

JANE CARLA SOARES MOREIRA

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS
ESPERMATOZÓIDES DE DUAS ESPÉCIES DE ICHNEUMONIDAE
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONOIDEA)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

JANE CARLA SOARES MOREIRA

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS
ESPERMATOZÓIDES DE DUAS ESPÉCIES DE ICHNEUMONIDAE
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONOIDEA)**

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

APROVADA: 20 de julho de 2007

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-Orientador)

Prof. Lúcio A. O. Campos
(Co-Orientador)

Prof. José Eduardo Serrão

Prof. Uyrá dos Santos Zama

Prof. José Lino Neto
(Orientador)

Somos arquivos ambulantes de uma sabedoria ancestral. Nossos corpos e mentes são como monumentos vivos dos raros sucessos de nossos antepassados.

Helena Cronin (A Formiga e o Pavão - 1996)

Dedico esta tese a meus pais e
irmãos João Paulo e Ana Carolina

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João e Rita por nunca terem medido esforços para realizar minhas vontades.

Aos meus irmãos João Paulo e Ana Carolina pelo amor que nos une. Em especial a Carol por aceitar, a minha ausência da convivência diária.

Aos meus primos e tios pelo incentivo que me deram ao longo destes anos e a vovó Fia pelas orações e pelo carinho.

Ao meu orientador José Lino Neto pelo exemplo de profissionalismo e amizade ao longo destes anos de convivência.

Ao professores Clóvis Andrade Neves, Lucio Antonio de O. Campos e Sônia Nair Bão (UnB) pela co-orientação.

Aos professores Sérgio da Mata, Izabel Maldonado e Adilson Zacaro do laboratório de Biologia estrutural pela convivência.

Aos colegas de laboratório ALÍPIO, Sirlene, Mariana, Madu, Polyana, Max e Cláudia por oferecerem um ótimo ambiente de trabalho.

Dra. Cláudia Vanetti e o Bruno Fiorillo pela paciência e as instruções no manuseio dos equipamentos dos Núcleos de Microscopia Eletrônica de Transmissão da UFV e UnB, respectivamente.

Aos amigos Vinícius, Lílian por fazerem parte do meu grupo de pesquisa, de churrasco e de amigos infalíveis.

Ao Mestrando Alex do laboratório de Biologia Estrutural pelos bons momentos compartilhados e pela ajuda com os reagentes.

Ao meu amor João Paulo pelo carinho e pelas lições de paciência e diálogo.

Ao núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e da UnB.

A Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Entomologia pela estrutura oferecida durante todo o mestrado.

As secretarias de pós-graduação em Entomologia, em especial a Dona Paula, pelo profissionalismo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Jane Carla Soares Moreira, filha de João Batista Moreira e Rita Ferreira Soares Moreira, nasceu em Coronel Fabriciano, Minas Gerais, em 20 de fevereiro de 1981.

Em janeiro de 2005, graduou-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. Durante o período de graduação, de 2001 a 2005, foi estagiária do Laboratório de Biologia estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV trabalhando com morfologia do aparelho reprodutor e dos espermatozoides de insetos da ordem Hymenoptera.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a tese em julho de 2007. Neste mesmo mês foi aprovada para o Doutorado em Entomologia pela mesma instituição.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A ordem Hymenoptera.....	01
1.2. A família Ichneumonidae.....	02
1.3 Morfologia do sistema reprodutor masculino em Hymenoptera.....	03
1.4. Ultra-estrutura dos espermatozóides em Hymenoptera.....	05
1.5. Objetivos.....	07
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	08
3. RESULTADOS.....	10
4. DISCUSSÃO.....	17
5. CONCLUSÃO.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

RESUMO

Moreira, Jane Carla Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.

Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de duas espécies de Ichneumonidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). Orientador: José Lino Neto. Co-Orientadores: Clóvis Andrade Neves, Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Sônia Nair Bão.

O sistema reprodutor masculino de *Lymeon dieloceri*, parasitóide do Symphyta *Digelasinus diversipes* e do parasitóide do Vespidae *Myschocyttarus atramentarius* é formado por um par de testículos com um folículo cada, um par de glândulas acessórias, um par de ductos deferentes e um ducto ejaculatório. Os ductos deferentes são finos, longos, sem dilatação característica de vesícula seminal, e se enovelam na base do folículo testicular. As glândulas acessórias desembocam nos ductos deferentes e, em *Lymeon dieloceri* elas são ovaladas e no parasitóide de *M. atramentarius*, esférica. Os espermatozoides desses dois Ichneumonidae são semelhantes àqueles descritos para os demais Hymenoptera, apresentando: (1) o acrossomo formado pela vesícula acrossômica revestindo o *perforatorium*, o qual tem sua base inserida em uma cavidade na ponta do núcleo; (2) núcleo fino, longo e de cromatina eletrondensa; (3) um adjunto do centríolo eletrondenso e localizado entre o núcleo e um dos dois derivados mitocondriais; (4) axonema com arranjo 9 + 9 + 2 microtúbulos; (5) dois derivados mitocondriais longos com cristas periféricas e; (6) dois corpos acessórios localizados entre os dois derivados mitocondriais e o axonema. Os espermatozoides também apresentam características estruturais comuns apenas às vespas parasíticas, como uma camada de material extracelular envolvendo o acrossomo e parte do núcleo e os microtúbulos acessórios do axonema terminado antes dos demais. Entretanto, tanto o sistema reprodutor como os espermatozoides apresentaram características morfológicas que permitiram diferenciá-las entre si, como a forma das glândulas acessórias e dos derivados mitocondriais. Onde em *L. dieloceri* as glândulas são ovaladas e os derivados mitocondriais são simétricos, já no parasitóide de *M. atramentarius* as glândulas são esféricas e os derivados assimétricos. Portanto, esse trabalho confirma que, em Hymenoptera, tanto o sistema reprodutor masculino como os espermatozoides fornecem caracteres morfológicos que podem ser usados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos.

ABSTRACT

Moreira, Jane Carla Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2007. **Male reproductive system and sperm morphology in two Ichneumonidae (Hymenoptera: Parasitic)**. Adviser: Jose Lino Neto. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves, Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Sonia Nair Bão.

The male reproductive system of the *Lymeon dieloceri* and *Myschocyttarus atramentarius* parasitoids is formed by a pair of testes with one follicles each, a pair of accessory glands, a pair of vasa deferentia and one ejaculatory duct. The vasa deferentia are thin, long, without characteristic dilatation of the seminal vesicle, and they get in the base of the testicular lobule. The accessory glands open in the vas deferens and, in *Lymeon dieloceri* they are oval shape and in *M. atramentarius* parasitoid, they are spherical. In both Ichneumonidae the spermatozoa are similar to those ones described for other Hymenoptera, with : (1) the acrosome formed by the acrosomal vesicle covering the perforatorium, which has its base inserted in a gap located in the nucleus point; (2) thin and long nucleus with a electron-dense chromatin; (3) an electron-dense centriole adjunct located between the nucleus and one of the two mitochondrial derivatives; (4) axoneme with 9+9+2 microtubes arrangement; (5) two long mitochondrial derivatives with peripheral cristae and; (6) two accessory bodies located between the two mitochondrial derivatives and the axoneme. They also present structural characteristics only common to the parasitic wasps, as a layer of extracellular material involving the acrosome and one region of the nucleus and the axoneme accessory microtubes ending before the other ones. However, the male reproductive system and the sperm presented morphologic characteristics that allowed differentiating themselves, as the form of the accessory glands and the mitochondrial derivatives. In *L. dieloceri*, the glands have an oval shape and the mitochondrial derivatives are symmetrical, no longer, in the *M. atramentarius* parasitoid, the glands have a spherical shape and asymmetrical derivatives. Therefore, this work shows that, in Hymenoptera, the male reproductive system and the spermatozoa supply morphologic characters that can be used in phylogenetic analyses in different taxonomic levels.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ordem Hymenoptera

Os Hymenoptera, com cerca de 250.000 espécies estimadas constituem uma das maiores ordens de insetos, excedendo em número de espécies os Lepidoptera e os Diptera e equivalendo aos Coleoptera (Gauld & Hanson 1995). Além disto, esta ordem compreende o grupo de insetos com a maior diversidade biológica e o maior número de espécies de importância econômica (Gaston 1991; Gauld 1995). Seus representantes podem ser fitófagos, predadores, parasíticos ou uma combinação de ambos. Dessa forma, eles vêm sendo muito utilizados no controle biológico de pragas agrícolas e florestais. Entre os membros fitófagos da ordem, as abelhas constituem o grupo mais importante de polinizadores, sendo essenciais à manutenção da diversidade das angiospermas (Hanson 1995). Com a polinização de espécies cultivadas elas contribuem com aproximadamente 30% da produção de espécies vegetais utilizadas na alimentação humana (O'Toole 1993). Os Hymenoptera também podem causar grandes prejuízos econômicos, como por exemplo, às formigas cortadeiras, que devastam grandes extensões de pastagens e florestas (Cherrett 1986; Hanson 1995).

Hymenoptera é composta por 18 superfamílias divididas nas subordens Symphyta e Apocrita (Gauld & Hanson 1995). Os Symphyta são considerados um grupo basal, contendo pouco mais que 5% das espécies descritas. Os Apocrita constituem a grande maioria das espécies e tem sido tradicionalmente divididos em Aculeata e Parasítica. Os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas. Este grupo é considerado o mais derivado dentre os Hymenoptera, por apresentarem fêmeas com ferrão originado de modificações do ovopositor. O grupo Parasítica é constituído por todos os Apocrita que não tiveram o ovopositor modificado em ferrão. A maioria das espécies exibe comportamento parasitóide, entretanto existem espécies fitófagas, galhadoras ou predadoras. Este é o maior grupo de Hymenoptera contendo 48 famílias em 10 superfamílias (LaSalle & Gauld 1992). Metade das espécies, descritas para a ordem, estão classificadas como Parasítica, sendo a maioria delas distribuídas nas superfamílias Chalcidoidea e Ichneumonoidea (LaSalle & Gauld 1992). As relações filogenéticas entre as vespas parasíticas são menos entendidas do que aquelas propostas para Symphyta ou Aculeata apesar de existir algumas superfamílias bem estabilizadas como Chalcidoidea, Platygastroidea, Cynipoidea, Ceraphronoidea e Ichneumonoidea (Ronquist 1999).

A superfamília Ichneumonoidea inclui o maior grupo, sendo estimadas 100.000 espécies em todo o mundo (Gauld & Hanson 1995). Os parasitóides dessa superfamília atacam preferencialmente os imaturos de Lepidoptera e Hymenoptera da subordem Symphyta (Gauld & Bolton 1988; Wahl & Sharkey 1993). Em Ichneumonoidea os indivíduos variam de aproximadamente, 1 mm à 6 cm de comprimento (podendo ser maior se incluir o ovipositor).

Numa revisão cladística de Ichneumonoidea, Sharkey & Wahl (1992) descrevem as três hipóteses filogenéticas proposta para a superfamília baseadas em caracteres morfológicos tradicionais: (1) Rasnitsyn (1988) sugere que Aculeata (Vespomorpha) é grupo irmão de Ichneumonoidea; (2) Zessin (1985) sugere que Ichneumonoidea é grupo irmão de um Apocrita atual e; (3) Rasnitsyn (1980), suportada por Johnson (1988), sugere que Ichneumonoidea, Chalcidoidea, Cynipoidea, Proctocuroidea *s.l.* são um grupo monofilético de Ichneumonomorpha. Segundo Sharkey & Wahl (1992), a hipótese mais parcimoniosa em relação aos caracteres usados é a proposta por Rasnitsyn (1988), a qual sugere Ichneumonoidea como grupo irmão de Aculeata. Ainda para estes autores, esta superfamília, contém além das famílias Braconidae e Ichneumonidae, uma família fóssil (Eoichneumonidae) e um gênero fóssil (Tanychora) de relação incerta com as outras famílias (Sharkey & Wahl 1992). O estudo da filogenia de Ichneumonoidea tem desprendido mais esforços do que o de outras superfamílias de vespas parasíticas. As subfamílias têm sido identificadas como monofilética (Gauld 1985; Wahl & Sharkey 1993; Wahl & Gauld 1998), mas as relações entre elas são ainda incertas e alguns grupos são controversos (Sharkey & Wahl 1992, Ronquist 1999; Quicke *et al.* 1997).

1.2. A Família Ichneumonidae

Os Ichneumonidae são definidos como um grupo monofilético para os Hymenoptera parasitóides (Sharkey & Wahl 1992). Eles constituem a família com maior riqueza em espécies (Hanson & Gauld 1995), com cerca de 60.000 espécies estimadas, das quais 20.000 ocorram na região Neotropical (Porter 1975). A maioria desses insetos é terrestre e habita regiões temperada e tropical úmida (Gauld & Bolton 1988; Wahl & Sharkey 1993). São parasitóides de formas imaturas de insetos holometábolos (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Raphidioptera e Trichoptera) e de Chelicerata (ovos, em Araneae e Pseudoscorpionida, e adultos em Araneae) (Wahl & Sharkey 1993). O parasitismo mais freqüente ocorre em larvas de Lepidoptera e Hymenoptera

(subordem Symphyta). Quando as larvas dos Ichneumonidae atingem a maturidade, tecem um casulo de seda, no interior ou fora do corpo do hospedeiro, e dentro dele metamorfoseiam-se em pupas. O ciclo evolutivo dos Ichneumonidae é geralmente curto, com duração de aproximadamente um mês, o que permite a ocorrência de várias gerações anuais.

Apesar da grande diversidade dos Ichneumonidae, pouco se conhece sobre sua distribuição, taxonomia e biologia (Porter 1980; Kumagai 1984; 1999; Gonçalves 1991, 1995; Guerra 1993, 1999; Ruiz 1995). Até 1940 eram reconhecidas apenas 5 subfamílias: Cryptinae, Ichneumoninae, Tryphoninae, Pimplinae e Ophioninae (Wahl & Gauld 1998). Numa ampla descrição da história taxonômica desta famílias Townes (1969, 1970a,b, 1971) reconhece 25 subfamílias. Wahl e Sharkey (1993) sugerem algumas modificações aumentando para 35 subfamílias e na mais recente revisão do grupo, os Ichneumonidae foram distribuídos em 36 subfamílias (Hanson & Gauld 1995).

1.3. Morfologia do sistema reprodutor masculino em Hymenoptera

O sistema reprodutor masculino nos Hymenoptera é constituído, na maioria das espécies onde foi estudado, por dois testículos, um par de ductos deferentes e um par de glândulas acessórias. O testículo é o local onde ocorre o processo espermatogênico e a forma pode variar de esférica a fusiforme. Nos adultos jovens, os testículos são bastante desenvolvidos, sofrendo, em geral, degeneração gradativa até a completa regressão no final da maturidade sexual. Os testículos são constituídos por folículos, os quais podem variar em número, forma e tamanho nos diferentes grupos taxonômicos. Por exemplo, em todas as espécies de vespas parasíticas já observadas os testículos possuem apenas um folículo (Lino-Neto, informação pessoal). Em Vespidae e na maioria dos Apoidea têm sido observados três folículos, entretanto em Formicidae já foi observado variando de um (p.ex., *Gnamptogenys striatula*; Lino-Neto, informação pessoal) a onze (Wheller & Krutzsch 1992) e a família Apidae geralmente tem quatro folículos testiculares (Roig-Alsina & Michener 1993). Apesar do número de folículos ser bastante constante dentro do mesmo grupo, existem espécies com número bem diferente, como por exemplo, em *Apis mellifera* (Apidae) que possui 200 ou mais folículos e *Hypanthidium rubriventris* (Megachilidae) que possui 54 (Lino-Neto, informação pessoal). Assim o número de folículos testiculares constitui uma característica que pode, às vezes, separar famílias dentro da ordem Hymenoptera (Ferreira *et al.* 2004).

Os espermatozóides, após deixarem os testículos, ficam armazenados em uma região diferenciada do ducto deferente denominada de vesícula seminal. Na maioria das espécies de Apidae machos jovens apresentam espermatozóides liberados em feixes a partir do testículo alcançando a vesícula seminal ainda desta forma. Durante a maturação sexual os feixes são desfeitos e nos machos sexualmente maduros os espermatozóides estão individualizados dentro da vesícula seminal (Moreira *et al.* 2004). A presença de feixes na vesícula seminal também foi observada nos machos sexualmente maduros de Symphyta (Quicke *et al.*, 1992). Nos Hymenoptera, a vesícula seminal pode compreender quase todo o ducto deferente ou restringir a uma determinada região dilatada do ducto. As glândulas acessórias, assim como as demais regiões do sistema reprodutor, apresentam grande diversidade morfológica. Ainda, nas abelhas sem ferrão (Meliponini) as glândulas acessórias estão ausentes.

1.4. Ultra-Estrutura dos Espermatozóides em Hymenoptera

A morfologia dos espermatozóides em Hymenoptera foi descrita em detalhes em: **Symphyta** (Quicke *et al.* 1992; Newman & Quicke 1999a); **Apocrita Aculeata: Apidae** (Hoage & Kessel 1968; 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; Bão *et al.* 2004; Araújo *et al.* 2005; Conte *et al.* 2005); **Halictidae** (Fiorillo *et al.* 2005a); Anthophoridae (Fiorillo *et al.* 2005b); **Formicidae** (Thompson & Blum 1967; Caetano 1980; Wheeler *et al.* 1990; Lino-Neto & Dolder 2002; Moya *et al.* 2007); **Vespidae** (Mancini *et al.* 2006); **Sphecidae** (Zama *et al.* 2005b, 2007) **Apocrita Parasíticas: Eucoilidae** (Newman & Quicke 1999b); **Eurytomidae** (Lino-Neto *et al.* 1999); **Megalyridae** (Newman & Quicke 2000), **Scelionidae** (Lino-Neto & Dolder 2001a), **Trichogrammatidae** (Lino-Neto *et al.* 2000a, Lino-Neto & Dolder 2001b) e **Braconidae** (Quicke *et al.* 1992; Newman & Quicke 1998). Em Ichneumonidae estudos foram realizados com *Diadormus pulchellus* da subfamília Ichneumoninae (Chauvin *et al.* 1988), *Amblyeteles* sp., *Lissonota* sp. e *Exochus* sp. das subfamílias Ichneumoninae, Branchinae, e Metopiinae respectivamente (Quicke *et al.* 1992).

Os espermatozóides em Hymenoptera são células filiformes que medem de 8 μm em *Meteorus* sp. (Braconidae) (Quicke *et al.* 1992) a 1.500 μm em *Euglossa mandibularis* (Apidae) (Zama *et al.* 2005). De modo geral, podem ser descritos como

possuindo uma região anterior, composta pelo núcleo e acrossomo, e uma região posterior, ou flagelar, composta pelo axonema, dois derivados mitocondriais, um adjunto do centríolo e dois corpos acessórios.

O acrossomo é uma organela longa, situada anterior ao núcleo e formada por duas estruturas: a vesícula acrossomal e o *perforatorium* (Wheeler *et al.* 1990; Jamieson *et al.* 1999; Newman & Quicke 1999a; Zama *et al.* 2001; Lino-Neto & Dolder 2002). Entretanto, nos espermatozoides da maioria das vespas parasíticas ocorre uma terceira camada extracelular que recobre o acrossomo e parte anterior do núcleo (Quicke *et al.* 1992; Newman & Quicke 1998, 1999b; Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a).

Em geral em Hymenoptera o núcleo é alongado possuindo cromatina compacta, homogênea eletrondensa. Entretanto na formiga *Solenopsis invicta* (Lino-Neto & Dolder 2002) e Halictidae (Fiorillo *et al.* 2005a) e em Xylocopini (Fiorillo 2005b) o núcleo possui áreas electron lúcidas. O comprimento do núcleo varia muito entre as espécies, medindo de 4 μm (Quicke *et al.* 1992) a 105 μm (Lino-Neto *et al.* 1999). Em alguns grupos o núcleo assume forma espiralada (Quicke *et al.* 1992; Quicke 1997; Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a, 2001b, Zama *et al.* 2007).

O adjunto do centríolo é uma estrutura eletrondensa e alongada, localizada paralelamente ao axonema, entre a base do núcleo e a extremidade anterior de um dos derivados mitocondriais (Newman & Quicke 1998, 1999b, 2000; Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.* 2001). Nos espermatozoides de formigas (Caetano, 1980; Wheeler *et al.* 1990; Lino-Neto & Dolder 2002) e de alguns outros grupos (Newman & Quicke 1999a; Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a), o adjunto de centríolo se localiza na extremidade anterior de ambos os derivados mitocondriais. A origem e função dessa estrutura ainda não foram completamente elucidadas, no entanto, análises citoquímicas demonstraram que tais estruturas apresentam proteínas básicas (Lino-Neto *et al.* 2000b).

O axonema apresenta o arranjo padrão para insetos, 9+9+2, com nove microtúbulos acessórios simples externos, nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. Tem sua extremidade anterior localizada na base do núcleo e se estende até a extremidade posterior do flagelo. Nessa região os microtúbulos do axonema apresentam seqüências de terminação que variam entre os grupos (Wheeler *et al.* 1990; Peng *et al.* 1993; Newman & Quicke 1998; Lino-Neto *et al.* 1999; Lino-Neto & Dolder 2000a, 2001b; Zama *et al.* 2001). Assim como o núcleo, o axonema de algumas

espécies apresenta um padrão espiralado (Quicke *et al.*, 1992; Quicke, 1997; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a, 2001b).

Os corpos acessórios são estruturas alongadas, de formato triangular em corte transversal e localizadas paralelamente entre os derivados mitocondriais e o axonema (Peng *et al.* 1993; Newman & Quicke 1999a; Lino-Neto *et al.* 2000b). Em alguns grupos esta estrutura é bastante reduzida (Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a, 2001b). Sua origem e função permanecem desconhecidas.

Os derivados mitocondriais são mitocôndrias modificadas que possuem cristas e apresentam algumas variações entre os Hymenoptera (Quicke *et al.* 1992). Em alguns grupos, apresentam material paracristalino (Caetano 1980; Wheeler *et al.*, 1990; Peng *et al.* 1993; Lino-Neto *et al.* 2000b; Lino-Neto & Dolder 2001a, 2002; Zama *et al.*, 2001) e podem variar em diâmetro (Newman & Quicke 1999a, 1999b, 2000; Lino-Neto *et al.* 2000b; Zama *et al.* 2001) ou possuírem diâmetro semelhante (Newman & Quicke, 1999a; Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001b, 2002). Podem também, variar em comprimento (Wheeler *et al.* 1990; Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001b; Zama *et al.* 2001).

A ultra-estrutura dos espermatozoides tem levantado um número grande de caracteres que serão de grande utilidade em análises filogenéticas.

1.5. OBJETIVOS

Considerando a grande diversidade morfológica do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides em Hymenoptera, a importância dessas informações para a sistemática e a escassez de conhecimento em Ichneumonidae, este trabalho tem por objetivos:

- Descrever a anatomia e a histologia do sistema reprodutor masculino das espécies *Lymanon dieloceri* e do parasitóide de *Myschocyttarus atramentarius*;
- Caracterizar a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides destes insetos
- Comparar os dados anatômicos obtidos com os existentes na literatura, procurando caracteres consistentes que possam contribuir para futuras análises filogenéticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Ninhos de *Digelasinus diversipes* (Hymenoptera, Argidae) e de *Myschocyttarus atramentarius* (Hymenoptera, Vespidae) foram coletados na zona rural de Viçosa e mantidos no laboratório. Logo após a emergência, parasitóides machos de Argidae, *Lymeon dieloceri*, e de *Myschocyttarus atramentarius* foram submetidos às metodologias para microscopias de luz e eletrônica de transmissão.

2.1. MICROSCOPIA DE LUZ

2.1.1. Morfologia

O sistema reprodutor de machos adultos foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fixados por 12 h em solução de glutaraldeído a 2,5% no mesmo tampão. Em seguida, eles foram lavados em água destilada, desidratados em uma série alcoólica crescente e incluídos em Histoiresina. Cortes de 2 µm, feitos em micrótomo rotativo com navalha de vidro, foram corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1% e montados com Entelan (Merck). Para as análises anatômicas e histológicas foram capturadas imagens com uma câmera digital acoplada a um microscópio estereoscópico Olympus SZ40 e a um microscópio Olympus CX-31, respectivamente.

2.1.2. Medição total e nuclear dos espermatozóides

Suspensão de espermatozóides extraídos de vesícula seminal foram espalhadas em lâminas histológicas e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, a temperatura ambiente. As preparações foram coradas com Giemsa por 15 min e, em seguida, lavadas em água corrente. Após secas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio (Olympus BX-50) equipado com contraste de fase.

Para medição nuclear, algumas das lâminas foram coradas por 15 min. com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml no mesmo tampão, lavadas e montadas com sacarose 50%. Essas lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência, Olympus, BX-50, equipado com filtro BP360-370 nm.

2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Testículos e ductos deferentes de adultos maduros foram dissecados e fixados por 24 horas, a 4°C, em solução de glutaraldeído 2,5% e ácido pícrico 0,2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, acrescido de 3% de sacarose. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão. A desidratação foi feita em uma série

alcoólica crescente (50, 70 90 e 100%) e a inclusão em Epon. Os cortes ultrafinos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2% em solução de hidróxido do sódio 1 N e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109).

3. RESULTADOS

3.1. Morfologia Geral do Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino de *Lymeon dieloceri*, parasitóide do Symphyta *Digelasinus diversipes* e do parasitóide do Vespidae *Myschocyttarus atramentarius* é formado por um par de testículos com um folículo cada, um par de glândulas acessórias, um par de ductos deferentes e um ducto ejaculatório (Figs. 1A, B). De cada testículo parte um ducto deferente fino e longo que tem sua porção inicial enovelada na base dos testículos (Fig. 1B). Uma cápsula de tecido conjuntivo envolve os dois testículos e os ductos deferentes até onde desembocam as glândulas acessórias, sendo que os testículos mais a porção enovelada dos ductos deferentes estão intimamente associados, formando “uma estrutura única” dentro dessa cápsula (Fig. 1A-C). Espermatozóides foram observados sempre individualizados em toda a extensão dos ductos deferentes, mas em maior concentração na região enovelada na base dos testículos (Fig. 1C). As glândulas acessórias possuem formato esférico no parasitóide do *M. atramentarius* e ovais em *L. dieloceri* (Fig. 1A). Neste, essas glândulas têm o epitélio pregueado, formado por células prismáticas altas com muitas vesículas claras na região basal (Fig. 1D). Elas são envolvidas externamente por células musculares e internamente o lúmen estreito é preenchido por secreção (Fig. 1D).

3.2. Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides

Os espermatozóides de *L. dieloceri* e do parasitóide de *M. atramentarius* são finos e longos (Figs. 1E, 4A). Em *L. dieloceri* eles medem cerca de 140 μm de comprimento (Fig. 1E). São formados pela região de cabeça e uma região de flagelo (Fig. 1E). A cabeça é formada pelo acrossomo, pelo núcleo e por uma terceira camada extracelular. Em ambas as espécies o acrossomo mede cerca de 1 μm e é composto pela vesícula acrossomal e o *perforatorium* (Figs. 2A-C, 4A-F). Em corte transversal, a vesícula acrossomal é circular (Fig. 4D) e, a medida que se aproxima do núcleo, torna-se ovalada (Figs. 2B, 4E). O *perforatorium* é recoberto pela vesícula acrossomal e sua se encaixa em uma pequena cavidade na ponta do núcleo (Figs. 2A-C, 4A-E). Uma camada de material extracelular recobre o acrossomo e parte do núcleo e, a partir dela, se irradiam inúmeros filamentos (Figs. 2A-C, 4B-F).

O núcleo é fino e longo, medindo aproximadamente 16 μm em comprimento em *L. dieloceri* (Fig. 1E). Ele é oval e preenchido por cromatina muito eletrondensa e compacta (Figs. 2A-E, 4A-F). Sua extremidade posterior é afilada em forma de cone, penetrando na extremidade anterior do axonema (Fig. 2D).

A região de flagelo é composta por um adjunto do centríolo, um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios (Figs. 2G, 3A-H, 5A-G). O adjunto do centríolo é eletrondenso, longo e, em corte longitudinal, circular (Figs. 3A, 5A). Ele se inicia anteriormente ao lado da região posterior do núcleo (Fig. 2D), segue em paralelo ao axonema (Fig. 2D) e a um dos derivados mitocondriais (Fig. 2E) e termina a frente do outro derivado mitocondrial (Fig. 2F).

O axonema apresenta o padrão de $9 + 9 + 2$ microtúbulos, sendo nove microtúbulos acessórios simples externos, nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais (Figs. 3B, C, 5A-C). Anteriormente, ele se inicia envolvendo a ponta posterior do núcleo (Fig. 2D) sendo o último a terminar no final do flagelo (Figs. 3H, 5G). Nesta região, a organização dos microtúbulos é desfeita e as duplas periféricas são as últimas a terminarem (Figs. 3E-H, 5E-G).

Os derivados mitocondriais, nas duas espécies, começam anteriormente em níveis diferentes. Ao lado da base do núcleo (Figs. 2E, 4G) e o outro na base do adjunto do centríolo (Figs. 2F, 4H). Em corte transversal, os dois derivados são piriformes em *L. dieloceri* e no parasitóide de *M. atramentarius* (Figs. 3B-D, 5 B-D) um é piriforme e o outro circular. Em *L. dieloceri* são formados basicamente por duas regiões bem distintas, uma eletrondensa e outra região eletronlucida (Figs. 3B-D). Corte transversal na região eletronlucida evidenciou uma fenda em forma de V, observada somente em *L. dieloceri*. Nesta espécie as cristas circundam o perímetro de ambos derivados (Figs. 3A, C, D). No parasitóide de *Myschocyttarus atramentarius* os derivados são assimétricos em diâmetro (Figs. 5B-E).

Os corpos acessórios são estruturas discretas, pouco eletrondensas, de formato indefinido em corte transversal e estão localizados entre os derivados mitocondriais e o axonema (Figs. 3D, 5C), mas não entre o axonema e o adjunto do centríolo (Figs. 3A, 5A).

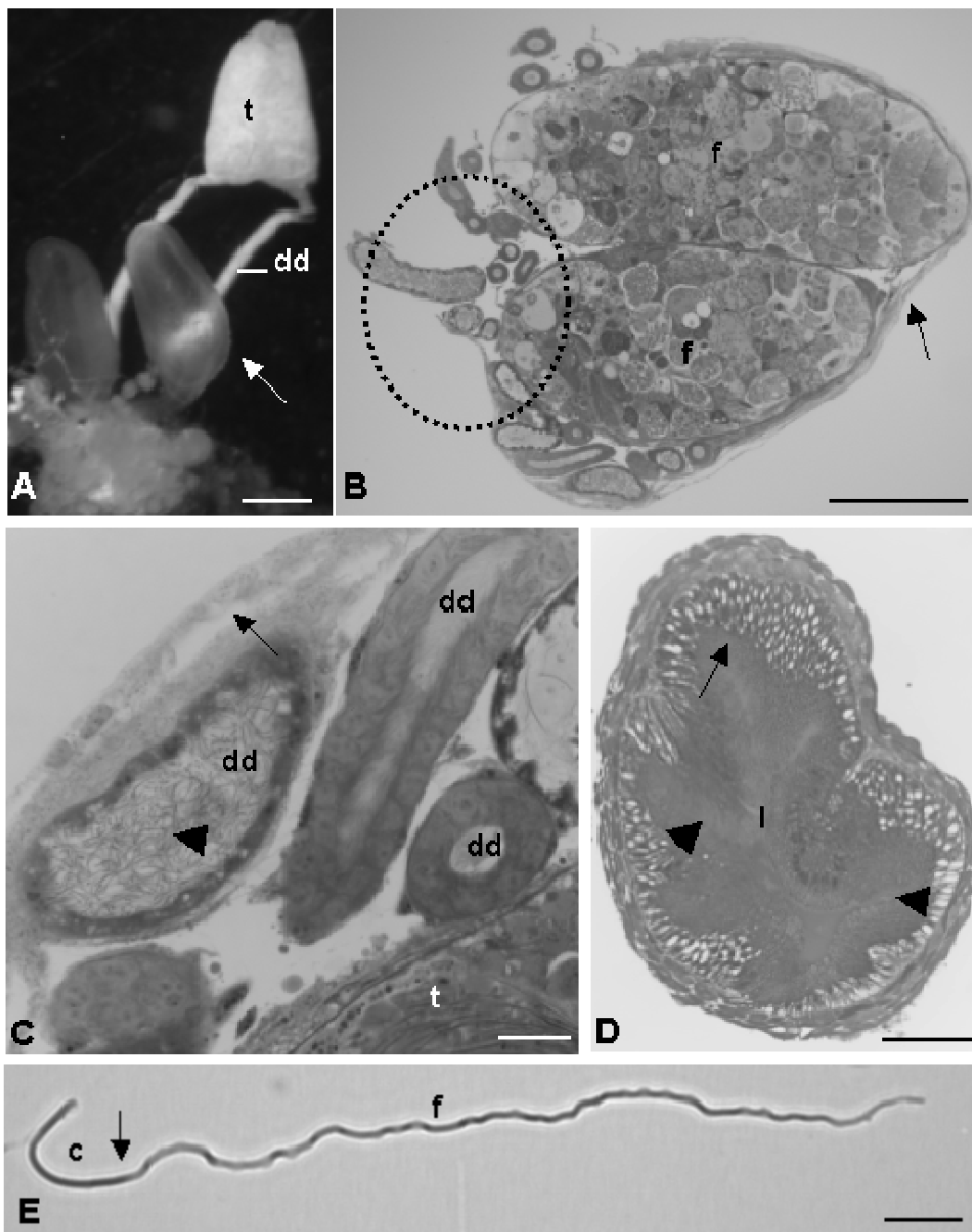


Figura 1. Micrografia de luz do aparelho reprodutor (A-D) e do espermatozóide (E) de *Lymeon dieloceri*. **A.** Anatomia do sistema reprodutivo com testículos (t) envolvidos pela cápsula testicular, ducto deferente (dd) e glândula acessória (seta). **B.** Corte longitudinal dos testículos mostrando os folículos (f) envolvidos pela cápsula conjuntiva (seta) e ductos deferentes (círculo tracejado). **C.** Corte transversal mostrando testículos (t), cápsula testicular (seta) e ductos deferentes (dd) contendo espermatozóides livres (cabeça de seta). **D.** Corte longitudinal da glândula acessória, mostrando as pregas do epitélio (cabeça de seta); vesículas de secreção (seta) e lúmen (l). **E.** Morfometria do espermatozóide mostrando o limite (seta) entre núcleo (n) e flagelo(f). Barras: A=0,5mm; B=100µm; C=D=35 µm e E=10 µm.

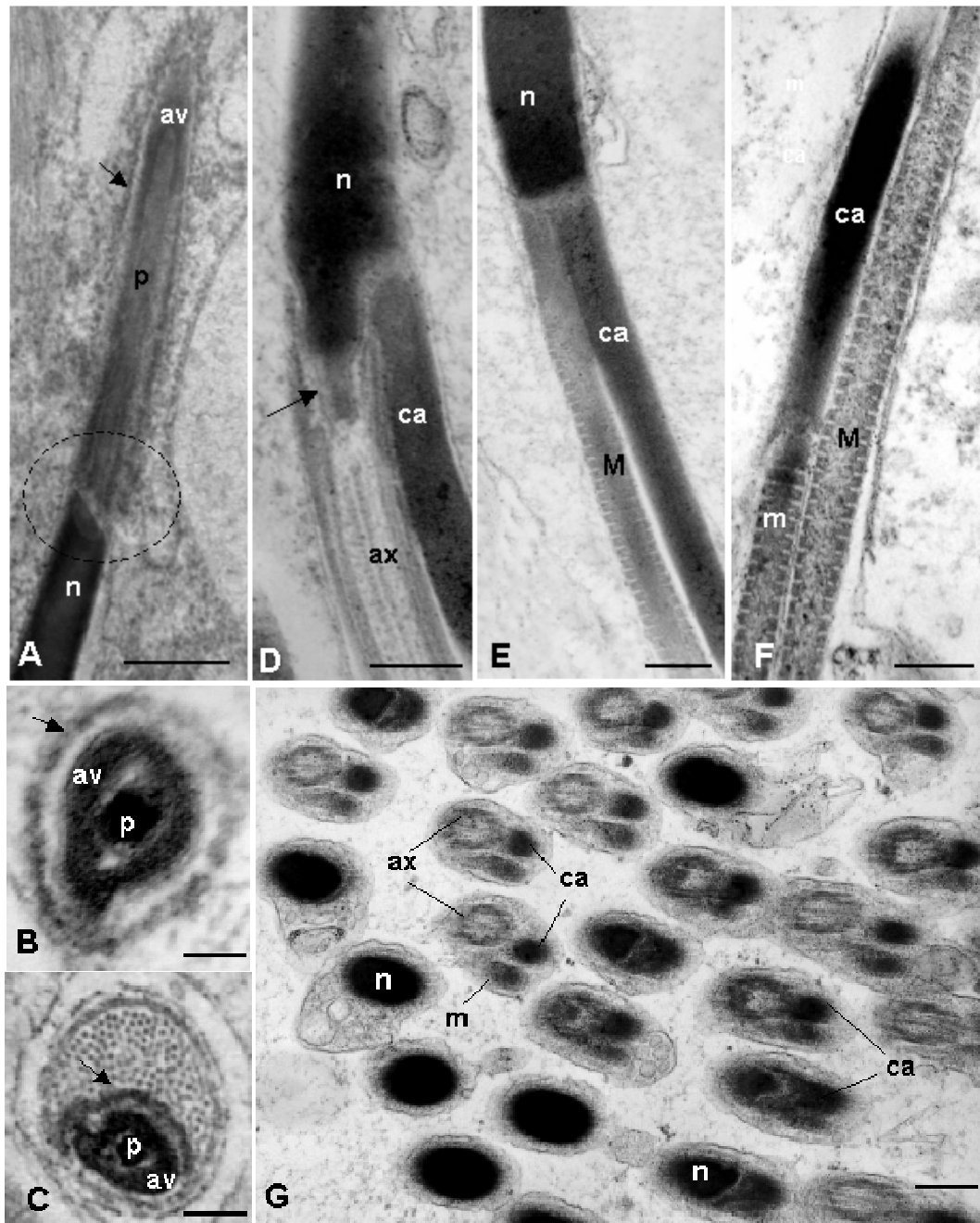


Figura 2. Electron-micrografias de corte longitudinal (A, D, E, F) e transversal (B, C, G) dos espermatozoides de *Lymeon dieloceri*. A. Região do acrossomo contendo camada extracelular (seta), vesícula acrossomal (av), *perforatorium* (p) e a inserção (círculo tracejado) deste no núcleo (n). B e C. Região de cabeça contendo (B) a camada extracelular (seta) envolvendo a vesícula acrossomal (av) e o *perforatorium* (p) e (C) microtúbulos em cabeleira. D-F. Transição núcleo axonema mostrando (D) extremidade posterior de núcleo (seta) penetrando no axonema (ax) ambos paralelos ao adjunto de centríolo (ac). (E) limite do núcleo (n) com adjunto de centríolo (ac) e o derivado maior (M). (F) derivado mitocondrial menor (m) começando após o adjunto de centríolo e paralelo ao derivado maior (M). (G) visão geral das regiões de núcleo e regiões de transição núcleo-flegelo. Barras A = E= 0,15 μ m; B,C,D,F= 0,05 μ m; G=0,2 μ m.

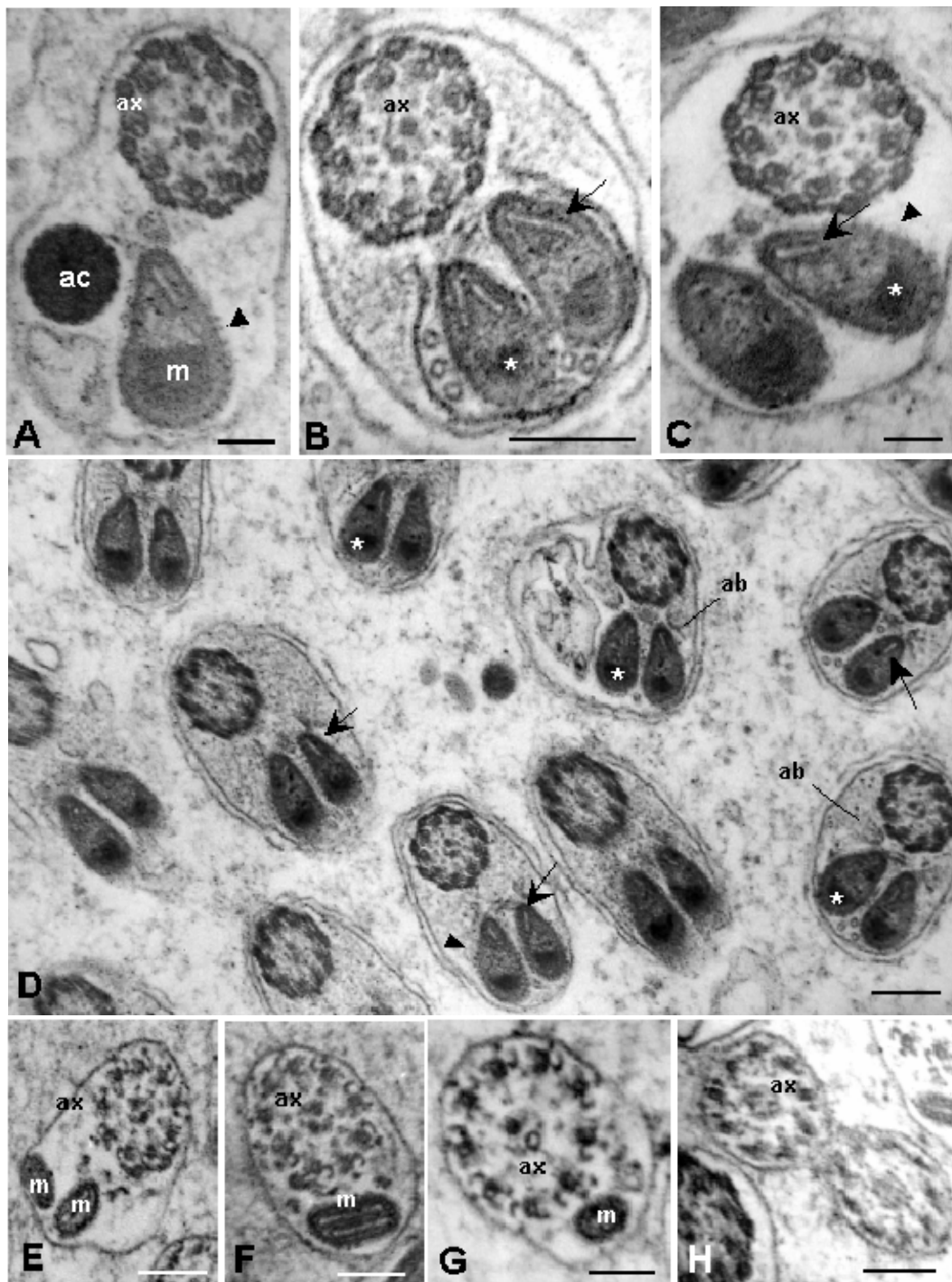


Figura 3. Electron-micrografias de cortes transversais da região flagelo dos espermatozóides de *L. dieloceri* mostrando (A) axonema (ax) localizado paralelamente ao adjunto de centríolo (ac) e ao derivado mitocondrial maior (m); (B) derivados mitocondriais simétricos apresentando uma região electron-lúcida na parte proximal (seta) e uma região elétron densa na parte distal de ambos (asterisco); (C) axonema (ax) formando por 9+9+2 microtúbulos; (D) visão geral da vesícula mostrando a região elétron lúcida (seta) e a região electron-densa (asterisco) corpos acessórios (ab) e as cristas circundando ambos derivados (cabeça de seta) em vários derivados; (E-H) regiões de terminação do flagelo com (E) a presença ainda de ambos derivados (F) posteriormente apenas um derivado acompanha a terminação do axonema; (G) ausência dos derivados simples externos e resquício do derivado maior; (H) ausência dos derivados centrais. Barras A-C =0,05 μm ; D=0,2 μm ; E-H= 0,1 μm .

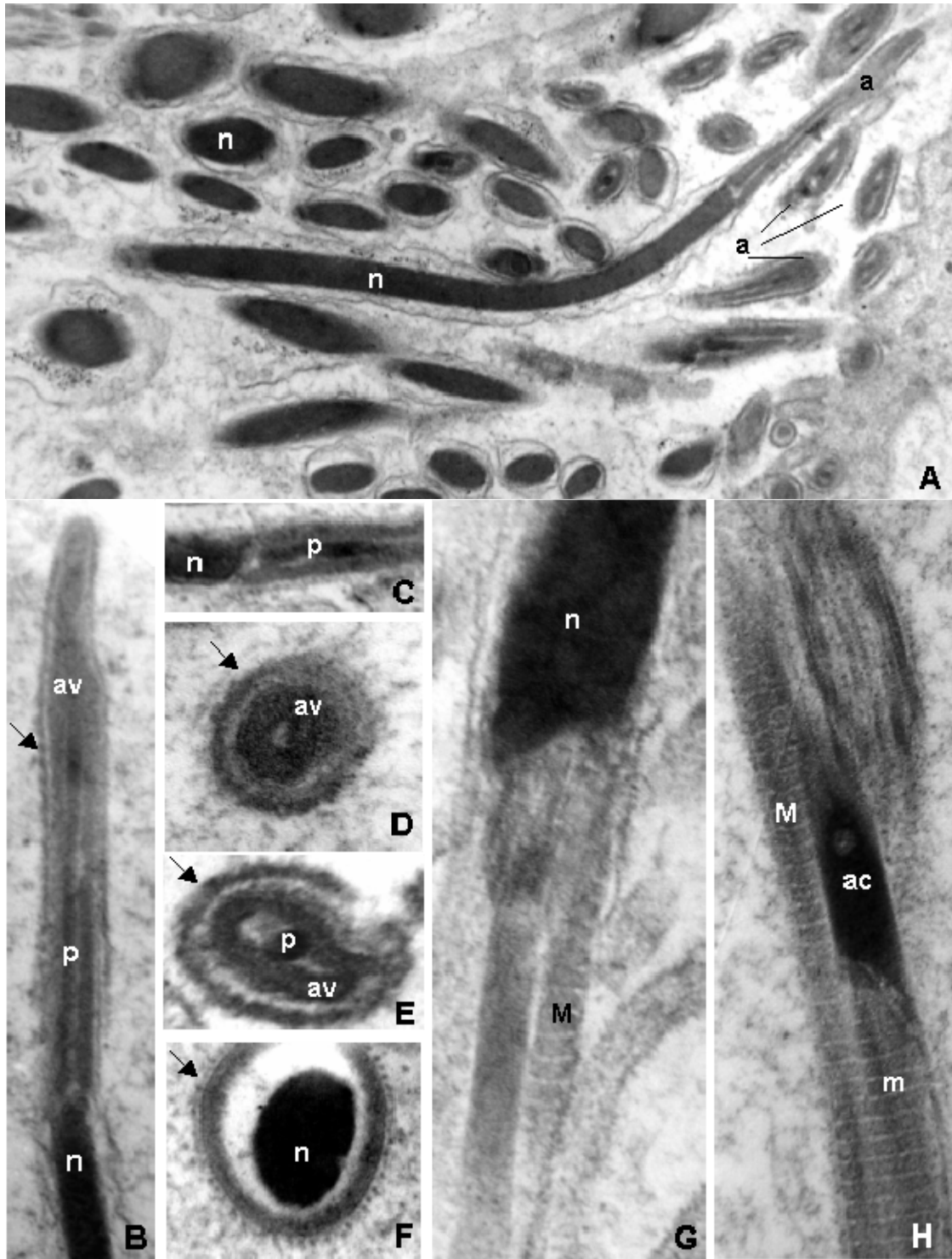


Figura 4. Electron-micrografias dos espermatozoides do parasitóide de *M. atramentarius*. **A.** região do ducto deferente contendo acrossomo (a) e núcleo (n) de alguns espermatozoides. **B-G.** Secção longitudinal da cabeça mostrando **(B)** a camada extracelular (seta) envolvendo a vesícula acrossomal (av) e o *perforatorium* (p); **(C)** transição *perforatorium*-núcleo. **D-E.** Secção transversal da cabeça mostrando **(D)** extremidade anterior do acrossomo com vesícula acrossomal circular (av) e camada extracelular (seta) e **(E)** região mediana do acrossomo mostrando vesícula acrossomal oval (av) e *perforatorium* circular (p). **(F)** Secção transversal da região de transição acrossomo-núcleo mostrando que a terceira camada (seta) cobre parte do núcleo (n). **(G).** Secção longitudinal da transição núcleo-flagelo mostrando a inserção do derivado mitocondrial maior (M) na base do núcleo (n) e **(H).** Secção longitudinal do flagelo mostrando a inserção do derivado mitocondrial menor (m) na base do adjunto de centríolo (ac) e estes paralelos ao derivado maior (M).

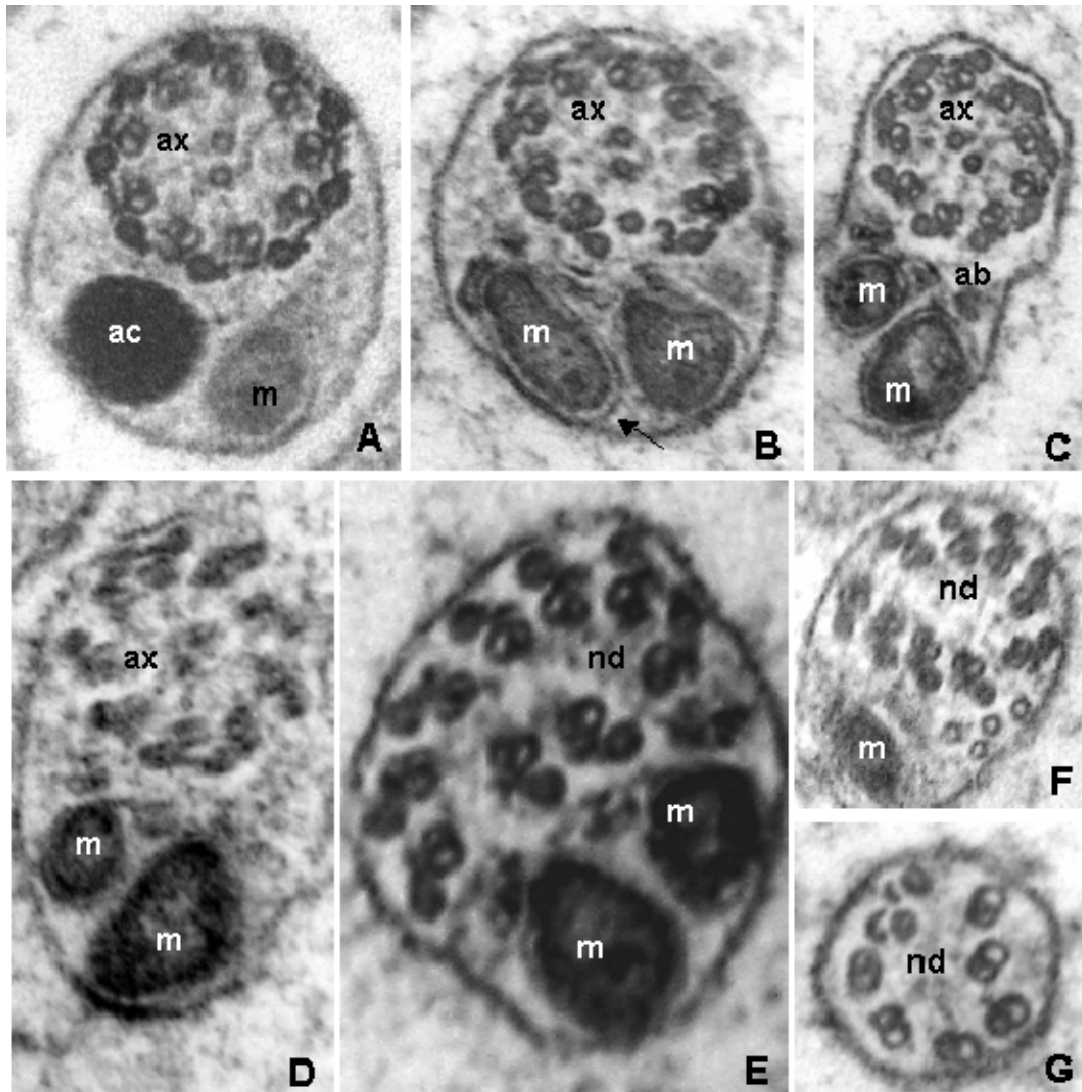


Figura 5. Electron-micrografias de cortes transversais da região de flagelo (A-G) do parasitóide de *M. atramentarius* mostrando: (A) axonema (ax) localizado paralelamente ao adjunto de centríolo (ac) e ao derivado mitocondrial maior (M); (B) axonema (ax) mostrando (9+9+2) microtúbulos e derivado mitocondrial maior (M) circundado por uma borda electron-lúcida (seta); (C) axonema (ax) formando por 9+9+2 microtúbulos, corpos acessórios (ab) e derivados mitocondriais (M e m) circundados pela borda electron-lúcida (seta); (D) derivados mitocondriais assimétricos em diâmetro e forma. (E-G) Regiões de terminação do flagelo mostrando: (E) ausência do par de microtúbulos centrais e ambos derivados mitocondriais ainda presentes; (F) posteriormente apenas as 9 duplas de microtúbulos e resquício de um derivado mitocondrial; (G) na extremidade posterior do axonema as nove duplas de microtúbulos.

4. Discussão

A morfologia do sistema reprodutor masculino de *Lymeon dieloceri*, parasitóide do Symphyta *Digelasinus diversipes*, e do parasitóide de *Myschocyttarus atramentarius* é semelhante àquela descrita para a maioria dos Hymenoptera, sendo formados por um par de testículos, dois ductos deferentes onde os espermatozóides estão estocados, duas glândulas acessórias e um ducto ejaculatório.

Todas as vespas parasíticas observadas, incluindo estas duas espécies, apresentam um folículo por testículo. Isso nos leva a supor que este seja o número padrão para este grupo de Hymenoptera. Pois, em Symphyta são observados vários folículos por testículo (observação pessoal) e, na maioria dos Aculeata, três ou mais. Entretanto, a formiga *Gnamptogenys striatula* (Lino-Neto, informação pessoal) apresenta apenas um folículo por testículo, sendo, até o momento, uma exceção para Aculeata.

Os espermatozóides de *L. dieloceri*, medindo 140 μm , é o mais longo já observado em Ichneumonidae, para os quais existem relatos de variação de 55 μm (Alomyinae, Quicke *et al.* 1992) a 100 μm (Ichneumoninae, Chauvin *et al.* 1988).

A morfologia dos espermatozóides das duas espécies aqui estudadas é semelhante àquela descrita para a maioria dos Hymenoptera. Eles consistem em: (1) um acrossomo formado pela vesícula acrossômica revestindo o *perforatorium*, o qual tem sua base inserida em uma cavidade na ponta do núcleo; (2) núcleo fino, longo e de cromatina eletrondensa; (3) um adjunto de centríolo eletrondenso e localizado entre o núcleo e um dos dois derivados mitocondriais; (4) um axonema com arranjo 9 + 9 + 2 microtúbulos; (5) dois derivados mitocondriais longos com cristas periféricas e; (6) dois corpos acessórios localizados entre os dois derivados mitocondriais e o axonema.

Os espermatozóides das duas espécies analisadas são lineares como ocorre em outros os Ichneumonidae (Quicke *et al.* 1992) e na maioria dos Aculeata (Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Wheeler *et al.*, 1990; Peng *et al.*, 1992, 1993; Lino-Neto & Dolder 2002, Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005a,b; Mancini *et al.*, 2006). Entretanto, esta característica diferencia os Ichneumonidae de outras vespas parasíticas como Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a) e Platygastroidea (Lino-Neto & Dolder, 2001b), as quais apresentam espermatozóides espiralados.

Uma camada de material extracelular recobrimo o acrossomo e parte do núcleo, com filamentos irradiando a partir dela, também parece ser característica de vespas

parasíticas, pois, além dessas duas espécies, já foi observada em outros Ichneumonidae (Quicke *et al.* 1992), Cynipoidea (Quicke *et al.* 1992; Newman & Quicke 1999a) e Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a). Entretanto, ela não foi observada em parasitóides da família Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a), como também não foi em Symphyta (Quicke *et al.* 1992; Newman & Quicke 1999a) e Aculeata (Hoage & Kessel 1968; Cruz-Höfling *et al.* 1970; Lensky *et al.* 1979; Wheeler *et al.* 1990; Peng *et al.* 1992, 1993; Lino-Neto & Dolder 2002; Zama *et al.* 2001, 2004, 2005; Araújo *et al.* 2005; Fiorillo *et al.* 2005a, b; Mancini *et al.* 2006). Os filamentos que irradiam desse material extracelular correspondem, provavelmente, a um glicocálice bastante desenvolvido.

O adjunto do centríolo localizado entre o núcleo e um dos derivados mitocondriais (assimétrico), como ocorre nestes Ichneumonoidea, parece ser o mais comum em Hymenoptera. Visto que também têm sido observados em outras superfamílias de parasitóides como Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000), em Symphyta (Newman & Quicke 1999a) e nos Aculeata, Vespidae (Mancini *et al.* 2006) e Apidae (Lino Neto *et al.* 2000b; Zama *et al.* 2001, 2004, 2005). Entretanto, nos parasitóides da superfamília Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.* 2000a; 2001b), no Symphyta *Tremex* sp. (Siricoidea) (Newman & Quicke 1999a) e em formiga (Moya *et al.* 2006) esse estrutura se localiza a frente dos dois derivados mitocondriais (simétrico).

Derivados mitocondriais simétricos em diâmetro, como observado em *L. dieloceri*, é uma característica comum a outros Ichneumonidae (Quicke *et al.*, 1992), em Chalcidoidea (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001b) e algumas formigas (Wheeler *et al.*, 1990; Wheeler & Krutzsch, 1992; Lino-Neto & Dolder 2002, Moya *et al.* 2006). Derivados assimétricos, observados no parasitóide de *Myschocyttarus atramentarius*, ocorrem na grande maioria dos Aculeata (Hoage & Kessel 1968; Cruz-Höfling *et al.* 1970; Lensky *et al.* 1979; Peng *et al.* 1992, 1993; Lino-Neto *et al.* 2000b; Zama *et al.* 2001, 2004, 2005; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.* 2005a, b Mancini *et al.* 2006). Como essa característica varia com uma frequência razoavelmente alta, ela se mostra bastante útil para estudos taxonômicos e também filogenéticos entre grupos próximos. Ela, inclusive, discrimina entre si as duas espécies aqui estudadas.

O número e o arranjo dos microtúbulos no axomena, observados nessas duas espécies, são considerados padrão para os insetos. Entretanto, no final do flagelo, os microtúbulos acessórios terminando antes do que as duplas periféricas vêm, cada vez

mais, confirmar essa característica como discriminatória para as vespas parasíticas (Lino-Neto *et al.* 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001b). Pois, nos Aculeata já estudados esses microtúbulos são os últimos a terminarem (Zama *et al.* 2001, 2004, 2005).

Com base no acima exposto nota-se que o sistema reprodutor e os espermatozóides de Hymenoptera apresentam diversidades estruturais que certamente poderão ser usadas para elucidar dúvidas de taxonomia e filogenia desse grupo de insetos. Entretanto, ainda precisa que mais espécies, representando outras famílias e superfamílias, sejam estudadas.

5. CONCLUSÃO

1. As duas espécies de parasitóides estudados se assemelham as outras espécies de vespas parasíticas por apresentarem uma camada extracelular envolvendo o acrossomo e diferem de Aculeata que apresentam o acrossomo não envolvido por este material;
2. Espermatozóides lineares agrupam estas espécies com Aculeata e os separam de Chalcidoidea e Palstygastroidea que apresentam espermatozóides espiralados;
3. As duas espécies de parasitóides apresentam a inserção do adjunto de centríolo ao lado da extremidade posterior do núcleo. Esta característica é nova para todas as espécies já observadas.
4. Derivados mitocondriais simétricos em diâmetro como ocorrem em *L. dielocery* é uma característica compartilhada com Chalcidoidea e todos os Ichneumonidae O parasitóide de *Myschocyttarus atramentarius* como todos os outros Apidae apresentam derivados assimétricos. Esta característica serve para separar as duas espécies de parasitóides
5. *L. dieloceri* apresenta uma fenda em forma de V na região eletrólucida de ambos derivados.
6. *L. dieloceri* apresenta cristas que circundam o perímetro de ambos os derivados.
7. As duplas de microtúbulos do axonema terminando por último na região de terminação do flagelo agrupam estas espécies com outras vespas parasíticas e as separam de Aculeata onde os microtúbulos acessórios simples são os últimos a terminarem;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, VA; Zama, U; Dolder, H; Lino-Neto, J (2005b) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Brazilian Journal of Morphological Sciences. 22 (3): 137-141.
- Baer, B; Boomsma, JJ (2004) Male reproductive investment and queen mating frequency in fungus growing ants. Behavioral ecology. Ecol. 15: 426-432.
- Báo, SN; Simões, DG; Lino-Neto, J (2004) Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia) sp.* Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). Journal Submicroscopic Cytology and Pathology. 36: 23-28.
- Caetano, FH (1980) Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). Naturalia. 5: 105-111.
- Chauvin, G; El Agoze, M; Hamon, C; Huignard, J (1988) Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 17: 359-366.
- Cherret, JM (1986) History of the leaf-cutting ant problem. In: Lofgren CS & Vander Meer RK. (eds.) Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management. Westview Press, Boulder. pp. 10-17
- Conte, M; Lino-Neto, J; Dolder, H (2005) Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): Fate of the atypical spermatids. Caryologia. 58 (2): 183-188.
- Cruz-Höfling, MA; Cruz-Landim, C; Kitajima, EW (1970) The fine structure of spermatozoa from the honey bee. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 42: 69-78.
- Ferreira, A ; Abdalla, FC ; Kerr, WE ; Cruz-Landim, C (2004) Systematics, Morphology and Physiology. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. Neotropical Entomology. 33: 569-576.
- Fiorillo, BS; Coelho, AAM; Lino-Neto, J; Báo, SN (2005a) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). Journal Submicroscopic Cytology and Pathology. 37: 75-81.

- Fiorillo, B; Lino-Neto, J; B ao, SN (2005b) Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera: Anthophoridae). Brazilian Journal of Morphological Sciences. 22 (Suppl.) 60-61.
- Forbes, J (1958) The male reproductive system of the army ant, *Eciton hamatum*. Proc. 10th Int. Cong. Emtomol. 593-596.
- Forbes, J; Do-Van-Quy, D (1965) The anatomy and histology of the male reproductive tract of the legionary ant *Neivamyrmex harrisi*. J. N. Y. Entomol. Soc. 73: 95-111.
- Gaston, KJ (1991) The magnitude of global insect species richness. Conservation Biology. 5: 283-296.
- Gauld, ID (1995) Introduction. p. 1-4. In: Hanson PE & Gauld ID (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. New York, Oxford University Press. 893 pp.
- Gauld, ID; Bolton, B (1988) The Hymenoptera. Oxford: Oxford University.
- Gauld, ID; Hanson, PE (1995) Introduction. The order Hymenoptera. p. 4-6. In: Hanson PE & Gauld ID (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. New York, Oxford University Press. 893 pp.
- Gonalves, MC (1991) Contribuio  o conhecimento da fauna de Gelinae (Hymenoptera, Ichneumonidae) da regi  o de S  o Carlos, S  o Paulo. 1991. Dissertao (Mestrado). Universidade Federal de S  o Carlos, S  o Carlos.
- Gonalves, MC (1995) Diagnose para as subtribos de Mesostenini (Hymenoptera: Ichneumonidae: Phygadeuontinae) com base em espécies da fauna brasileira. Tese (Doutorado). Universidade Federal de S  o Carlos, S  o Carlos.
- Guerra, TM (1993) Contribuio  o conhecimento da fauna de Ichneumonidae (Hymenoptera) da Estac  o Experimental de Ubatuba - SP. Dissertao (Mestrado). Universidade Federal de S  o Carlos, S  o Carlos.
- Guerra, TM (1999) A diversidade da fauna de Ichneumonidae (Hymenoptera) em uma área de mata mes  fila na regi  o de S  o Carlos, SP. Tese (Doutorado). Universidade Federalde S  o Carlos, S  o Carlos.
- Hanson, PE (1995) The Biology of Hymenoptera. Phytophagy in larval Hymenoptera. p. 32-36. In: Hanson PE & Gauld ID (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. New York, Oxford University Press. 893 p
- Hanson, PE; Gauld, ID (1995) The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, New York.

- Hoage, TR; Kessel, RG (1968) An electron microscopical study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee with special reference to replication and elimination. *Journal of Ultrastructure Research*. 24: 6-32.
- Hogge, MAF; King, PE (1975) The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*. 7: 81-96.
- Jamieson, BGM; Dallai, R; Afzelius, BA (1999) Development of the Insect Spermatozoon: Spermatogenesis. In B.Jamieson, R. Dalai & B. Afzelius (eds). *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, Inc., USA, 4-23.
- Johnson NF (1988) Midcoxal articulations and the phylogeny of the order Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America*. 81, 870-881.
- kumagai, AF (1984) Faunas urbana e rural de Ichneumonidae (Hymenoptera) da região de Curitiba, Paraná. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- kumagai, AF (1999) Fauna de Ichneumonidae (Hymenoptera) do Estado do Paraná e de Belo Horizonte, MG (Brasil). Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- LaSalle, J; Gauld, ID (1992) Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: J. LaSalle & I. D. Gauld (eds) *Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B. International, UK, pp. 1-26.
- Lee, PE; Wilkes, A (1965) Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. *Science*. 147: 1445-1446.
- Lensky, Y; Ben-David, E; Schindler, H (1979) Ultrastructure of the spermatozoon of the mature drone honeybee. *Journal of Apicultural Research*. 18: 264-271.
- Lino-Neto, J; Bão, SN; Dolder, H (1999) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 28: 253-259.
- Lino-Neto, J; Bão SN; Dolder, H (2000a) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 81: 205-211.
- Lino-Neto, J; Bão, SN; Dolder, H (2000b) Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue and Cell*. 32: 322-327.

- Lino-Neto, J; Dolder, H (2001a) Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*. 30: 89-96.
- Lino-Neto, J; Dolder, H (2001b) Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 82: 159-164.
- Lino-Neto, J; Dolder, H (2002) Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell*. 34: 124.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H (2006) Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Insectes Sociaux*. 53: 333–338.
- Moreira, J; Zama, U; Lino-Neto, J (2004) Release, behaviour and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Brazilian journal of morphological sciences*. 21: 185-189.
- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Delabie, J; Dolder, H (2006) Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 88: 181–187.
- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H (2007) The exclusive 9+9+1 axoneme of *Pseudomyrmex* penetrator spermatozoa (Hymenoptera:Formicidae) *Brazilian journal of morphological science, Supplement*. 22:55-56
- Newman, TM; Quicke, DLJ (1998) Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *Journal of Hymenoptera Research*. 7: 25-37.
- Newman, TM; Quicke, DLJ (1999a) Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera:Symphyta). *Journal of Hymenoptera Research*. 8: 35-47.
- Newman, TM; Quicke, DLJ (1999b) Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *Journal of Hymenoptera Research*. 8: 197-203.
- Newman, TM; Quicke, DLJ (2000) Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research*. 9: 62-70.

- O'Toole, C (1993) Diversity of native bees and agroecosystems. In: La Salle, J. & I. D. Gauld (eds.), Hymenoptera and Biodiversity, CBA International, Wallingford. pp. 160-196.
- Palomeque, T; Cano MA; Chica, E; Diaz de la Guardia, R (1990) Spermatogenesis in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). Cytobios. 62: 71-80.
- Peng, CYS; Yin, CM; Yin, LRS (1992) Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. Physiological Entomology. 17: 269-276.
- Peng, CYS; Yin, CM; Yin, LRS (1993) Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. Physiological Entomology. 18: 93-101.
- Porter, CC (1975) Relaciones zoogeograficas y origen de la fauna de Ichneumonidae (Hymenoptera) en la Provincia Biogeografica del Monte del Noroeste Argentino. San Miguel de Tucuman. Acta Zoologica Lilloana. 31(15): 175- 252.
- Porter, CC (1980) Zoogeografia de las Ichneumonidae Latino -americanas (Hymenoptera). San Miguel de Tucuman. Acta Zoologica Lilloana. 36: 5-52.
- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS; Gaitens, PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). Zoologica Scripta. 21: 381-402.
- Quicke, DLJ (1997) Parasitic wasps. Chapman & Hall. London. 470 pp.
- Rasnitsyn AP (1980) Origin and evolution of Hymenoptera. Transactions of the Paleontological Institute of the Academy of Sciences of the USSR. 174, 1-192.
- Rasnitsyn AP (1988) An outline of evolution of the hymenopterous insects. Oriental Insects. 22: 115-145.
- Roig-Alsina, A; Michener, CD (1993) Studies of the phylogeny and classification of long-tong bees (Hymenoptera: Apoidea). The University of Kansas Science Bulletin. 55: 123-162.
- Ronquist, F (1999) Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): The state of the art. Zoologica Scripta. 28, 3-11.
- Ruiz, SS (1995) Padrões de utilização de hospedeiros entre Ichneumonoidea (Hymenoptera, Braconidae e Ichneumonidae) em área de mata da Estação Ecológica de Bauru, SP. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Sharkey, MJ; Wahl, DB (1992) Cladistics of the Ichneumonoidea (Hymenoptera). Journal of Hymenoptera Research. 1: 15-24.

- Thompson, TE; Blum, MS (1967) Structure and behavior of spermatozoa of fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera – Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 60: 632-642.
- Townes, H (1969) The genera of Ichneumonidae (Part 1). *Memories American Entomology Institute, Gainesville*. 11: 1-300.
- Townes, H (1970a) The genera of Ichneumonidae (Part 2). *Memories American Entomology Institute, Gainesville*. 12: 1-537.
- Townes, H (1970b) The genera of Ichneumonidae (Part 3). *Memories American Entomology Institute, Gainesville*. 13: 1-307.
- Townes, H (1971) The genera of Ichneumonidae (Part 4). *Memories American Entomology Institute, Gainesville*. 17:1-372.
- Wahl, DB; Gauld, ID (1998) The cladistics and higher classification of the Pimpliformes. *Systematic Entomology*. 23: 265-298.
- Wahl, DB; Sharkey, MJ (1993) Superfamily Ichneumonoidea. *In: GOULET, H., HUBER, J. T. (Ed.). Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Ottawa: Research Branch. Agriculture Canada Publication,. cap. 10, p. 395-442.
- Wheeler, DE; Crichton, EG; Krutzsch, PH (1990) Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology*. 206: 343-350.
- Wheeler, DE; Krutzsch, PH (1992) Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *Journal of Morphology*. 211: 307–317.
- Wilkes, A; Lee, PE (1965) The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in hymenopteran *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 7: 609-619.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2001) Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research*. 10: 261-270.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2004) Structural and Ultrastructural of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell*. 1: 29-41.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H (2005) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux*. 52 (2): 122-131.

- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H (2005b) & Báo,S.N.The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera:Apoidea:Sphecidae), as indicative of bee relation. Jpurnal Submicroscopic Cytology and Pathology, 37: 313-321.
- Zama, U; Moreira, J; Báo, SN; Campos, LAO; Dolder, H; Lino-Neto, J (2007) Morphology of Testicular and Post-testicular Spermatozoa in *Microstigma arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. Arthropod Structure and Development. *In press*.
- Zessin, W (1985) Neue oberliassische Apocrita und die Phylogeny der Hymenoptera (Insecta:Hymenoptera) Deutsche Entomologische Zeitung N.S. 32:129-142.