

PATRIZIA MELLO COELHO

MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES DO PARASITÓIDE
Apanteles galleriae Wilkinson, 1932
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE: MICROGASTRINAE)

Dissertação 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 *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

T

Coelho, Patrizia Mello, 1971-

C672m Morfologia dos espermatozoides do parasitóide
2007 *Apanteles galleriae* Wilkinson, 1932 (Hymenoptera:
Braconidae: Microgastrinae) / Patrizia Mello Coelho.
– Viçosa, MG, 2007.
ix, 23f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 18-23.

1. Ultra-estrutura (Biologia). 2. Sêmen - Anatomia.
3. Himenóptero - Morfologia. 4. Himenóptero - Classi-
ficação. 5. Himenóptero - Reprodução. 6. Vespa -
Biologia. 7. *Apanteles galleriae*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.633

PATRIZIA MELLO COELHO

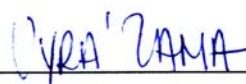
MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES DO PARASITÓIDE
Apanteles galleriae Wilkinson, 1932
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE: MICROGASTRINAE)

Dissertação 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 *Magister
Scientiae*.

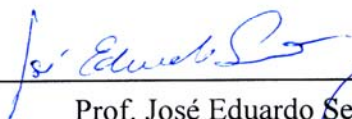
APROVADA: 11 de dezembro de 2007.



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



Profa. Uyrá dos Santos Zama
(Co-orientadora)



Prof. José Eduardo Serrão



Prof. Sérgio Luiz Pinto da Matta



Prof. José Lino Neto
(Orientador)

“O que diferia nos tecidos, segundo Hermínia, era a natureza do fio e a qualidade da trama. O fio tinha a marca do que havia, do que era dado, do inexorável e de deus. A trama, por outro lado, revelava a ordem humana, era o retrato da vontade do homem. Homem e deus brindavam no que era tecido, isso quando havia harmonia nas formas, quando havia beleza. A beleza nascia do consentimento silencioso entre o inexorável do fio e a nova ordem proposta pela trama. Quando o fio não se rende à trama, o resultado é um campo de batalha sem vitórias.”

Viviane Mosé

(Trecho do poema “Hermínia”, do livro Toda Palavra)

Aos meus pais e à querida avó Delza, que iluminaram todos os meus caminhos com infinito afeto e carinho, sendo sempre exemplos de fé e dedicação.

Às minhas irmãs, Cristiane, Daniela e Thays, pela amizade, confiança e estímulo para vencer os obstáculos da vida.

Ao amor da minha vida, Enzo, meu afilhado, que enche meus dias de felicidade, calma e ternura.

À minha sobrinha Ana, que chegou neste mês, pela esperança de dias cada vez melhores para a natureza humana.

Dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A realização deste estudo consistiu numa trajetória onde momentos de angústia e solidão, mas também compreensão e companheirismo se fizeram presentes. Ao seu término, a sensação que tenho, como disse Gandhi, é que “*a chegada não é nada comparada ao caminho*”. E neste caminho, permeado de dificuldades e incertezas, muitas pessoas foram fundamentais, contribuindo com suas críticas construtivas, apoio e solidariedade. Desta forma, tentarei relembrar algumas que concorreram neste esforço coletivo, porém, tenho a convicção de que muitas outras deveriam constar desta lista, sendo impossível citá-las nominalmente, mas a todas fica registrado meu agradecimento.

Dessa forma, agradeço sobretudo:

À Universidade Federal de Viçosa pela estrutura fornecida, desde o espaço físico, aos funcionários atenciosos e professores capacitados que transmitiram grandes ensinamentos.

À CAPES.

A Deus, pela presença em todos momentos de minha vida, principalmente nos mais difíceis e por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais José Altivo e Maria do Carmo, pelo companheirismo e constante apoio, contribuindo na realização dos meus ideais.

À minha sempre querida avó Delza e minha madrinha Sophia, pelas orações, carinho, amor e dedicação em todos os dias de minha vida.

Às minhas irmãs Cristiane, Daniela e Thays, que me incentivaram a todo momento.

Aos meus cunhados Marco Jr., Rafael e Frederico, também pelo apoio e incentivo.

Ao querido Enzo, por aceitar a minha ausência da convivência diária.

Aos meus tios, tias e primos (sintam-se todos incluídos!).

Ao meu mestre e orientador Dr. José Lino Neto, que acompanhou cada passo desta trajetória com dedicação, profissionalismo, amizade e reflexões que me proporcionaram a concretização deste projeto. Lino, muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos à co-orientadora Dra. Uyrá dos Santos Zama, que, com imensa dedicação, competência, compreensão e amizade, compartilhou seus conhecimentos. Uyrá, muito obrigada!!

Ao co-orientador Dr. Lucio Antonio de O. Campos, pelo profissionalismo e gentil esforço de sempre querer ajudar.

Ao amigo e mestre Dr. Sérgio Luiz Pinto da Matta, pelo profissionalismo, carinho, bom humor, atenção e gentileza.

Aos professores Dr. Clóvis Andrade Neves e Dra. Izabel Maldonado, do laboratório de Biologia Estrutural, que me atenderam em diferentes momentos e de diversas formas, possibilitando-me desenvolver o estudo.

Aos professores convidados para a banca de defesa, por terem aceitado meu convite e pelas valiosas contribuições que permitiram o aprimoramento deste trabalho.

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural: Drs. Sílvia, Mara, Serrão, João Marcos, Everaldo, Adilson e querida Tânia.

Às amigas Cláudia, Rejane, Reggiani e Mônica, pelos maravilhosos momentos compartilhados! Sem vocês este caminho teria sido muito árduo.

Aos amigos Vinícius e Jane pela amizade e competência. A ajuda de vocês foi essencial no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo!

Aos demais amigos do curso de Biologia Celular e Estrutural Sirlene, Max, Edson, Edmilson, Mariáurea, Michele, Gisele, Gláucia, Jaqueline, Katiane, Luiz, Fabiano, Marcos, Diego, Fabiana, Frederico, Marcília, Lamara, Edalton, Dani, Ana Paula e aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural Lílían e Alex, pela ótima convivência e contribuição na construção deste trabalho.

A Dra. Cláudia, pela paciência e profissionalismo no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e à Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura oferecida durante todo o mestrado.

Às funcionárias do Departamento de Biologia Geral: Beth, Rose, Diana e Salvadora.

À Escola Estadual Senador Levindo Coelho, Colégio Aplicação e Colégio Anglo que confiaram em meu êxito e me deram apoio sempre que precisei.

Àqueles que, de alguma forma e em algum momento, contribuíram para que eu chegasse até aqui: os amigos Anamares, Sônia, Paula, Déia, Marcus e Haroldo, pelos momentos prazerosos que passamos juntos.

Enfim, obrigada a todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

BIOGRAFIA

Patrícia Mello Coelho, filha de José Altivo Coelho e Maria do Carmo de Mello Coelho, nasceu em Ubá, Minas Gerais, Brasil, em 19 de março de 1971. Em agosto de 1994, obteve o título de bacharel em Odontologia pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora– MG, Brasil.

Em agosto de 1996 iniciou o curso de especialização em Periodontia “Lato Sensu”, na Universidade de São Paulo (USP), Bauru, Brasil, concluído em julho de 1997.

Em dezembro de 2000 obteve o título de licenciatura plena em Ciências – Habilitação em Biologia, pela Faculdade da Região dos Lagos, Cabo Frio – RJ, Brasil.

A partir de fevereiro de 2001 exerce atividade de docência, como professora do Ensino Médio, nas escolas particulares Colégio Aplicação e Colégio Anglo.

Em janeiro de 2004 iniciou o curso de especialização em Biologia “Lato Sensu”, na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Brasil, concluído em dezembro de 2006.

Em 2005 passou a fazer parte do quadro de professores efetivos do Ensino Médio da Secretaria de Educação do Estado de Minas Gerais, Brasil.

Também em 2005 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, Brasil, apresentando dissertação em dezembro de 2007.

Finalmente, em 2007, exerceu atividade de docência, como professora do Ensino Superior, pela Universidade Estadual de Minas Gerais (UEMG), Ubá-MG e Faculdades Sudamérica, Cataguases-MG, Brasil.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	01
1.1. A ordem Hymenoptera.....	01
1.2. A família Braconidae.....	02
1.3 Morfologia geral dos espermatozóides de Hymenoptera.....	04
2. Objetivos.....	06
3. Materiais e Métodos.....	07
4. Resultados.....	09
5. Discussão.....	13
6. Conclusão.....	17
7. Referências bibliográficas.....	18

RESUMO

COELHO, Patrícia Mello, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007.
Morfologia dos espermatozoides do parasitóide *Apanteles galleriae* Wilkinson, 1932 (Hymenoptera: Ichneumonoidea: Braconidae). Orientador: José Lino Neto.
Co-orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Uyrá dos Santos Zama.

Os Braconidae representam a segunda maior família de Hymenoptera e por serem vespas parasíticas de outros insetos são potencialmente importantes para o controle biológico. Como em outras famílias de Hymenoptera, nos Braconidae ainda há controvérsias em relação à sistemática de suas subfamílias, bem como entre eles e as outras famílias da superfamília Ichneumonoidea. A caracterização ultra-estrutural tem contribuído para o estudo filogenético de muitos grupos de animais, incluindo os insetos. Assim, neste trabalho descrevemos a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides do parasitóide *Apanteles galleriae*, utilizando as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides de *A. galleriae* são semelhantes àqueles descritos para os demais Braconidae não-ciclóstomos por: (1) se encontrarem entre os menores espermatozoides, medindo 12 µm de comprimento; (2) apresentarem axonema com arranjo 9 + 9 + 1 microtúbulos; (3) os dois derivados mitocondriais não apresentarem cristas e terem os diâmetros iguais e bem menores do que aquele do axonema e (4) possuírem os dois corpos acessórios de formato indefinido. Eles também apresentam características estruturais comuns apenas às vespas parasíticas, como uma camada espessa na membrana plasmática envolvendo o acrossomo e parte do núcleo e os microtúbulos acessórios do axonema terminando antes dos demais, mas não foi identificada qualquer estrutura que se assemelhe ao adjunto do centríolo. Entretanto, os espermatozoides desta espécie apresentaram características apomórficas como (1) acrossomo constituído apenas pela vesícula acrossomal e (2) filamentos de cromatina condensada na periferia lateral do núcleo. Portanto, esses dados confirmam que, em Hymenoptera, os espermatozoides fornecem caracteres morfológicos que podem ser usados em análises filogenéticas de diferentes níveis taxonômicos.

ABSTRACT

COELHO, Patrícia Mello, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2007.
Morphology of spermatozoa of the parasite *Apanteles galleriae* Wilkinson, 1932 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Braconidae). Adviser: Jose Lino Neto. Co-advisers: Lucio Antonio de Oliveira Campos and Uyra dos Santos Zama.

Braconidae represents the second largest family of Hymenoptera and, being parasitic wasps of other insects, are potentially important for the biological control. As other families of Hymenoptera, there is still controversy over the systematic of the Braconidae subfamilies, as well as between them and the other families of the Ichneumonidae superfamily. The ultra-structural characterization has contributed to the phylogenetic study of many groups of animals, including insects. Thus, this present work describes the structure and ultra-structure of the parasitoid *Apanteles galleriae* sperm, using light and transmission electron microscopy. *A. galleriae* sperms are similar to those described for other non-cyclostomes Braconidae: (1) they are the minors sperm, measuring 12 μm length, (2) axonemes with a 9 + 1 + 1 microtubules configuration, (3) the two mitochondrial derived products do not present cristae and have the same diameter, smaller than that of the axoneme and (4) two accessory bodies with a indefinite format. They also have structural features only common to parasitic wasps, as a thick layer in the plasmatic membrane that covers the acrosome and part of the nucleus and the axoneme microtubules accessories finishing before the others, but no other structure that approaches to the centriolar adjunct was identified. Although, sperms of this species have apomorphic characteristic as (1) the acrosome made only by the acrosomal vesicle and (2) condensed chromatin filaments in the periphery of the nucleus. Therefore, these data confirm that, in Hymenoptera, the sperms provide morphological characters that can be used in phylogenetic analysis at different taxonomic levels.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ordem Hymenoptera

Os Hymenoptera, com cerca de 250.000 espécies estimadas e aproximadamente 120 mil destas descritas (Gallo *et al.*, 2002), constituem uma das quatro maiores ordens de insetos. Embora haja divergência, atualmente são reconhecidas por volta de 80 famílias, divididas nas subordens Symphyta e Apocrita (Gauld & Hanson, 1995). Os Symphyta, considerados um grupo basal, correspondem a aproximadamente 5% das espécies já descritas. Os Apocrita contêm a grande maioria das espécies e são, ainda, divididos em Aculeata e não-Aculeata (Parasítica). Os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas. Este grupo representa pouco mais de 45% das espécies descritas, distribuídas entre as superfamílias Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea. É considerado o grupo mais derivado dentre os Hymenoptera por apresentar fêmeas com ferrão (LaSalle & Gauld, 1992). O grupo Parasitica é definido como sendo formado por todos os Apocrita que não tiveram o ovopositor modificado em ferrão. Este é o maior grupo de Hymenoptera e suas espécies são classificadas em 48 famílias, distribuídas em 11 superfamílias (Mason & Huber, 1993), sendo a maioria delas pertencentes às superfamílias Ichneumonoidea e Chalcidoidea (LaSalle & Gauld, 1992).

A ordem Hymenoptera, além de ser uma das mais ricas em espécies, é também uma das que apresentam maior diversidade biológica (Gaston, 1991). Foi nesta ordem que o comportamento social alcançou seu auge. Nos insetos, com exceção dos Isoptera, a eusociabilidade está presente apenas nos Hymenoptera. Existem grupos (abelhas e vespas) que exibem todas as gradações de organização social, de solitária a eusocial avançada.

Segundo Hanson (1995), os Hymenoptera contêm espécies de grande importância ambiental e econômica. Entre os membros fitófagos da ordem, as abelhas constituem o grupo mais importante de polinizadores, sendo essenciais à manutenção da diversidade das angiospermas. Além da polinização, as abelhas apresentam estimado valor comercial com a produção de mel, pólen, própolis e cera (Kerr, 2001).

Muitos himenópteros parasitóides são utilizados com sucesso em programas de controle biológico e integrado de pragas. Dentre eles, as famílias Ichneumonidae, Braconidae, Chalcididae, Encyrtidae, Trichogrammatidae, Scelionidae e Bethyidae

apresentam espécies que são os mais importantes agentes de controle biológico (Gauld & Bolton, 1988; La Salle & Gauld, 1992).

Devido à importância econômica e ecológica dos Hymenoptera, são necessários estudos que contribuam para a identificação e classificação adequadas das espécies. A maioria das propostas filogenéticas dos grupos se baseia em caracteres comportamentais, moleculares e, fundamentalmente, morfológicos externos (Rasnitsyn, 1980; Gauld & Bolton, 1988; Dowton & Austin, 1994; Dowton *et al.*, 1997; Ronquist *et al.*, 1999). Entretanto, ainda existem muitas incertezas sobre as relações evolutivas desta ordem de insetos, devido à sua considerável diversidade, ao seu grande número de espécies e ao pequeno tamanho da maioria dos himenópteros parasitóides, o que dificulta sua classificação (Dowton & Austin, 1994; Dowton *et al.*, 1997). Além dos dados anatômicos tradicionais e moleculares, a análise filogenética usando características morfológicas dos espermatozoides vem ganhando o interesse dos biólogos celulares e sistematistas. Estas células fornecem uma fonte de dados não tradicional, tendo seus caracteres uma natureza mais conservativa que os caracteres morfológicos usados costumeiramente. Por isso sua ultra-estrutura vem sendo largamente usada em estudos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Baccetti, 1972; Jamieson *et al.*, 1999).

1.2 A família Braconidae

Os Braconidae são considerados um grupo monofilético (Sharkey & Wahl, 1992) e, junto com os Ichneumonidae, formam uma das maiores superfamílias (Ichneumonoidea) de organismos vivos, com aproximadamente 100.000 espécies descritas. É a segunda maior família de Hymenoptera, com pelo menos 40.000 espécies distribuídas por todo o mundo (Newman & Quicke, 1998). Os braconídeos ocorrem em todas as áreas, parecendo não mostrar forte preferência seja por regiões temperadas ou tropicais, seja por habitats úmidos ou secos (Sharkey, 1993). São insetos pequenos e ativos, a maioria de coloração preta, castanha ou alaranjada e, como os demais parasitóides, apresentam estágios larvais que se desenvolvem sobre ou no interior de outros artrópodes, geralmente insetos (Sharkey, 1993). A maior parte das espécies de Braconidae consiste de parasitóides primários de outros insetos, embora existam registros de espécies fitófagas. Os hospedeiros mais comuns pertencem às ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (Wharton *et al.*, 1997). Muitos são parasitóides solitários, mas o gregarismo

também pode ser observado em algumas subfamílias (Matthews, 1974). Apesar da grande diversidade dos Braconidae, pouco se conhece sobre sua taxonomia. Várias espécies foram descritas muitas vezes incompletamente, sem ilustrações ou qualquer informação da biologia (Achterberg, 1988). Eles são divididos em dois grupos, os ciclóstomos e os não-ciclóstomos (Shaw & Huddleston, 1991).

A maioria dos Braconidae ciclóstomos constitui-se de ectoparasitóides idiobiontes de larvas de Lepidoptera e Coleoptera, porém muitos são endoparasitóides coinobiontes de Diptera, Homoptera, Lepidoptera, Isoptera e Embioptera (Sharkey, 1993). As fêmeas normalmente têm reservatório de veneno com musculatura bem desenvolvida e usam o veneno para paralisar seu hospedeiro pelo menos temporariamente. O desenvolvimento do parasitóide normalmente começa de imediato, com efeito pequeno, ou pelo menos não visível, no desenvolvimento do hospedeiro, que é rapidamente consumido. As subfamílias pertencentes a este grupo são: Alysiniinae, Aphidiinae, Opiinae, Rogadinae, Apozyginae, Braconinae, Doryctinae e Gnamptodontinae (Sharkey, 1993).

Os Braconidae não-ciclóstomos são todos endoparasitóides e a maioria é coinobionte, mas alguns podem ter passado secundariamente ao parasitoidismo idiobionte. As glândulas de veneno têm usualmente musculatura reduzida, sugerindo que pouco veneno é utilizado. Os hospedeiros mais comuns são larvas de Lepidoptera e Coleoptera. Normalmente o hospedeiro é parasitado num estágio inicial e o desenvolvimento do parasitóide prolonga-se até que a larva já tenha quase completado seu desenvolvimento. Neste estágio, o parasitóide se desenvolve rapidamente e consome o hospedeiro. As subfamílias que pertencem a este grupo são: Adeliinae, Agathidinae, Amicrocentrinae, Cardiochilinae, Cheloninae, Dirrhopinae, Euphorinae, Helconinae, Homolobinae, Ichneutinae, Knoikhoiinae, Macrocentrinae, Meteorideinae, Meteorinae, Microgastrinae, Miracinae, Neoneurinae, Orgilinae, Sigalphinae, Trachypetinae e Xiphoselinae (Sharkey, 1993).

Além da riqueza em espécies, os Braconidae são frequentemente empregados em programas de controle biológico, para a regulação de populações de pragas na agricultura, bem como na regulação de populações naturais de espécies fitófagas (La Salle & Gauld, 1992).

Um dos exemplos da utilização no controle biológico ocorre em apiários. As traças *Galleria mellonella* (Lepidoptera) e *Achroia grisella* (Lepidoptera) são consideradas pragas de apiários comerciais em regiões de clima subtropical ou temperado, constituindo-se fator de prejuízo econômico (Bambara & Ambrose, 1981). As fêmeas de

G. mellonella depositam seus ovos nas células dos favos das colméias, e, após a eclosão, as lagartas começam a se alimentar do mel e, posteriormente, da cera dos favos. No intuito de controlá-la sem prejudicar o meio ambiente, inimigos naturais são utilizados. Apesar dessa praga possuir vários inimigos naturais, o principal deles é o endoparasitóide *Apanteles galleriae* Wilkinson, 1932 (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae), cuja ocorrência no Brasil foi registrada por De Santis (1964). Após a eclosão no interior da lagarta, a larva do parasitóide alimenta-se de seus tecidos e, quando atinge o estágio de pré-pupa, emerge do hospedeiro causando sua morte. Transforma-se, então, em pupa dando origem em seguida a outra geração de vespas.

1.3 Morfologia geral dos espermatozóides de Hymenoptera

A descrição da morfologia dos espermatozóides de Hymenoptera na literatura inclui: espécies do grupo basal, **Symphyla** (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999a), do grupo **Aculeata**, representado por **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; Fiorillo *et al.*, 2005b), **Halictidae** (Fiorillo *et al.*, 2005a), **Sphecidae** (Zama *et al.*, 2005b, 2007), **Formicidae** (Thompson & Blum, 1967; Caetano, 1980; Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007), **Vespidae** (Mancini *et al.*, 2006), do grupo **Parasítica**, representado por **Eucoilidae** (Newman & Quicke, 1999b); **Eurytomidae** (Lino-Neto *et al.*, 1999), **Megalyridae** (Newman & Quicke, 2000), **Scelionidae** (Lino-Neto & Dolder, 2001a), **Ichneumonidae** (Chauvin *et al.*, 1988; Quicke *et al.*, 1992), **Trichogrammatidae** (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b) e **Braconidae** (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998).

Os espermatozóides dos Hymenoptera são, em geral, muito longos e finos, possuindo as regiões de cabeça e de flagelo. A cabeça compreende o acrossomo e o núcleo. Em geral, o acrossomo é formado por uma vesícula acrossomal e um *perforatorium*, cuja base está inserida em uma invaginação na extremidade anterior do núcleo. O núcleo é bastante alongado, com cromatina geralmente compacta e eletrondensa. Ele é conectado aos elementos do flagelo através do adjunto do centríolo, uma estrutura eletrondensa, cilíndrica e compacta.

Na grande maioria dos Hymenoptera, o flagelo é formado pelo axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Em geral, o axonema possui o arranjo

padrão de 9 + 9 + 2 microtúbulos, 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 at.* 2001). Os dois derivados mitocondriais são estruturas longas e paralelas ao axonema, podem conter ou não inclusões paracristalinas e, geralmente, um excede o outro em comprimento e, às vezes, em diâmetro.

Os outros dois componentes do flagelo, denominados de corpos acessórios (Baccetti 1972), são estruturas também longas, com secção transversal triangular e situadas entre o axonema e os derivados mitocondriais. Sua origem e função ainda não foram determinadas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo específico estudar a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides da vespa parasítica *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae).

Como objetivo geral pretende ampliar o conhecimento da estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides dos Braconidae, uma vez que a morfologia destas células, como na maioria dos Hymenoptera, tem-se mostrado bastante variada, o que nos leva a supor que estas informações serão relevantes em estudos taxonômicos e filogenéticos desse grupo de vespas parasíticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Machos adultos de *Apanteles galleriae* foram coletados a partir de lagartas do gênero *Achroia* que vivem em colméias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Esses indivíduos foram mantidos separados e alimentados com mel por cinco dias e, então, dissecados, com seus testículos e vesículas seminais retirados e processados para as microscopias de luz e eletrônica de transmissão de acordo com os protocolos abaixo.

3.1. MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.1. Medição total e nuclear dos espermatozóides

Machos adultos foram dissecados e tiveram suas vesículas seminais removidas e abertas sobre lâminas histológicas para o espalhamento dos espermatozóides. Estes foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por cerca de 15 minutos. Após lavagem em água destilada e secagem à temperatura ambiente, os espermatozóides foram observados e fotografados em fotomicroscópio (Olympus BX-50) equipado com contraste de fase. As medidas foram feitas usando o programa para análise de imagem Image Pro-Plus.

3.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

3.2.1. Morfologia Geral

Testículos e vesículas seminais foram fixados por cerca de 2 h em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, acrescido de sacarose 3%, ácido pícrico 0,2% e cloreto de cálcio 5 mM. Após lavá-lo por 1-2 h no mesmo tampão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% por 1-2 h e, em seguida, desidratado em uma série crescente alcoólica (30, 50, 70, 90 e 100%), diafanizado em acetona e incluído em resina Epóxi (Epon 812).

3.2.2. Citoquímica para proteínas básicas (E-PTA)

Testículos e vesículas seminais foram fixados por cerca de 2 h em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, acrescido de sacarose 3%, ácido pícrico 0,2% e cloreto de cálcio 5 mM. Após lavagem no mesmo tampão, foram desidratados em uma série crescente de etanol e contrastados em solução

de ácido fosfotúngstico a 1% em etanol absoluto (E-PTA), por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram diafanizados em acetona e incluídos em resina Epóxi (Epon 812).

Os cortes ultrafinos, exceto aqueles obtidos a partir do material submetido ao E-PTA, foram contrastados com soluções de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,2% em solução de hidróxido do sódio 1 N. Todos os materiais foram observados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 109), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, MG.

4. RESULTADOS

Os espermatozoides de *Apanteles galleriae* são lineares, finos, medem em média 12 μm de comprimento e, em microscopia de contraste de fase, é possível distinguir facilmente a região de cabeça da região de flagelo (Fig 1A). A cabeça, medindo aproximadamente 6,3 μm , compreende cerca de 50% do comprimento total do espermatozoide. Ela é formada por um acrossomo, com aproximadamente 0,7 μm de comprimento, seguido de um núcleo, medindo em torno de 5,6 μm , sendo que o acrossomo tem diâmetro ligeiramente maior do que aquele do núcleo (Fig. 1A).

A região da membrana plasmática que recobre o acrossomo e parte do núcleo apresenta um glicocálice bastante espesso, eletrondenso (Figs. 1E, G), do qual irradiam-se inúmeros filamentos (Fig. 1G-H).

O acrossomo é constituído apenas pela vesícula acrossomal que é totalmente preenchida por um material eletrondenso e finamente granular (Fig. 1B, C e E). Em corte longitudinal, ele apresenta a região mediana mais larga que a região anterior enquanto sua base é afilada lateralmente, sobrepondo-se à extremidade anterior do núcleo (Fig. 1B). Em corte transversal, o acrossomo é circular, embora a extremidade anterior apresenta-se elipsoidal (Figs. 1E e F).

O núcleo é linear e preenchido por cromatina bastante eletrondensa e compacta (Figs. 1B, C, G-H), porém se observam, na região anterior, filamentos de cromatina condensada e não compactada na sua periferia lateral (Figs. 1C, J e K). Em corte transversal, o núcleo apresenta formato circular (Fig. 1H). Em sua extremidade posterior, ele é abruptamente truncado, fazendo limite com o axonema e um dos derivados mitocondriais (Fig. 2A).

Quando submetido à técnica do E-PTA, o núcleo, assim como o acrossomo, se mostrou negativo, porém a camada de glicocálice na membrana plasmática que circunda estas estruturas é positiva (Fig. 1D e I).

Nenhum adjunto do centríolo foi observado na região de transição núcleo-flagelo (Figs. 2A e B). Já o flagelo é composto por um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios (Fig 2C). O axonema é do tipo 9 + 9 + 1 microtúbulos, sendo nove microtúbulos acessórios simples externos, nove duplas periféricas e somente um microtúbulo central (Fig. 2C). O axonema se inicia na base do núcleo, sendo o componente mais longo do flagelo. Posteriormente, começa a se desorganizar, perdendo primeiro os microtúbulos acessórios e o par central (Fig. 2E). Todos os microtúbulos são

E-PTA positivos (Fig. 2F). Nota-se o flagelo circundado por uma camada espessa de material e, mais externamente, uma membrana mais eletrondensa (Fig. 2D, E).

Os derivados mitocondriais se iniciam na base do núcleo, ao lado do axonema (Figs. 2A e B) e, em corte transversal, são simétricos, com diâmetros iguais e menores do que aquele do axonema, aproximadamente circulares, com uma linha bastante eletrondensa na região adjacente ao axonema (Fig. 2C). Eles apresentam eletrondensidade média, conteúdo homogêneo e não se observaram cristas mitocondriais (Fig. 2A-C).

Entre o axonema e cada um dos derivados mitocondriais se observa, em corte transversal, um corpo acessório de formato impreciso e com a mesma eletrondensidade dos derivados mitocondriais (Figs. 2C e D).

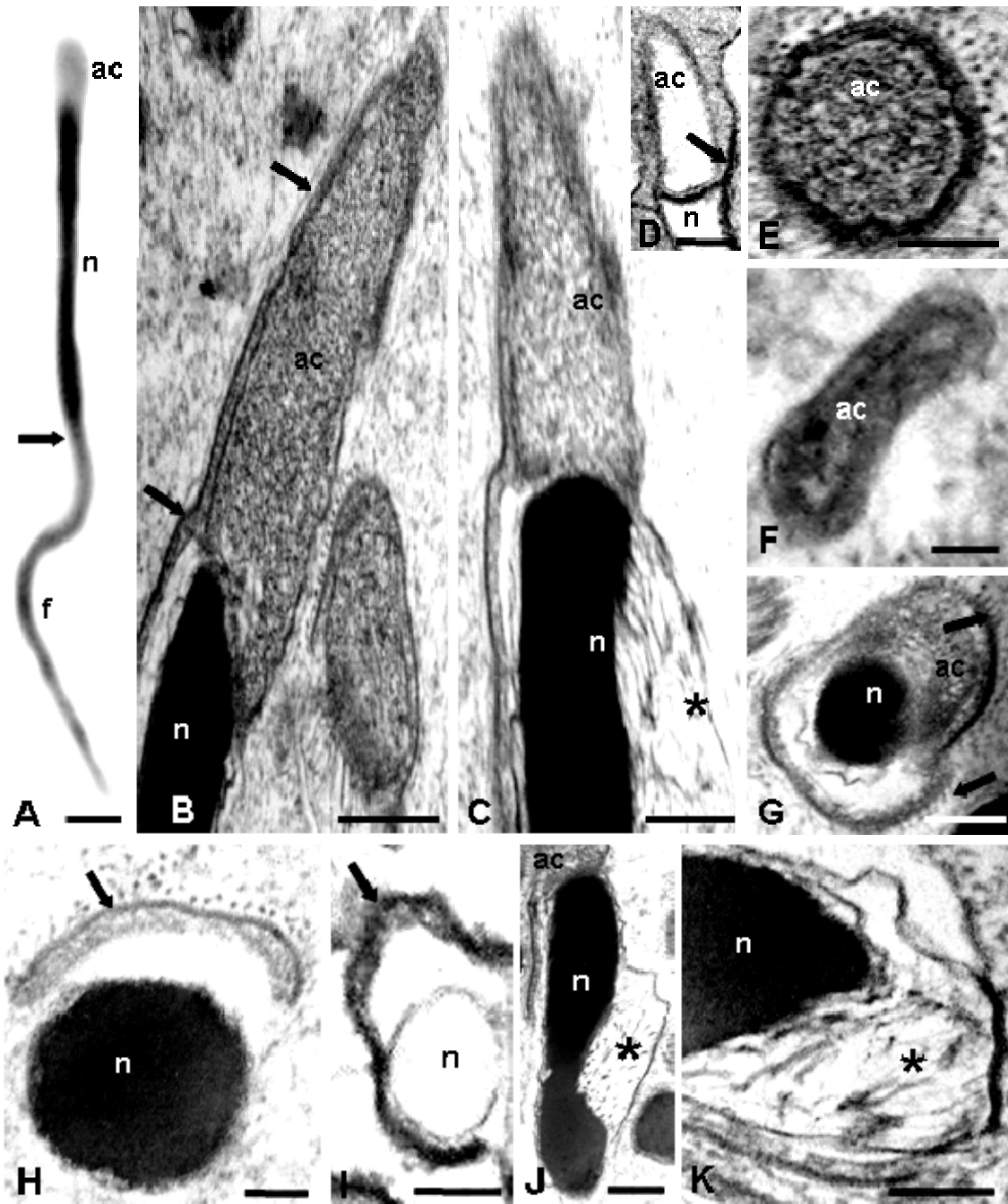


Figura 1. Morfologia do espermatozóide de *Apanteles galleriae*. **A** – Micrografia em contraste de fase de um espermatozóide. A seta indica a região de transição entre o flagelo (f) e a cabeça. Nesta se observa o acrossomo (ac) e o núcleo (n). **B e C** – Cortes longitudinais mostrando a transição acrossomo-nuclear. Note-se a membrana plasmática eletrondensa (setas); em B, o acrossomo chanfrado sobre a região anterior do núcleo e, em C, filamentos de cromatina não compactados (asterisco). **D** – Coloração com EPTA, mostrando a transição acrossomo-nuclear, a seta indica a região de membrana positiva. **E-F** – Cortes transversais do acrossomo, mostrando que ele é circular (E), mas elipsoidal na região anterior (F). **G-H** – Cortes transversais da região de transição acrossomo-nuclear e do núcleo, respectivamente. Note-se a membrana plasmática eletrondensa com filamentos de glicocálice (setas). **I** – Coloração com EPTA, mostrando a região nuclear, a seta indica a região de membrana positiva. **J-K** – Cortes na região nuclear, mostrando filamentos de cromatina não compactados na região periférica do núcleo e associados à cromatina compactada (asterisco). Barras: A = 1 μ m; B, C, E e J = 0,1 μ m; E, D, G, I e K = 0,05 μ m; H = 0,2 μ m.

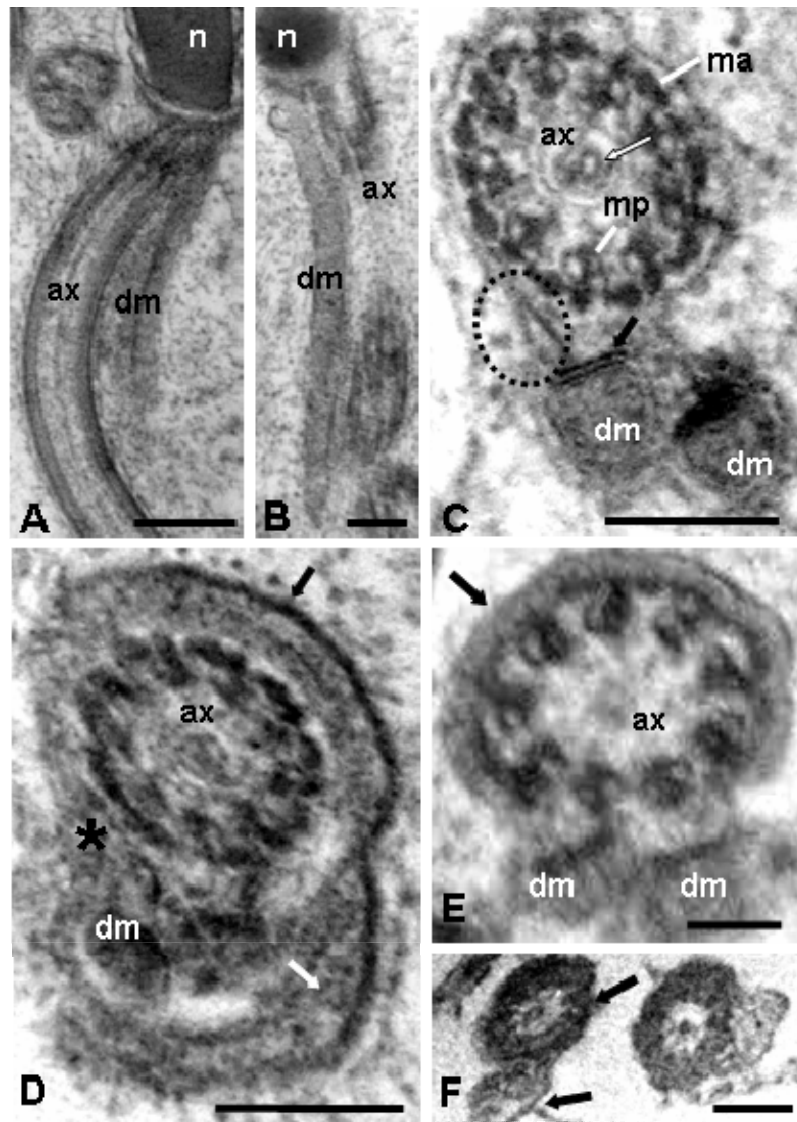


Figura 2. A-B – Seção longitudinal da região de transição núcleo-flagelo, mostrando o axonema (ax) e um dos derivados mitocondriais (dm) iniciando-se junto à base do núcleo (n). C-F – Cortes transversais do flagelo. C – Observa-se o axonema formado por nove microtúbulos acessórios (ma), nove duplas periféricas (mp) e um único microtúbulo central (seta branca). Há ainda, um corpo acessório (circulo tracejado) e os derivados mitocondriais (dm) com uma linha eletrondensa na região adjacente ao axonema (seta). D – Nota-se o flagelo circundado por uma camada espessa de material (seta branca) e, mais externamente, uma membrana mais eletrondensa (seta preta). E – Região final do flagelo, mostrando que, no axonema, as duplas periféricas de microtúbulos são as últimas a terminarem. Observe-se que a camada de material em volta dos elementos do flagelo ainda está presente (seta). F – Coloração com EPTA, onde observa-se que a membrana espessa (seta) e todos os microtúbulos do axonema são E-PTA positivos. Barras: A, C e D = 0,1 μ m; B = 0,2 μ m; E-F = 0,05 μ m.

5. DISCUSSÃO

A estrutura básica dos espermatozoides de *Apanteles galleriae* é semelhante ao observado em subfamílias de vespas parasíticas do grupo não-ciclóstomo de Braconidae (Quicke *et al.*, 1992). Eles consistem em: (1) uma espessa camada de material ao redor do acrossomo e parte do núcleo; (2) um axonema com arranjo 9 + 9 + 1 microtúbulos; (3) dois derivados mitocondriais simétricos, com diâmetro circular medindo aproximadamente 1/3 daquele do axonema e ausência de cristas visíveis; (4) dois corpos acessórios de formato indefinido.

Espermatozoides lineares, como ocorrem em *Apanteles galleriae*, são comuns na maioria dos Hymenoptera, incluindo vespas parasíticas das superfamílias Ichneumonoidea (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998), Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999) e Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000). Porém, em Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999; 2000a; 2001b) e Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a) os espermatozoides são espiralados.

Os espermatozoides de *Apanteles galleriae*, com aproximadamente 12 µm, têm comprimento muito próximo àqueles de *Apanteles* sp. que medem 14 µm, confirmando que os não-ciclóstomo têm espécies pequenas e, cujos espermatozoides variam entre 8 a 21 µm e nos quais a cabeça compreende cerca de 50% do comprimento (Quicke *et al.*, 1992). Esta característica diferencia as espécies desse grupo daquelas do grupo ciclóstomo, as quais apresentam espermatozoides medindo entre 80 a 170 µm, com a cabeça compreendendo até, no máximo, 20% do comprimento (Quicke *et al.* 1992). Também o diferencia de outras famílias de vespas parasíticas, nas quais foram observados espermatozoides variando de 100 µm a 620 µm de comprimento (Lino-Neto *et al.*, 1999; Newman & Quicke 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Lino-Neto *et al.*, 2000a, 2001b).

Embora Quicke *et al.* (1992) não tenham feito referência, as figuras apresentadas mostram que o Braconidae não-ciclóstomo Euphorinae, assim como *A. galleriae*, não apresenta *perforatorium* no acrossomo. Entretanto, a vesícula acrossomal desse Euphorinae, diferente de *A. galleriae*, apresenta uma cavidade central, semelhante ao que ocorre na maioria dos Hymenoptera (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001, 2004), incluindo os Braconidae ciclóstomos (Quicke *et al.*, 1992). Porém, nestes observa-se um *perforatorium* inserido nesta cavidade. E, finalmente, no

Scelionidae *Telenomus podis* não foi observado acrossomo (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Em *Apanteles galleriae*, a camada de material extracelular recobrimo o acrossomo e parte do núcleo nos espermatozóides está presente em todas as vespas parasíticas (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b) e por isso pode ser considerada uma sinapomorfia para este grupo de insetos. Esta camada está ligada à face externa da membrana e provavelmente apresenta açúcares, correspondendo a um glicocalix bastante desenvolvido, entretanto proteínas básicas devem estar presentes, pois, tanto nesta espécie como no Chalcidoidea *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto *et al.*, 1999), ela é E-PTA positiva. Ainda em Chalcidoidea acima referidos, observaram-se filamentos irradiando desta camada e, como também ocorre em *A. galleriae*, é possível sugerir que tais filamentos ocorram em todas as espécies em que esta camada esteja presente.

Em *Apanteles galleriae*, o núcleo apresenta-se linear como em outras vespas parasíticas, entre elas os Braconidae (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998) e Ichneumonidae (Chauvin *et al.*, 1988; Quicke *et al.*, 1992). Porém, se diferencia daqueles que se apresentam torcidos em espiral, como em Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b) e Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Na maioria dos Hymenoptera, bem como em *A. galleriae*, o núcleo dos espermatozóides apresenta a cromatina bastante eletrondensa e compacta. Entretanto, é comum observar, em algumas espécies, áreas eletrólúcidas nesta cromatina em algumas espécies, porém com características distintas. Por exemplo, em *A. galleriae*, estas áreas se localizam na periferia antero-lateral do núcleo e apresentam delgados filamentos irradiando da cromatina compacta. Já em formigas do gênero *Pseudomyrmex* (Moya *et al.*, 2007) elas se localizam ao redor e ao longo de todo o núcleo, apresentando grumos de cromatina; em *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto *et al.*, 1999) e em *Solenopsis invicta* (Lino-Neto & Dolder, 2002) elas aparecem no interior do núcleo. Na maioria dos Hymenoptera, bem como em *A. galleriae*, o núcleo é E-PTA negativo. Entretanto, em abelhas das tribos Bombini (Zama, 2003), Meliponini (Zama *et al.*, 2004) e Euglossini (Zama *et al.*, 2005a) ele apresenta áreas fortemente E-PTA positivas.

Apanteles galleriae, apresentando os derivados mitocondriais equivalentes em diâmetro (simétricos) é semelhante a outros Ichneumonoidea (Quicke *et al.*, 1992) e Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001b). Entretanto,

esta característica é diferente para Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b) e Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000), nas quais os derivados são assimétricos. Ainda em *Apanteles galleriae*, como em outros Braconidae não-ciclóstomos (Quicke et al., 1992), nos derivados mitocondriais não se observam cristas e, em corte transversal, seu diâmetro circular mede aproximadamente 1/3 daquele do axonema. Já os derivados dos Braconidae ciclóstomos apresentam cristas, têm diâmetro maior e geralmente alongado (Quicke et al., 1992).

Na maioria dos Hymenoptera, incluindo os Braconidae ciclóstomos (Quicke et al., 1992), o axonema apresenta o arranjo padrão 9+9+2 microtúbulos, sendo 9 microtúbulos acessórios externos, 9 duplas periféricas e um par central. Já nos axonemas dos Braconidae não-ciclóstomos Quicke et al. (1992) sugerem que falta o par central de microtúbulos e que, em algumas seções, foi observado apenas um material amorfo denso nessa região. Entretanto, nas figuras 10B-D do não-ciclóstomo Euphorinae (Quicke et al., 1992) observa-se a presença de dois microtúbulos centrais. Em *A. galleriae*, de fato, não ocorre o par central, entretanto, em vez de um material amorfo, foi observado um microtúbulo. Assim, nos parece mais acertado supor que nos não-ciclostomos há subfamílias, como Euphorinae, que apresentam dois microtúbulos centrais e subfamílias, como Microgastrinae, que apresentam apenas um.

Na região final do flagelo em *A. galleriae*, o fato dos microtúbulos acessórios do axonema terminarem antes do que as duplas periféricas, vem, cada vez mais, confirmar essa característica como sinapomórfica para vespas parasíticas (Newman and Quicke, 1998; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b). Já em Aculeata os microtúbulos acessórios ou terminam por último (Zama et al. 2001, 2004, 2005; Fiorillo et al. 2005) ou todos terminam praticamente juntos (Lino-Neto & Dolder, 2002).

Em *A. galleriae*, todos os microtúbulos responderam positivamente ao método de E-PTA, diferentemente do que ocorre em Sphecidae (Zama et al., 2005d), Apini (Lino-Neto et al., 2000b), Meliponini (Zama et al., 2004) e Euglossini (Zama et al., 2005), onde apenas os microtúbulos centrais são E-PTA positivos. Já em Bombini (Zama, 2003), os microtúbulos acessórios e os centrais são positivos, enquanto que os microtúbulos das duplas são negativos.

Em Euphorinae e Microgastrinae, subfamílias do grupo não-ciclóstomo de Braconidae (Quicke et al., 1992), bem como em *A. galleriae*, os corpos acessórios não apresentam forma definida. Entretanto, na maioria dos Hymenoptera, bem como nos

Braconidae ciclóstomos (Quicke *et al.*, 1992), é nítida a forma triangular dessas estruturas.

De acordo com as informações acima, nota-se que na família Braconidae, assim como nos demais Hymenoptera, os espermatozóides apresentam diversidades estruturais que certamente poderão ser utilizadas para resolver incertezas sobre as relações filogenéticas entre as suas subfamílias, bem como entre essa família e as demais do grupo Parasítica.

6. CONCLUSÃO

A morfologia dos espermatozóides de *Apanteles galleriae* apresenta como características:

1. autapomórficas - (1) a vesícula acrossomal sem cavidade central e (2) presença de filamentos de cromatina condensada e não compactada na periferia lateral do núcleo.
2. em comum com os Braconidae não-ciclóstomos - (1) espermatozóides muito pequenos; (2) axonema com arranjo 9+9+1 microtúbulos; (3) dois derivados mitocondriais sem cristas e com diâmetro bem menor do que o do axonema; (4) corpos acessórios de formato indefinido.
3. em comum com as vespas parasíticas - (1) a camada de glicocálice espessa na região da membrana plasmática que recobre o acrossomo e parte do núcleo, com filamentos irradiando a partir dela e (2) os microtúbulos acessórios do axonema sendo os primeiros a terminarem na região final do flagelo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achterberg, C van (1988) Revision of the subfamily *Blacinae Foerster* (Hymenoptera: Braconidae). *Zoologische Verhandelingen*, 249: 1-324.
- Araujo, VA; Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2005) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptatrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science*, 22:137-141.
- Baccetti, B (1972) Insects sperm cells. *Advances in Insects Physiology*, 9: 315-397.
- Bambara, SB; Ambrose, JT (1981) The parasites of the greater wax moth, *Galleria mellonella* observed in North Carolina. *American Bee Journal*, 121: 104-105.
- Báo SN; Simões DG; Lino-Neto J (2004) Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis* (*Exomalopsis*) *auropilosa* Spinola 1883 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.
- 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 honeybee. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 69-78.
- De Santis, L (1964) Sobre as especies brasileñas del genero *Elasmus*. *Revista Agrícola*, 39: 89-92.

- Dowton, M; Austin, AD (1994) Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 9911-9915.
- Dowton, M; Austin, AD; Dillon, N; Bartowsky, E (1997) Molecular phylogeny of the apocritan wasps: The Proctotrupomorpha and Evaniomorpha. *Systematic Entomology*, 22: 245-255.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.A.M., Lino-Neto, J., & Bao, S.N. (2005a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 75-81.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto J; Bao SN (2005b) Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Anthophoridae). *Brazilian Journal Morphological Science*, 60-61.
- Gallo, D et al. (2002) Entomologia Agrıcola. *Piracicaba: FEALQ*, 920 p.
- Gaston, KJ (1991) The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology*, 5: 283-296.
- Gauld, ID; Bolton, B (1988) The Hymenoptera. *Oxford University Press*.
- Gauld, ID; Hanson, PE (1995) The evolution, classification and identification of the Hymenoptera. In P E Hanson; ID Gauld (Eds) The Hymenoptera of Costa Rica. *Oxford University Press*, New York, 138-156.
- 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.
- Jamieson, BGM; Dallai, R; Afzelius, BA (1999) Insects: their spermatozoa and phylogeny. *Scientific Publishers Enfield*, 4-23.

- Kerr, WE; Carvalho, GA; Silva, AC; Assis, MGP (2001) Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, número 12, Setembro.
- LaSalle, J; Gauld, ID (1992) Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In LaSalle, J; Gauld, ID (Eds.) *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, UK, pp. 1-26.
- Lensky, Y; Ben-David, E; Schindler, H (1979) Ultrastructure of the spermatozoan 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*, 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 & 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*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J; Dolder, H (2002) Sperm structure and of ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell*, 34: 124.
- Lensky, Y; Ben-David, E; Schindler, H (1979) Ultrastructure of the spermatozoan of the mature drone honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 18: 264-271.
- Mason, WRM; Huber, JT (1993) Order Hymenoptera. In H, Goulet; JT Huber (Eds.) *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Canada Communication Grop. Ottawa, Canadá, pp. 4-12.

- Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos., LAO; Dolder, H (2006) Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux*, 53: 333-338.
- Matthews, RW (1974) Biology of Braconidae. *Annual Review of Entomology*, 19: 15-32.
- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H (2007) The exclusive 9+9+1 axoneme of *Pseudomyrmex penetrator* spermatozoa (Hymenoptera: Formicidae). *Brazilian Journal Morphological Science*, 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 and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research*, 9: 62-70.
- 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.
- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS; Gaitens, PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Script.*, 2: 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.

- Ronquist, F; Rasnitsyn, AP; Roy, A; Eriksson, K; Lindgren, M (1999) Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. *Zoologica Scripta*, 28: 13-50.
- Sharkey, MJ; Wahl, DB (1992) Cladistics of the Ichneumonoidea (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, 1: 15- 24.
- Sharkey, MJ (1993) Marjoriella, a new neotropical genus of Agathidinae (Braconidae, Hymenoptera). *Contributions of the American Entomological Institute*, 20: 94-100.
- Shaw, MR; T, Huddleston (1991) Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Handbooks for the Identification of British Insects*, 11: 1-26.
- 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.
- 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.
- Wharton, RA; Marsh, PM; Sharkey, MJ (1997) Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera). Washington: *Epecial Publication of the International Hymenopterists*, 1: 1-439.
- Wheeler, DE; Crichton, EG; Krutzsch, PH (1990) Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology*, 206: 343-350.
- Zama U (2003) Estudo Estrutural e Ultraestrutural dos Espermatozóides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com Considerações Filogenéticas. Tese DS . Universidade de Campinas, Brasil.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H (2001) Ultrastructure of Spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* (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; Dolder, H (2005a) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux*, 52: 122-131.
- Zama, U; Brito, P; Lino-Neto, J; Campos, LAO; Dolder, H; Bao, SN (2005b) The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 313-321.
- Zama, U; Moreira, J; Bao, SN; Campos, LAO; Dolder, H; Lino-Neto, J (2007) Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure and Development*, 36: 304 – 316.