 1965; QUICKE

*et al.*, 1992; LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a; LINO-NETO; DOLDER, 2001b; ZAMA *et al.*, 2007; FIORILLO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2009).

Os espermatozoides de *T. aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* compartilham muitas características ultraestruturais com os de outros Hymenoptera, mas algumas diferenças são observadas entre estas espécies e outras proximamente relacionadas, como nos Crabronidae *T. albitarse*, *Microstigmus arlei* e *M. nigrophthalmus* e o Sphecidae *Sceliphron fistularium* (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2009). Os acrossomos destes *Trypoxylon* são muito maiores que o de *T. albitarse* e o *perforatorium* de *M. arlei*, *M. nigrophthalmus* e *S. fistularium* é paracristalino, diferente das espécies de *Trypoxylon* e da maioria dos outros Hymenoptera já estudados. Além disso, em seções transversais, a vesícula acrossomal das três espécies de *Trypoxylon* deste trabalho apresenta a mesma morfologia da observada em *T. albitarse*, circular na região anterior e oval à medida que se aproxima do núcleo (ARAÚJO *et al.*, 2009). Já em *Microstigmus*, *Sceliphron*, Meliponini e Formicidae, assim como em *Trypoxylon*, essa estrutura também é circular na região anterior, mas à medida que se aproxima do núcleo é elipsoidal nos dois primeiros e triangular nos dois últimos, enquanto em Apini, Exomalopsini, Euglossini, Halictini, Tapinotaspidini e Xylocopini é totalmente oval (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 1970; PENG *et al.*, 1992, 1993; WHEELER *et al.*, 1990; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a, b, 2007; LINO-NETO; DOLDER, 2002; BÁO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; MOYA *et al.*, 2007). Tanto a vesícula acrossomal quanto o *perforatorium* das três espécies de *Trypoxylon* deste trabalho são E-PTA negativos, enquanto nos demais Apoidea submetidos a esse tratamento a vesícula acrossomal é E-PTA positiva e o *perforatorium* varia de E-PTA negativo em Euglossini e Bombini, E-PTA negativo a ligeiramente positivo em *Sceliphron* e *Microstigmus* a totalmente positivo em Meliponini (ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005b, 2007).

A extremidade posterior do *perforatorium* inserida na cavidade anterior do núcleo é uma característica sinapomórfica dos Hymenoptera Aculeata, mas a profundidade dessa cavidade varia. As observadas nos *Trypoxylon* do presente estudo, em torno de 90 nm, e a de *T. albitarse*, com 80 nm, são as menores já descritas. Em vespas do gênero *Sceliphron* e em abelhas das tribos Halictini, Xylocopini, Tapinotaspidini e Meliponini, essa cavidade varia de 100

nm a 300 nm, e as maiores foram registradas em formigas, 400 nm, Vespidae, 500 nm, Euglossini, 630 nm e em *Microstigmus*, o *perforatorium* é praticamente todo inserido na cavidade nuclear (ZAMA *et al.*, 2001, 2005a, b, 2007; BÃO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005, 2009; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; MANCINI *et al.*, 2006; MOYA *et al.*, 2007).

Outra característica sinapomórfica dos Hymenoptera é a projeção da região posterior do núcleo. Nas espécies de *Trypoxylon* analisadas no presente estudo e em *T. albitarse*, ela é extremamente longa, delgada e com a extremidade levemente curvada (ARAÚJO *et al.*, 2009), diferente de todos os Hymenoptera já estudados, onde essa região é mais curta e menos delgada. Nestas três espécies de *Trypoxylon*, assim como em *Microstigmus* e *Sceliphron*, os núcleos são E-PTA negativos, com somente a superfície E-PTA positiva, mas diferente de Bombini, Euglossini e Meliponini, onde os núcleos têm, nas seções transversais, uma área em forma de lua crescente E-PTA positiva (ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a).

O adjunto do centríolo começando entre a base do núcleo e antes dos dois derivados mitocondriais, como nestas três espécies de *Trypoxylon*, ocorre também em *T. albitarse*, mas é diferente dos também Crabronidae *M. arlei* e *M. nigrophthalmus* e do Sphecidae *S. fistularium*, onde essa estrutura começa entre a base do núcleo e termina antes de um dos derivados mitocondriais (ZAMA *et al.*, 2005b, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2009). Padrão semelhante ao de *Trypoxylon* ocorre também no “Symphyta” *Tremex* sp., em Chalcidoidea e em Formicidae, enquanto o outro padrão ocorre na maioria dos “Symphyta”, exceto *Tremex* sp., em algumas vespas Parasitica, em Vespidae e na maioria dos Apoidea. Além disso, em Scelionidae não foi observado o adjunto do centríolo (WHEELER *et al.*, 1990; NEWMAN; QUICKE, 1998, 1999a, b; LINO-NETO; DOLDER, 2001a, b, 2002; MANCINI *et al.*, 2006, 2009; MOYA *et al.*, 2007; FIORILLO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2009). Nestes *Trypoxylon*, tal como em *Microstigmus*, *Sceliphron*, Euglossini e Meliponini, o adjunto do centríolo é predominantemente E-PTA negativo, com somente a superfície E-PTA positiva, enquanto em Apini e Bombini essa estrutura é E-PTA positiva (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a, b, 2007).

Os locais de início, o diâmetro, a morfologia, as áreas e reação ao método de E-PTA dos derivados mitocondriais são características que auxiliam

identificar vários grupos de Hymenoptera. Nas três espécies de *Trypoxylon* deste trabalho, assim como em *T. albitarse*, os dois derivados mitocondriais são assimétricos em comprimento e diâmetro, ambos são inseridos na extremidade posterior do adjunto do centríolo, sendo que o maior começa antes do menor e os dois se estendem ao longo do axonema e terminam antes do início da desorganização deste (ARAÚJO *et al.*, 2009). O padrão assimétrico dos derivados mitocondriais é sinapomórfico para as abelhas, ocorre também em Sphecidae, em Vespidae, algumas vespas Parasitica da família Eucilidae e da superfamília Megalyroidea e alguns “Symphyta” (QUICKE *et al.*, 1992; NEWMAN; QUICKE, 1999a, b, 2000; LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a, b; BÃO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; MANCINI *et al.*, 2006, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009). Contudo, em *Microstigmus* a assimetria dos derivados mitocondriais é só do comprimento (ZAMA *et al.*, 2007). Já derivados mitocondriais simétricos ocorrem em Siricoidea (“Symphyta”), Ichneumonoidea, Chalcidoidea e Formicidae (QUICKE *et al.*, 1992; LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000a; NEWMAN; QUICKE, 1999a; LINO-NETO; DOLDER, 2001b; MOYA *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2010). Em Scelionidae apenas um derivado mitocondrial foi observado (LINO-NETO; DOLDER, 2001b). Além disso, as regiões dos derivados mitocondriais descritas nestes *Trypoxylon* ocorrem também na maioria dos Apoidea estudados e, salvo as diferenças de tamanho e localização, são semelhantes e a região paracristalina é exclusiva do derivado mitocondrial maior, com exceção de Formicidae e a vespa *Prorops nasuta* (Bethylidae) que apresentam essa região nos dois derivados mitocondriais. (QUICKE *et al.*, 1992; ZAMA *et al.*, 2001, 2004, 2005a, b, 2007; BÃO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; BADKE *et al.*, 2005; FIORILLO *et al.*, 2005, 2009; MANCINI *et al.*, 2006, 2009; MOYA *et al.*, 2007; GRACIELLE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Ainda, nestes *Trypoxylon*, assim como na quase totalidade dos Hymenoptera estudados, o derivado mitocondrial maior termina depois do menor, sendo exceções *Vespa crabro* e as vespas Parasitica da família Eulophidae, *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica*, onde o derivado mitocondrial menor termina depois do maior (BRITO *et al.*, 2009; MANCINI *et al.*, 2009). A resposta dessas organelas ao método de E-PTA varia entre os grupos. Nos *Trypoxylon* estudados neste trabalho, diferente de todos os

Apoidea já estudados, somente a região amorfa de eletrondensidade média é E-PTA positiva, enquanto em *Microstigmus*, a de cristas mitocondriais, em Euglossini, Meliponini e Sphecidae, a paracristalina e em Apini e Bombini, a amorfa eletrondensa (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a, b, 2007).

Os corpos acessórios dos *Trypoxylon* deste trabalho e dos demais Hymenoptera que apresentam essas estruturas têm formato semelhantes e são posicionados entre o axonema e os dois derivados mitocondriais. Quanto tratados pelo método de E-PTA, os corpos acessórios destes *Trypoxylon*, de Sphecidae, de Apini e de Bombini são positivos, enquanto em *Microstigmus*, Meliponini e Euglossini são negativos (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a, b, 2007).

O padrão 9 + 9 + 2 microtúbulos do axonema é sinapomórfico para Hymenoptera. De todos os Hymenoptera estudados até agora, inequivocamente, somente em formigas do gênero *Pseudomyrmex* foi observado arranjo 9 + 9 + 1 microtúbulos (MOYA *et al.*, 2007). A sequência de desorganização desses microtúbulos na porção final do flagelo varia entre os Aculeata e Parasitica. Em *T. aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* e na maioria dos Aculeata estudados, o par central de microtúbulos e os das nove duplas terminam antes que os acessórios, enquanto em formigas todos os microtúbulos terminam praticamente juntos e em vespas Parasitica os microtúbulos acessórios terminam primeiro que os demais microtúbulos (LINO-NETO *et al.*, 1999, 2000b; BÃO *et al.*, 2004; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a, b, 2007; BADKE *et al.*, 2005; MOYA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2009; GRACIELLE *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Quanto ao método de E-PTA, a maior diferença está na marcação E-PTA positiva de todos os materiais intertubulares e negativa de todos os microtúbulos destes *Trypoxylon* e em *Microstigmus*, diferente de Sphecidae, Apini, Meliponini e Euglossini, onde os microtúbulos acessórios são E-PTA positivos, e de Bombini que além desses tem o par central e o material intertubular também positivos (LINO-NETO *et al.*, 2000b; ZAMA, 2003; ZAMA *et al.*, 2004, 2005a, b, 2007).

Como descrito, os padrões de desorganização dos microtúbulos axonemais na porção final do flagelo nos Aculeata e Parasitica são distintos e

possivelmente essa característica, assim como outras dos espermatozoides de Hymenoptera sejam importantes para estudos de sistemática do grupo. Além disso, constata-se também que algumas características da estrutura dessas células são compartilhadas por grupos filogeneticamente próximos, enquanto outras são compartilhadas por grupos filogeneticamente mais distantes. Desta forma, a necessidade de ampliar esses estudos para o maior número possível de espécies dos diferentes grupos de Hymenoptera a fim de construir uma matriz de caracteres para contribuir com a sistemática desse importante grupo de insetos.

### Referências bibliográficas

AMARANTE, S. T. P. Three new Neotropical species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera, Sphecidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 35, p. 429-437, 1991.

AMARANTE, S. T. P. *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) *mojuba* sp. n., an unusual Trypoxylini from South America (Hymenoptera, Sphecidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 39, p. 157-160, 1995.

AMARANTE, S. T. P. Addendum and corrections to a synonymic catalog of Neotropical Crabronidae and Sphecidae. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 45, p. 1-18, 2005.

ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 137-141, 2005.

ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron*, v. 40, p. 719-723, 2009.

ARAÚJO, V. A.; LINO-NETO, J.; RAMALHO, F. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron*, v. 42, p. 560-567, 2011.

BADKE, J. P.; BANIN, T. M.; SCORZA, L. C. T.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructure of Spermatozoa in *Partamona helleri* Friese (1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 22, p. 64-65, 2005.

BÁO, S. N.; GONÇALVES SIMÕES, D.; LINO-NETO, J. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis* (*Exomalopsis*) *auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia* (*Lophopedia*) sp. Michener and Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 36, p. 23-28, 2004.

BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. *Sperm competition and sexual selection*. London: Academic Press, 1998. 826 p.

- BOHART, R. M.; MENKE, A. S. *Sphecid wasps of the world*. A generic revision. Berkeley: University of California Press, 1976.
- BRITO, P.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue Cell*, 41, 113-117, 2009.
- BRESSAC, C.; HAUSCHTECK-JUNGEN, E. *Drosophila subobscura* females preferentially select long sperm for storage and use. *J. Ins. Physiol.*, v. 42, p. 323-328, 1996.
- CHAWANJI, A. S.; HODGSON, A. N.; VILLET, M. H. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell*, v. 37, p. 257-267, 2005.
- CHAWANJI, A. S.; HODGSON, A. N.; VILLET, M. H. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell*, v. 38, p. 373-388, 2006.
- COOK, P. A.; WEDELL, N. Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success. *Proc. Royal Soc.*, London, n. B 263, p. 1047-1051, 1996.
- COOK, P. A.; WEDELL, N. Non-fertile sperm delay female remating. *Nature*, v. 397, p. 486, 1999.
- COVILLE, R. E. Wasp of the genus *Trypoxylon* subgenus *Trypargilum* in North America (Hymenoptera: Sphecidae). *Univ. Calif. Publ. Entomol.*, v. 97, p. 1-147, 1982.
- CRUZ-HÖFLING, M. A.; CRUZ-LANDIM, C.; KITAJIMA, E. W. The fine structure of spermatozoa from the honey bee. *An. Acad. Brasl. Ciênc.*, v. 42, p. 69-78, 1970.
- FIORILLO, B. S.; COELHO, A. M.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 37, p. 75-81, 2005.
- FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron*, v. 39, p. 1271-1280, 2008.
- FIORILLO, B. S.; ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). *Acta Zool.*, v. 89, p. 1463-1470, 2009.
- GRACIELLE, I. M. S.; FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron*, v. 40, p. 719-723, 2009.
- HEALY, J. M.; JAMIESON, B. G. M. An ultrastructural examination of developing and mature paraspermatozoa in *Pyrazus ebeninus* (Mollusca, Gastropoda, Potamididae). *Zoomorphol.*, v. 98, p. 101-119, 1981.
- JAMIESON, B. G. M. The ultrastructure and phylogeny of insect Spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 320 p.

- JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, 1999. 555 p.
- LEE, P. E.; WILKES, A. Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. *Science*, v. 147, p. 1445-1446, 1965.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolini* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.*, v. 82, p. 159-164, 2001a.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Structural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scrip.*, v. 30, p. 89-96, 2001b.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell*, v. 34, p. 124-128, 2002.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Euritomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, v. 28, p. 253-259, 1999.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatma and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.*, v. 81, p. 205-211, 2000a.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, v. 32, p. 322-327, 2000b.
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Ultrastructure of apyrene and epyrene spermatozoa from the seminal vesicle of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue Cell*, v. 33, p. 301-308, 2001.
- MANCINI, K.; DOLDER, H. Dichotomic spermiogenesis of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 21, p. 13-23, 2004.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insect. Soc.*, v. 53, p. 333-338, 2006.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H.; DALLAI, R. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arth. Struct. Dev.*, v. 38, p. 54-59, 2009.
- MOREIRA, J.; ARAÚJO, V. A.; BÁO, S. N.; LINO-NETO, J. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron*, v. 41, p. 187-192, 2010.
- MOYA, J.; MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; DELABIE, J.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool.*, v. 88, p. 181-187, 2007.
- NEWMAN, T. M.; QUICKE, D. L. J. Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *J. Hym. Res.*, v. 7, p. 25-37, 1998.

- NEWMAN, T. M.; QUICKE, D. L. J. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.*, v. 8, p. 35-47, 1999a.
- NEWMAN, T. M.; QUICKE, D. L. J. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.*, 8, 197-203, 1999b.
- NEWMAN, T. M.; QUICKE, D. L. J. Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *J. Hym. Res.*, 9, 62-70, 2000.
- OLIVEIRA, C. M.; MANCINI, K.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyloidea). *Tissue Cell*, v. 42, p. 242-246, 2010.
- OTRONEN, M.; REGUERA, P.; WAR, P. I. Sperm storage in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*: identifying the sperm of competing males in separate female spermathecae. *Ethology*, v. 103, p. 844-854, 1997.
- PENG, C. Y. S.; YIN, C. M.; YIN, L. R. S. Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.*, v. 17, p. 269-276, 1992.
- PENG, C. Y. S.; YIN, C. M.; YIN, L. R. S. Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.*, v. 18, p. 93-101, 1993.
- PITNICK, S.; MILLE, G. T.; SCHNEIDER, K.; MARKOW, R. Ejaculate-female coevolution in *Drosophila majavensis*. *Proc. Roy. Soc.*, London, v. B 270, p. 1507-1512, 2003.
- PRESGRAVES, D. C.; SEVERANCE, E.; WILKINSON, G. S. Sex chromosome meiotic drive in stalk-eyed flies. *Genetics*, v. 147, p. 1169-1180, 1997.
- PRESGRAVES, D. C.; BAKER, R. H.; WILKINSON, G. S. Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proc. Roy. Soc.*, London, v. 266, p. 1041-1047, 1999.
- QUICKE, D. L. J.; INGRAM, S. N.; BAILLIE, H. S.; GAITENS, P. V. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scrip.*, v. 21, p. 381-402, 1992.
- RICHARDS, O. W. The American species of the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecoidea). *T. Roy. Entomol. Soc.*, London, v. 82, p. 173-362, 1934.
- SASAKAWA, K. Marked sperm dimorphism in the ground beetle *Scarites terricola*: a novel type of insect sperm polymorphism. *Physiol. Entomol.*, v. 34, p. 387-390, 2009.
- SILBERGLIED, R. R.; SHEPHERD, J. G.; DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am. Naturalist.*, v. 123, p. 255-265, 1984.
- SIMMONS, L. W. Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insects. Princeton and Oxford: Princeton University Press, 2001. 434 p.
- SIVINSKI, J. Sexual selection and insect sperm. *Fla. Entomol.*, 63, 99-111, 1980.

- SNOOK, R. R.; MARKOW, T. A. Possible role of nonfertilizing sperm as a nutrient source for female *Drosophila pseudoobscura* Frolova (Diptera: Drosophilidae). *Pan-Pacific Entomologist*, v. 72, p. 121-129, 1996.
- SNOOK, R. R.; KARR, T. L. Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. *Curr. Biol.*, v. 8, p. 291-294, 1998.
- SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol. Rev.*, v. 77, p. 153-182, 2002.
- WHEELER, D. E.; CRICHTON, E. G.; KRUTZSCH, P. H. Comparative Ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.*, v. 206, p. 343-350, 1990.
- ZAMA, U. *Estudo estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com considerações filogenéticas*. Ph. D thesis, State University of Campinas, 2003.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.*, v. 10, p. 261-270, 2001.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell*, v. 36, p. 29-41, 2004.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; MELO, S. M.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H. Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.*, v. 52, p. 122-131, 2005a.
- ZAMA, U.; BRITO, P.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H.; BÁO, S. N. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 37, p. 313-321, 2005b.
- ZAMA, U.; MOREIRA, J.; BÁO, S. N.; CAMPOS, L. A. O.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera, Apoidea, Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arth. Struct. Dev.*, v. 36, p. 304-316, 2007.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

As espécies de Hymenoptera estudadas neste trabalho foram facilmente separadas entre si pelos dados morfométricos de seus espermatozoides (comprimento total, do flagelo e do núcleo), mostrando que essas informações podem auxiliar a taxonomia nesse grupo de insetos.

A morfologia geral do aparelho reprodutor masculino das espécies de *Centris* estudadas neste trabalho é semelhante à descrita em várias outras espécies de Hymenoptera. Contudo, da mesma forma que a estrutura dos espermatozoides, muitas peculiaridades do aparelho reprodutor masculino são características de determinados grupos, constituindo também fonte de caracteres promissores para estudos de sistemática.

Os espermatozoides de *Centris analis*, *C. fuscata*, *C. tarsata*, *Centris* sp., *Epicharis picta*, *Trypoxylon aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* apresentam várias características sinapomórficas com os demais Apoidea estudados, outras que são compartilhadas somente entre as espécies da mesma família e algumas que são exclusivas de cada gênero.

As espécies *Trypoxylon aurifrons*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* produzem espermatozoides polimórficos. Os espermatozoides tipo 1 e tipo 2 são produzidos nos mesmos cistos testiculares. Os dois tipos de espermatozoides são identificados pela diferença de comprimento e diâmetro de seus núcleos. A região de transição cabeça-flagelo é diferente nos dois tipos de

espermatozoides. Essas espécies são separadas entre si pelos dados morfométricos dos seus espermatozoides tipo 1.

As respostas das estruturas espermáticas ao método de E-PTA fornecem informações que auxiliam identificar vários grupos de Hymenoptera.