

CLIVER FERNANDES FARDER GOMES

**MORFOLOGIA DO OVÁRIO E ESPERMATECA DO FORÍDEO PARASITOIDE
Eibesfeldtphora tonhascai BROWN (DIPTERA: PHORIDAE)**

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
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F221m Farder-Gomes, Cliver Fernandes, 1990-
2017 Morfologia do ovário e espermateca do forídeo parasitoide
Eibesfeldtphora tonhascai Brown (Diptera: Phoridae) / Cliver
Fernandes Farder-Gomes. – Viçosa, MG, 2017.
vi, 33f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.24-33.

1. Forídeo. 2. Morfologia (Animal). 3. Ovários.
4. Espermateca. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Entomologia. II. Título.

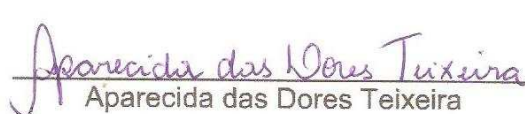
CDD 22 ed. 599

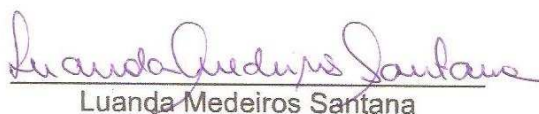
CLIVER FERNANDES FARDER GOMES

**MORFOLOGIA DO OVÁRIO E ESPERMATECA DO FORÍDEO PARASITOIDE
Eibesfeldtphora tonhascai BROWN (DIPTERA: PHORIDAE)**

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: 22 de fevereiro de 2017.


Aparecida das Dores Teixeira


Luanda Medeiros Santana


José Eduardo Serrão
(Orientador)

Agradecimentos

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Cássia e o meu pai Jorge, pelo amor incondicional, incentivo e compreensão durante todos esses anos longe de casa. Muito obrigado!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade e estrutura para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Serrão, por todos os ensinamentos, orientação e acolhimento em seu laboratório. As lições que aprendi com o senhor no mestrado servirão para a vida toda. Você é um exemplo para mim como pessoa e pesquisador!

Ao meu coorientador e amigo Prof. Dr. Marco Antônio de Oliveira, por toda amizade, ajuda, puxões de orelha, estímulo e confiança durante todos esses anos. Aprendi muito com você.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Cola Zanuncio, por me acolher em seu laboratório logo quando cheguei a Viçosa e por todos os valiosos ensinamentos sobre escrita científica.

Aos membros da banca, Aparecida das Dores Teixeira e Luanda Medeiros Santana, pelas valiosas sugestões.

À minha namorada Pollyana e minha adorável sogrinha dona Maria das Graças pela paciência, carinho, amor e companheirismo durante todos esses anos.

Aos amigos e colegas do laboratório de Morfologia Interna de Insetos e do laboratório de Controle Biológico de Insetos por toda ajuda e

agradável convívio. Agradeço especialmente a Angélica Plata pelo acolhimento e ajuda desde que cheguei a Viçosa e a Helen Santos pelo auxílio, amizade e ensinamentos em todas as etapas da dissertação.

Sumário

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	3
2.1 Obtenção dos parasitoides.....	3
2.2 Dissecção e morfologia externa do aparelho reprodutor.....	3
2.3 Microscopia de luz (ML).....	4
2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	4
3. Resultados.....	5
3.1 Morfologia do ovário.....	5
3.2 Morfologia da espermateca.....	13
4. Discussão.....	18
4.1 Morfologia do ovário.....	18
4.2 Morfologia da espermateca.....	22
5. Conclusão.....	23
6. Referências bibliográficas.....	24

Resumo

FARDER-GOMES, Cliver Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Morfologia do ovário e espermateca do forídeo parasitoide *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae).** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: José Cola Zanuncio e Marco Antonio de Oliveira.

O forídeo *Eibesfeldtphora tonhascai* (Diptera: Phoridae) é um parasitoide das formigas cortadeiras *Atta sexdens* Forel e *Atta laevigata* Smith (Hymenoptera: Formicidae). Os estudos sobre este parasitoide estão restritos ao seu comportamento de parasitismo. Além disso, não há estudos sobre a reprodução deste parasitoide e neste caso, a morfologia é usualmente a ferramenta mais adequada para propor hipóteses funcionais sobre a reprodução. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia do ovário e espermateca de *E. tonhascai*. As amostras foram processadas segundo a metodologia convencional para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. *Eibesfeldtphora tonhascai* tem um par de ovários do tipo meroístico politrófico e duas espermatecas. O ovócito em estágios iniciais de desenvolvimento apresentou formato esférico e tamanho pequeno. O tamanho de toda a câmara ovocítica aumentou como resultado do acúmulo de vitelo no citoplasma do ovócito. As células foliculares iniciaram a deposição das camadas do córion e após sua deposição, essas células se degeneraram. Os ovócitos maduros possuíam formato elíptico e citoplasma repleto de grânulos. A parede do reservatório da espermateca de *E. tonhascai* tem células glandulares com citoplasma contendo abundantes ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso. O lúmen da espermateca é revestido por uma fina cutícula. A secreção elétron-densa das células glandulares pode ser observada dentro do lúmen da espermateca, do ducto glandular e em vesículas. A compreensão da organização e função do sistema reprodutivo feminino pode contribuir para o entendimento dos detalhes sobre a reprodução de forídeos. Além disso, pode ser usado como base para futuros estudos sobre vários aspectos da biologia reprodutiva desses inimigos naturais.

Abstract

FARDER-GOMES, Cliver Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Morphology of ovary and spermatheca of the phorid parasitoid *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae).** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: José Cola Zanuncio and Marco Antonio de Oliveira.

The phorid *Eibesfeldtphora tonhascai* (Diptera: Phoridae) is a parasitoid of the leaf cutting ants *Atta sexdens* Forel and *Atta laevigata* Smith (Hymenoptera: Formicidae). The studies about this parasitoid are limited to its parasitism behavior. Furthermore, there are no studies about the reproduction of this parasitoid and in this case, morphology is usually the most adequate tool to propose functional hypotheses about reproduction. Thus, the aim of this work was to describe the morphology of ovary and spermatheca of *E. tonhascai*. The samples were processed according to the conventional methodology for light microscopy and transmission electron microscopy. *Eibesfeldtphora tonhascai* has a pair of ovaries of meroistic-polytrophic type and two spermatheca. The oocyte at the early stages of development had a spherical shape and small size. The size of entire oocyte chamber increased due to the accumulation of yolk in the oocyte cytoplasm. The follicular cells initiated the deposition of the chorion layers and after their deposition, these cells degenerated. The mature oocytes had an elliptical shape and cytoplasm filled with granules. The reservoir wall of the *E. tonhascai* spermatheca has glandular cells with abundant free ribosomes and rough endoplasmic reticulum. The lumen of the spermatheca is covered by a thin cuticle. Glandular cells secretion can be observed within the lumen of spermatheca, glandular duct and inside vesicles. Understanding the female reproductive system organization and function can contribute to understand details of phorids reproduction. Furthermore, it can be used as a basis for future studies about several aspects of reproductive biology of these natural enemies.

1. Introdução

Os forídeos (Diptera: Phoridae) são pequenas moscas de elevada diversidade na região Neotropical e com grande variedade de estilo de vida (Disney, 1994). Algumas espécies são parasitoides de abelhas (Core et al., 2012) e cupins (Neoh e Lee, 2010), além de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* que podem ser pragas agrícolas (Bragança et al., 2002; Della Lucia et al., 2014). Assim, estes parasitoides são potenciais agentes no controle biológico de formigas cortadeiras (Guillade e Folgarait, 2015; Farder-Gomes et al., 2016).

O forídeo *Eibesfeldtphora tonhascai* (Diptera: Phoridae) Brown é um parasitoide de *Atta sexdens* Forel e *Atta laevigata* Smith (Hymenoptera: Formicidae), atacando as operárias dessas formigas que transitam nas trilhas de forrageamento (Tonhasca, 1996; Bragança et al., 2002). As fêmeas deste parasitoide depositam um único ovo na cabeça do hospedeiro que ao eclodir, origina uma larva que se alimenta do conteúdo da cápsula cefálica da formiga hospedeira, empupando entre suas mandíbulas (Tonhasca, 1996; Farder-Gomes et al., 2016).

O sistema reprodutor feminino de insetos é composto, geralmente, por um par de ovários, ovidutos laterais e comum, espermateca(s), glândulas acessórias e vagina (Chapman, 2013). Cada ovário é formado por estruturas alongadas, os ovariolos, cujo número e fisiologia estão relacionados com a produção de ovos (Bünning, 1994; Mazurkiewicz-Kania e Kubrakiewicz, 2008).

Nos dípteros, os ovários são do tipo meroístico politrófico, no qual cada ovócito é acompanhado por uma ou mais células nutridoras e envolto por uma camada de células foliculares, formando o folículo ovariano (Bünning, 1994; Jaglarz et al., 2009; Mazurkiewicz-Kania et al., 2012).

Cada ovariolo pode ser subdividido em três partes, da região anterior para a posterior, sendo elas: o filamento terminal que é composto por um conjunto de células somáticas, o germário onde se encontram as células da linhagem germinativa e o vitelário, uma região relativamente grande do ovariolo, caracterizada pela presença dos ovócitos associados as suas células nutridoras

que fornecem importantes componentes ao ovócito (Bünning, 1994; Chapman, 2013; Belles e Piulachs, 2015).

A ovogênese é iniciada na região no germário através da divisão de células germinativas que originam o cistoblasto (Pearson et al., 2016). Cada cistoblasto produzido sofre sucessivas mitoses para produzir o cistócito composto de várias células e envolto por células pré-foliculares, sendo que uma dessas células origina o ovócito enquanto as demais as células nutridoras (Cooley e Theurkauf, 1994; Santos e Gregório, 2006). No vitelário ocorre a maturação e crescimento do ovócito com a deposição de proteínas, lipídeos, carboidratos e outros componentes a partir da hemolinfa (Raikhel e Dhadialla, 1992). A deposição das camadas da casca do ovo (coriogênese) encerra o processo de ovogênese (Wu et al., 2008).

Após a cópula, as fêmeas de muitos insetos armazenam os espermatozoides em uma estrutura saculiforme, a espermateca, no qual eles permanecem viáveis até serem utilizados para a fertilização dos ovos (Stacconi e Romani, 2011; Dallai et al., 2012; Pascini e Martins, 2016). O período de armazenamento dos espermatozoides varia em diferentes insetos, desde horas a meses e, em alguns casos, durante anos, como nos himenópteros eusociais (Lodesani et al., 2004; Gobin et al., 2006). Além disso, a espermateca prove um ambiente adequado para os espermatozoides, protegendo-os contra danos mecânicos e o contato com a hemolinfa, fornecendo substâncias que os mantem viáveis durante toda a vida reprodutiva dos insetos (Klenk et al., 2004; King et al., 2011; Pascini e Martins, 2016).

No geral, a espermateca é formada por uma camada de células epiteliais e revestida por cutícula na porção interior. Ela é constituída por um reservatório, ducto espermatecal, glândulas e músculos (bomba espermatecal) (Martins e Serrão, 2002; Gotoh et al., 2008). Em alguns insetos, a porção glandular da espermateca é composta por glândulas acessórias individuais que liberam secreções ricas em carboidratos e glicoproteínas no lúmen do reservatório, importantes para a manutenção e viabilidade dos espermatozoides (Cruz-Landim e Serrão, 2002; Pascini e Martins, 2016). No entanto, em outros insetos as glândulas acessórias não estão presentes como órgãos individuais, nesse

caso, as células da própria parede do reservatório possuem função secretora (Stacconi e Romani, 2011; Pascini e Martins, 2016).

O conhecimento que se tem sobre o aparelho reprodutor feminino de forídeos vem de estudos com a espécie *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Phoridae) (Benner, 1985; Benner and Curtis, 1988). Porém, estudos sobre a morfologia interna e ultraestrutura do aparelho reprodutor de outras espécies são escassos, principalmente de forídeos que possam atuar como agentes de biocontrole (Zacaro e Porter, 2003).

Embora *E. tonhascai* tenha potencial para controlar as saúvas, estudos sobre sua biologia estão restritos ao seu comportamento de parasitismo (Tonhasca, 1996; Bragança et al., 2002; Farder-Gomes et al., 2016). Entretanto, não há estudos sobre a reprodução deste parasitoide e neste caso, a morfologia é usualmente a ferramenta mais adequada, não apenas para a compreensão da organização básica, mas também para propor hipóteses funcionais sobre a sua reprodução. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a morfologia do ovário e espermateca de fêmeas do forídeo parasitoide *E. tonhascai*.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção dos parasitoides

Fêmeas de *E. tonhascai* foram coletadas, após a perturbação de ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens*, no Setor de Dendrologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil durante os meses de março, julho e setembro de 2016. Trinta fêmeas do parasitoide foram selecionadas para dissecação.

2.2 Dissecação e morfologia externa do aparelho reprodutor

As fêmeas dos parasitoides foram crio-anestesiadas a 0 °C por 5 minutos antes da dissecação. Forídeos foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1M (V/V) e o aparelho reprodutor das fêmeas fixados em glutaraldeído 2,5% 0,2M (V/V). A morfologia externa foi observada e fotografada com

estereomicroscópio Zeiss Discovery V20 acoplado com uma câmera digital (Zeiss AxioCam MRc).

2.3 Microscopia de luz (ML)

Os forídeos foram dissecados em solução fisiológica para insetos (V/V) para obtenção dos ovários e espermatecas que foram isolados e transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 horas. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol a 70%, 80%, 90% e 95% (V/V), por 15 minutos cada. A seguir, as amostras foram infiltradas e incluídas com historresina Leica. Cortes histológicos (3 μ m de espessura) foram obtidos em micrótomo (Leica RM2255) e corados em solução de Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram examinadas e fotografadas com microscópio Zeiss.

2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os forídeos foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1M (V/V) para obtenção dos ovários e espermatecas que foram isolados e transferidos para glutaraldeído 2,5% 0,2M (V/V) por 24 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas 3 vezes por 5 minutos no mesmo tampão mencionado acima e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (V/V) por 2 horas no escuro. Em seguida, foram lavadas com água destilada por 5 vezes de 1 minuto cada, desidratadas em concentrações crescentes de álcool a 50%, 70%, 90%, 95% e 100% (V/V), por 10 minutos cada. Após isso, os fragmentos foram infiltrados e incluídos resina LR White (Sigma-Aldrich). Os cortes ultra-finos (60 nm) obtidos foram contrastados com acetato de uranila por 20 minutos e citrato de chumbo por 8 minutos. Após esses processos, os cortes foram analisados no Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 109 e Zeiss Libra 120).

3. Resultados

3.1 Morfologia do ovário

Eibesfeldtphora tonhascai tem um par de ovários de formato esférico com três ovaríolos cada, revestidos por uma bainha peritoneal fina. Os ovários abrem individualmente no oviduto lateral. Há apenas uma glândula acessória localizada entre os ovários e inserida no oviduto comum (Fig. 1 A- B).

O ovário é do tipo meroístico politrófico, no qual as células nutridoras estão presentes e associadas a cada ovócito dentro dos ovaríolos, constituindo o folículo ovariano (Figura 2 A). Os ovócitos nos ovaríolos de *E. tonhascai* se diferenciaram de forma sincrônica para formar numerosos ovócitos maduros prontos para fertilização (Fig. 2 B).

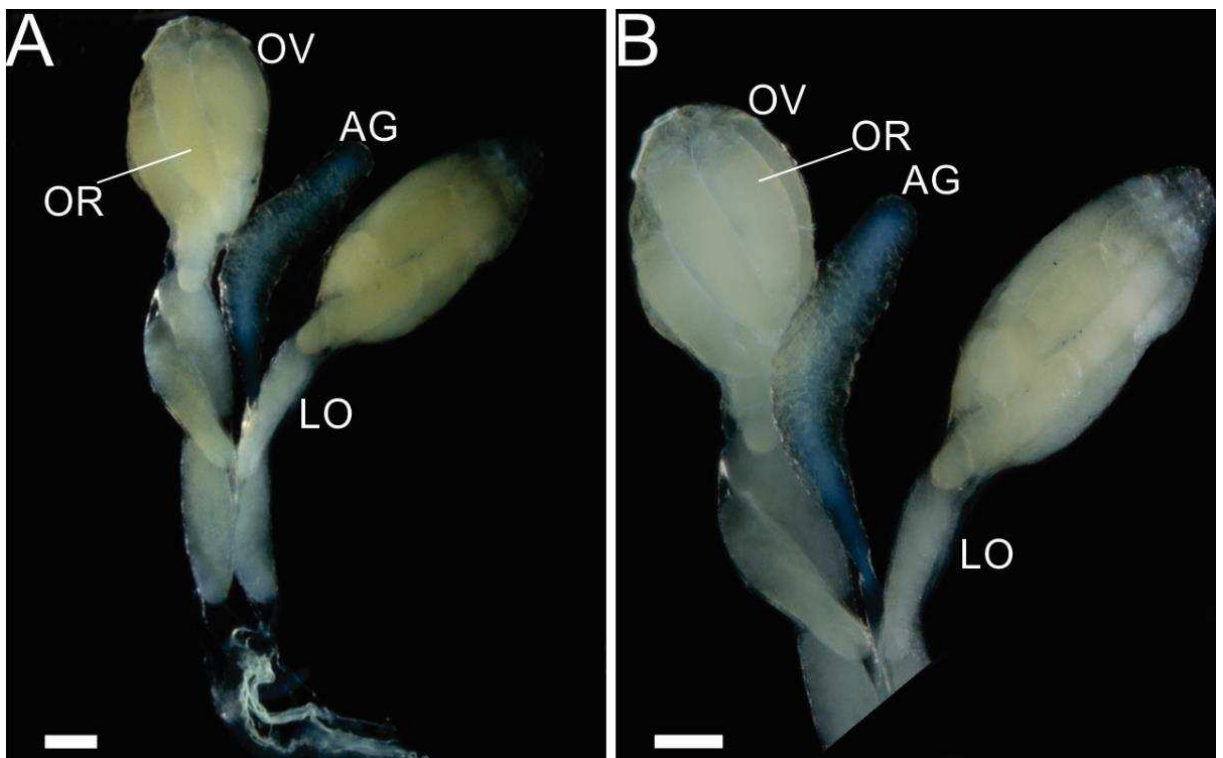


Fig. 1. Morfologia externa do aparelho reprodutor de fêmeas de *E. tonhascai*. (A e B) Visão dos dois ovários (OV), ovaríolos (OR), oviduto lateral (LO) e glândula acessória (AG). As espermatecas não foram mostradas. Barra de escalas: 50 μ m.

Na região do germário foram encontradas células da linhagem germinativa constituídas pelos cystócitos, envoltos por células pré-foliculares. Os

cistócitos em estágios mais iniciais de desenvolvimento estavam na região apical dos ovaríolos e à medida que se afastam do ápice, se diferenciam até alcançarem o vitelário (Fig. 2 C).

No vitelário, o folículo ovariano em estágios iniciais de ovogênese apresentou formato esférico, com o ovócito de pequeno tamanho e núcleo (vesícula germinativa) bastante evidente (Fig. 2 D). As células nutridoras ocuparam quase todo interior do folículo e seu grande núcleo contém cromatina descondensada (Fig. 2 D) e citoplasma com muitas mitocôndrias e ribossomos livres, além de elementos do complexo de Golgi (Fig. 3 A-B). O ovócito e as células nutridoras estavam circundados por uma camada de células foliculares de formato cuboide e com núcleo esférico (Fig. 2 D).

Com o progresso da ovogênese, o tamanho do ovócito aumentou com o acúmulo de vitelo no citoplasma do ovócito, ocupando metade do volume do folículo (Fig. 4 A) e sendo circundado por células foliculares cuboides (Fig. 4 B). As células nutridoras apresentaram núcleos elétrons-densos, citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias dispersas (Fig. 4 C-D).

O epitélio folicular que circunda as células nutridoras adquiriu formato achatado e apresentou espaços intracelulares amplos que percorreram toda a extensão do epitélio (Fig. 4 E). As células foliculares que circundam o ovócito apresentaram espaços intercelulares alargados, característico do processo de patência que ocorre durante o acúmulo de vitelo no citoplasma do ovócito (Fig. 5 A). Entre as células nutridoras, próximo ao polo anterior do ovócito, ocorreram células pequenas, denominadas border cells, cujo núcleo é arredondado e o nucléolo é evidente (Fig. 5 B).

O espaço ocupado pelas células nutridoras foi reduzido progressivamente até os estágios avançados de ovogênese. Assim, o ovócito passa a ocupar visivelmente maior espaço dentro do ovo (Fig. 5 C).

No final da fase de acúmulo de vitelo no ovócito, as células nutridoras esvaziaram seu citoplasma no ovócito, levando a uma drástica diminuição da câmara nutridora e aumento no volume do ovócito. Apenas o núcleo das células nutridoras com grumos de cromatina condensada e uma pequena porção do citoplasma se tornam visíveis (Fig. 5 D).

Após a degeneração das células nutridoras, as células foliculares, agora colunares, iniciaram a deposição das camadas do córion (coriogênese) e exibiram vacúolos no citoplasma (Fig. 6 A). Entre o córion e o ovócito ocorreu a membrana vitelínica que juntamente com o córion, formou uma camada contínua ao redor do ovócito (Fig. 6 B). Entre o ovócito e as células foliculares foi possível identificar o espaço periovocítico (Fig. 6 B). Após a deposição da casca do ovo, as células foliculares mostraram aspecto degenerado com considerável redução do citoplasma e condensação da cromatina nuclear (Fig. 6 C).

Os ovócitos maduros mostraram formato elíptico e alongado (Fig. 7 A). O citoplasma estava repleto de grânulos que consistiam, basicamente, de vitelo, lipídeos e grande quantidade de ribossomos livres (Fig. 7 B-C).

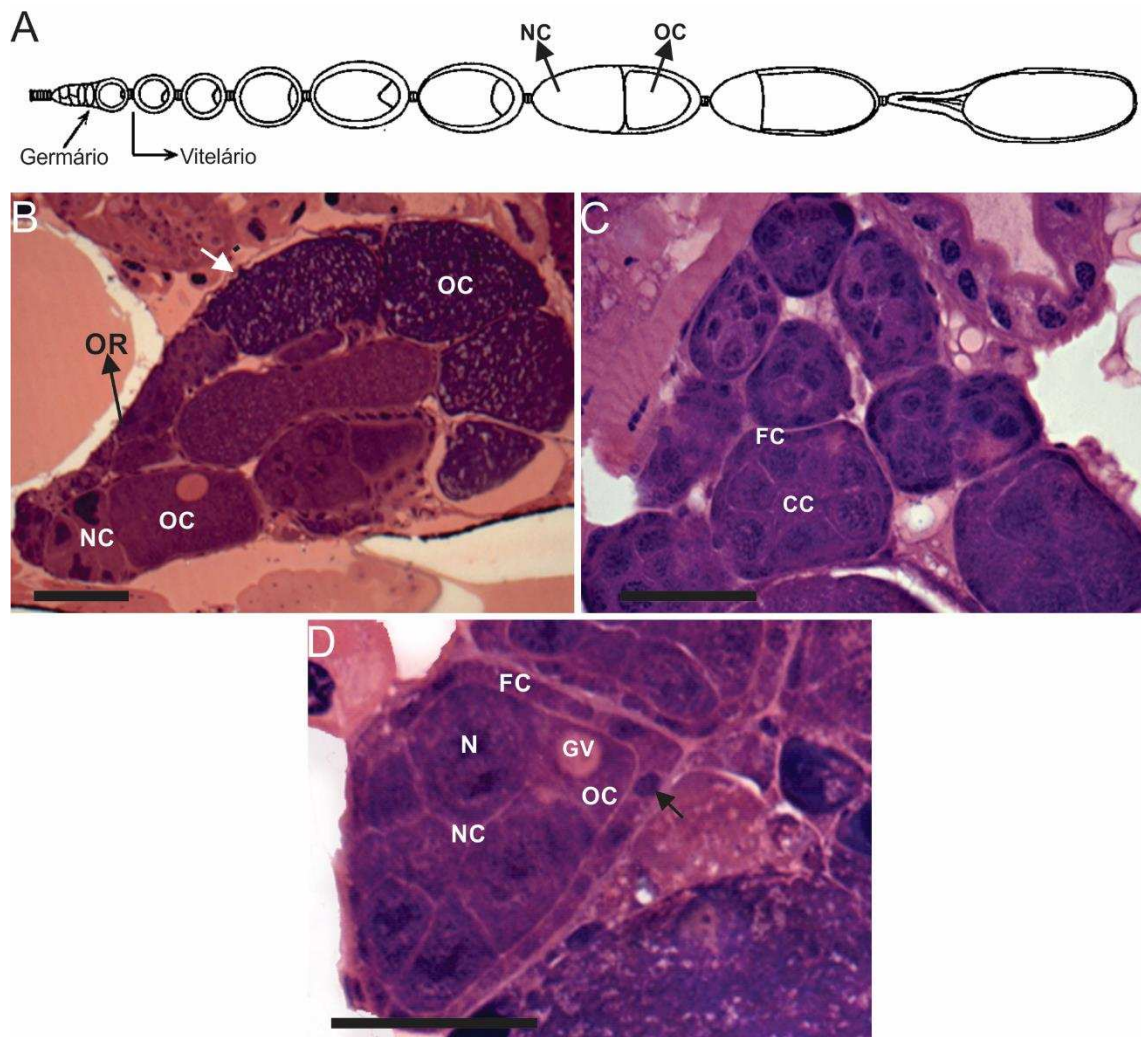


Fig. 2. Microscopia de luz do ovário de *E. tonhascai* (B, C e D). (A) Esquema mostrando as regiões do germário, vitelário e a maturação do ovócito em um ovaríolo meroístico politrófico (Adaptado de Mahajan-Miklos e Cooley, 1994); Células foliculares (NC); Ovócito (OC). (B) Desenvolvimento sincrônico dos ovócitos nos ovaríolos, mostrando as células nutridoras (NC) e ovócitos (OC) típico de ovários meroísticos politróficos; Bainha peritoneal (seta branca). (C) Cistócitos (CC) envoltos por células pré-foliculares (FC) na região do germário. Cistócitos em estágios iniciais encontram-se na região apical dos ovaríolos. (D) Células nutridoras (NC) e seu grande núcleo (N) com cromatina descondensada, ocupando a maior parte do folículo na região do vitelário. A vesícula germinativa (GV) ocupa maior parte do ovócito (OC). As células nutridoras e o ovócito estavam envoltos por uma camada uniforme de células foliculares cubicas (FC) com núcleo esférico (seta negra). Barra de escalas: 50 μ m.

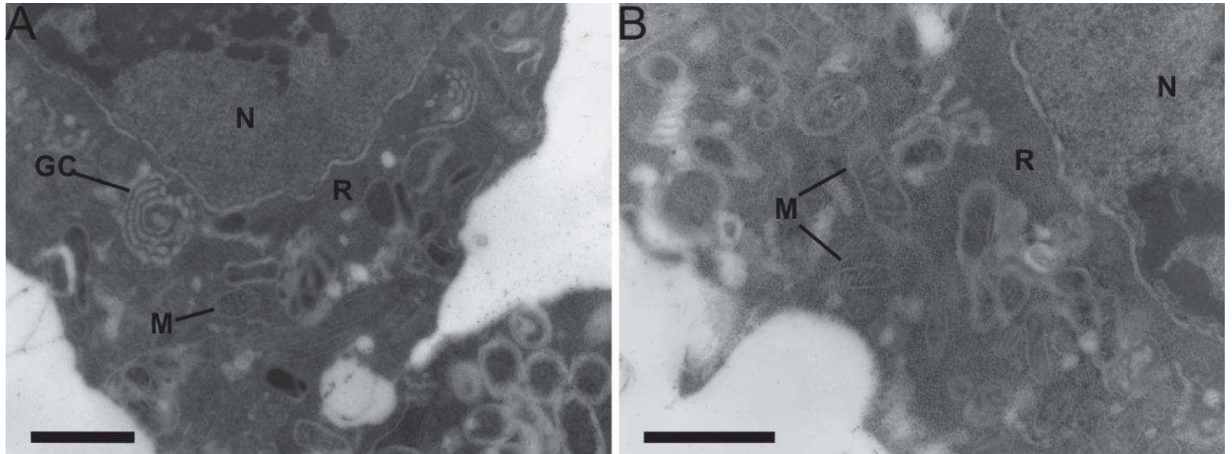


Fig. 3. Microscopia eletrônica de transmissão das células nutritoras de *E. tonhascai*. (A e B) Núcleo (N) e citoplasma das células nutritoras com numerosas mitocôndrias (M) e ribossomos livres (R) além de complexo de Golgi (GC). Barra de escalas: 0,5 μm .

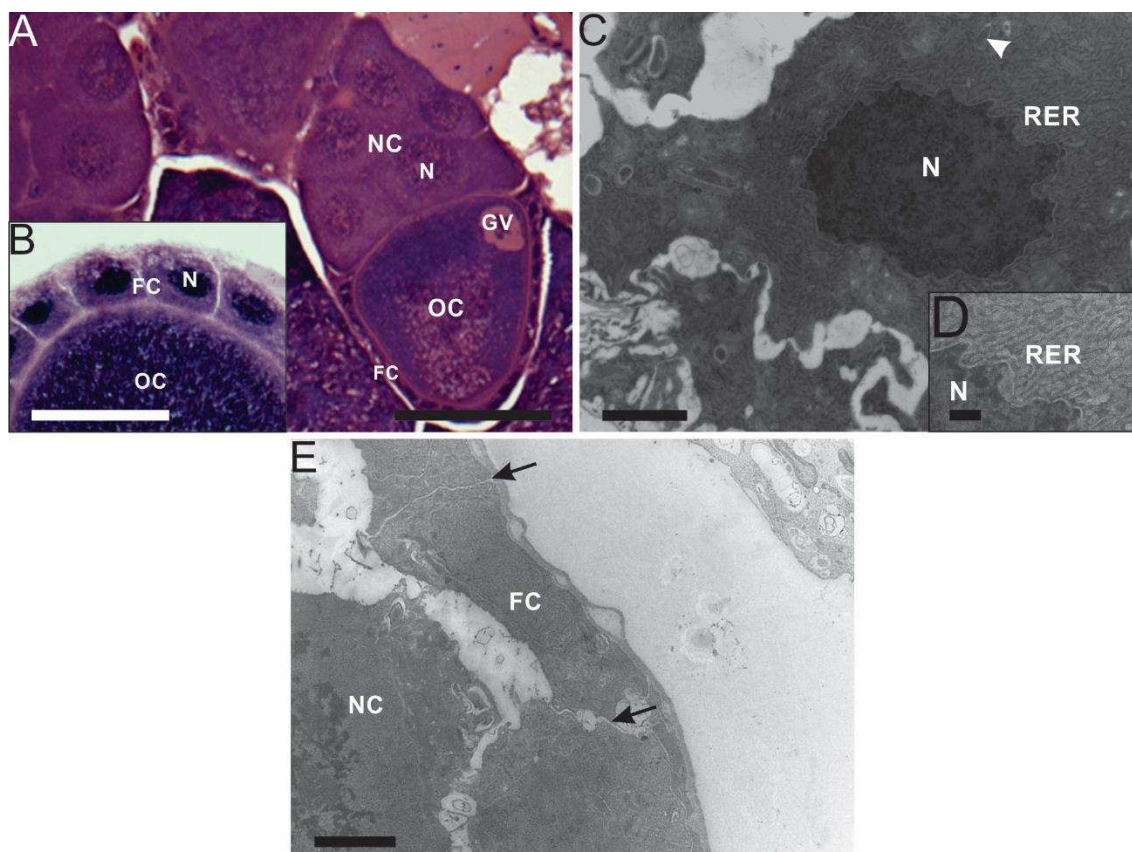


Fig. 4. Imagens de microscopia de luz (A e B) e microscopia eletrônica de transmissão (C, D e E) das células nutritoras e foliculares de *E. tonhascai*. (A) Ovócito (OC) ocupando metade do espaço do folículo ovariano; Células nutritoras (NC); Núcleo das células nutritoras (N); Vesícula germinativa do ovócito (GV); Células foliculares (FC). Barra de escala: 50 μm . (B) Detalhe das células foliculares cuboides (FC) dos ovócitos (OC); Núcleo das células foliculares (N). Barra de escala: 100 μm . (C e D) Retículo endoplasmático rugoso (RER) abundante no citoplasma das células nutritoras; Mitocôndria (cabeça de seta branca); Núcleo das células nutritoras (N). Barra de escala (C): 1 μm . Barra de escala (D): 0,5 μm . (E) Espaços intercelulares nas células foliculares (setas negras) que envolvem a célula nutritora; Células foliculares (FC); Células nutritoras (NC). Barra de escala: 1 μm .

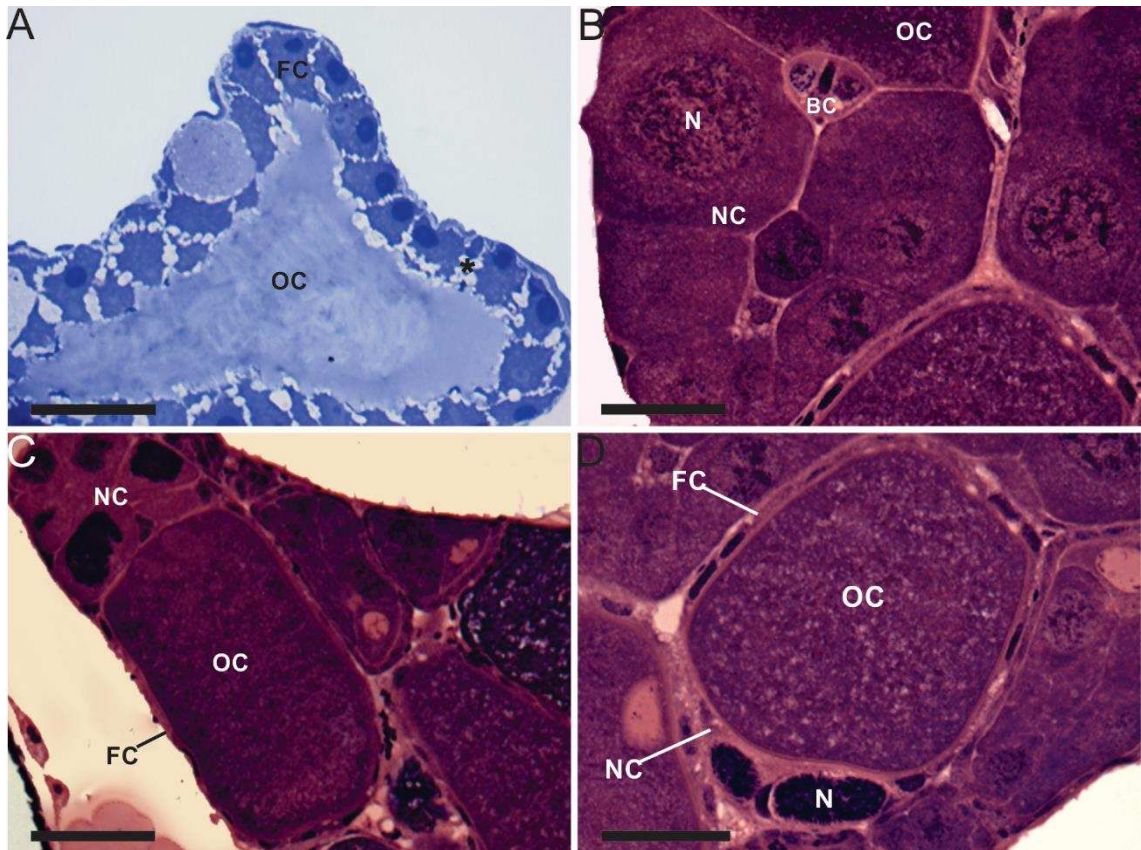


Fig. 5. Imagens de microscopia de luz do ovário de *E. tonhascai* (A) Corte semifino corado com azul de toluidina mostrando os espaços intercelulares (asterisco) nas células foliculares (FC); Ovócito (OC). Barra de escala: 50 μ m. (B) Border cells com núcleo esférico e nucléolo proeminente (seta branca) entre as células nutritoras (NC); Núcleo das células nutritoras (N); Ovócito (OC). (C) Ovócito (OC) ocupando maior parte da câmara do ovo; Células nutritoras (NC); Células foliculares (FC). (D) Imagem mostrando a degeneração das células nutritoras (NC) com cromatina condensada no núcleo (N); Ovócito (OC); Células foliculares (FC). Barras de escala: 50 μ m.

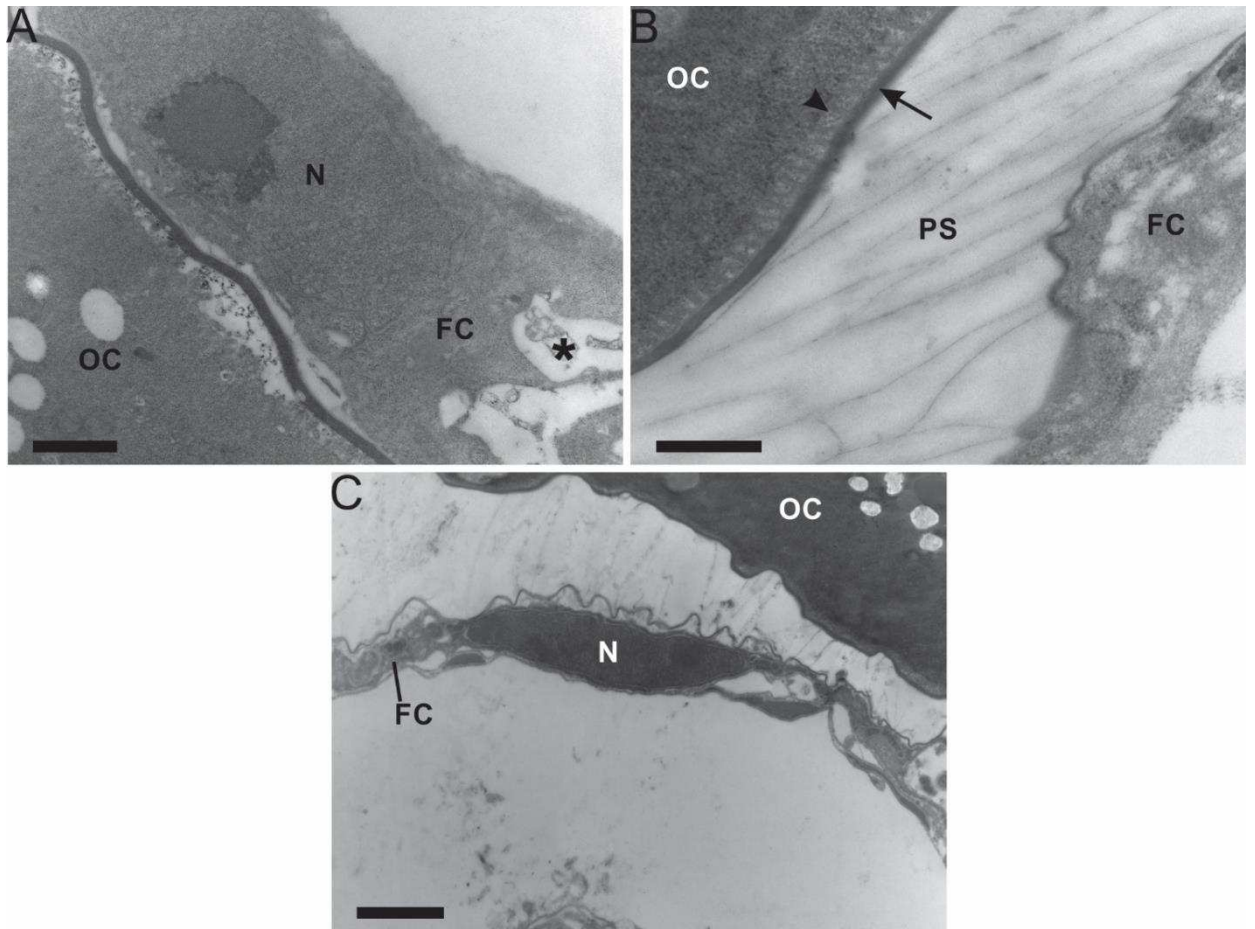


Fig. 6. Micrografias eletrônicas de transmissão da câmara ovocítica de *E. tonhascai*. (A) Células foliculares (FC) iniciam a deposição da casca do ovo; Presença de vacúolos citoplasmáticos (asterisco); Núcleo das células foliculares (N); Ovócito (OC). Barra de escala: 0,5 μ m. (B) Membrana vitelínica (cabeça negra da seta); Córion (seta negra); Espaço periovocítico (PS); Células foliculares (FC); Ovócito (OC). Barra de escala: 250 nm. (C) Degeneração das células foliculares (FC); Núcleo das células foliculares (N); Ovócito (OC). Barra de escala: 1 μ m.

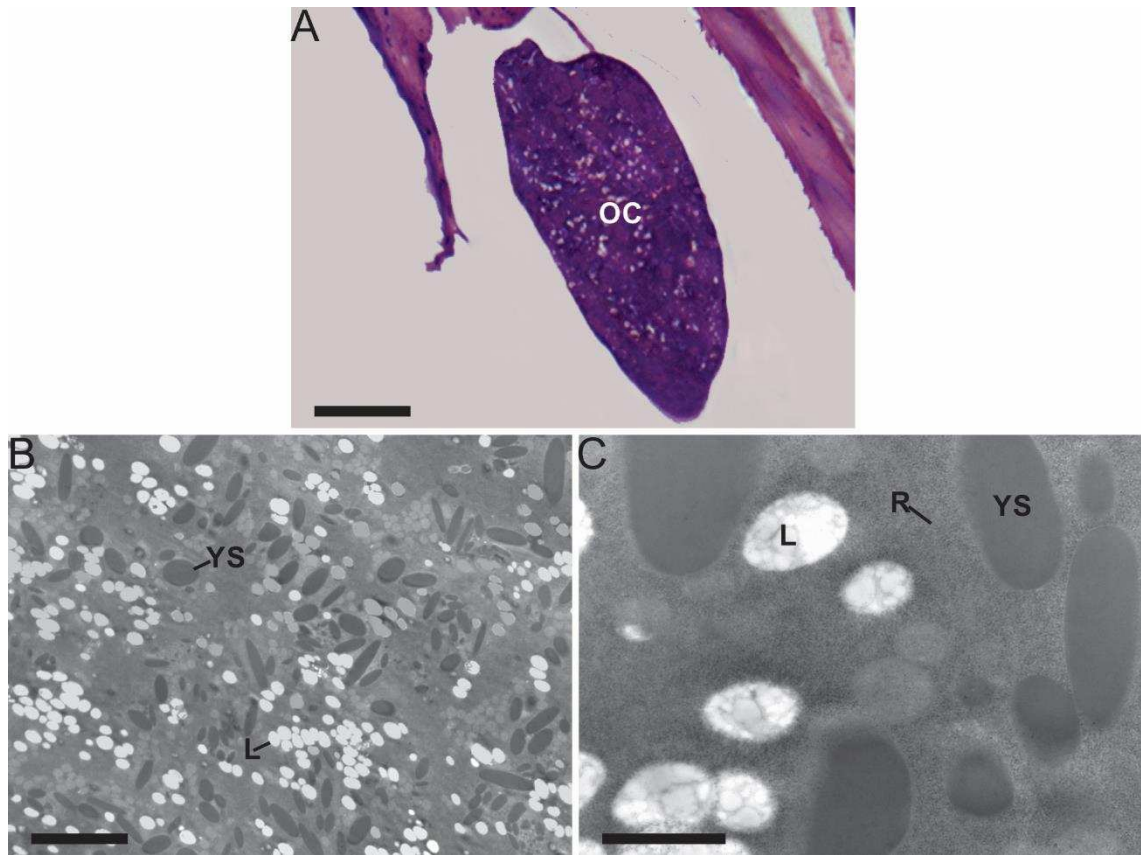


Fig. 7. Imagens de microscopia de luz (A) e microscopia eletrônica de transmissão (B e C) do ovócito maduro de *E. tonhascai*. (A) Visão geral do ovócito maduro (OC). Barras de escala: 50 µm. (B e C) Citoplasma do ovócito (OC) repleto de grânulos de vitelo (YS), lipídeos (L) e muitos ribossomos livres (R). Barras de escala (B): 2,5 µm e (C): 0,5 µm.

3.2 Morfologia da espermateca

Eibesfeldtphora tonhascai possui um par de espermatecas de formato oval, localizadas adjacente a cada um dos dois ovidutos laterais e conectadas ao oviduto comum por um ducto espermatecal (Fig. 8 A-B). Na parede do reservatório da espermateca de *E. tonhascai* foi observado apenas células glandulares proeminentes e com ductos visíveis (Fig. 9 A-B, Fig. 10 A). O lúmen estava repleto de espermatozoides (Fig. 9 A-B).

Na região basal das células glandulares foi observada uma fina lâmina basal que envolveu toda a espermateca (Fig. 10 B). Fibras musculares estavam aderidas a lâmina basal (Fig. 10 C). Na região apical, uma cutícula elétron-densa foi encontrada revestindo inteiramente o lúmen da espermateca (Fig. 10 D).

O citoplasma do epitélio continha abundantes ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso (Fig. 10 E). Numerosas vesículas contendo material particulado em seu interior foram observadas por todo o citoplasma (Fig. 10 A-B-C).

Próximo ao lúmen da espermateca foi observado o ducto das células glandulares que apresenta extensa e desenvolvida rede de microvilosidades que convergem para o lúmen do ducto além de mitocôndrias dispersas (Fig. 11 A-B). Essas células apresentam núcleo e nucléolo proeminentes (Fig. 11 C).

A secreção das células glandulares pode ser observada dentro do lúmen do ducto glandular, como material altamente elétron-denso (Fig. 11 A-B). Vesículas contendo material particulado, próximo as microvilosidades e dentro do ducto, também foram observadas (Fig. 11 B). No lúmen da espermateca, essas secreções, frequentemente, se acumulavam como depósitos floculados de aspecto elétron-denso (Fig. 10 D).

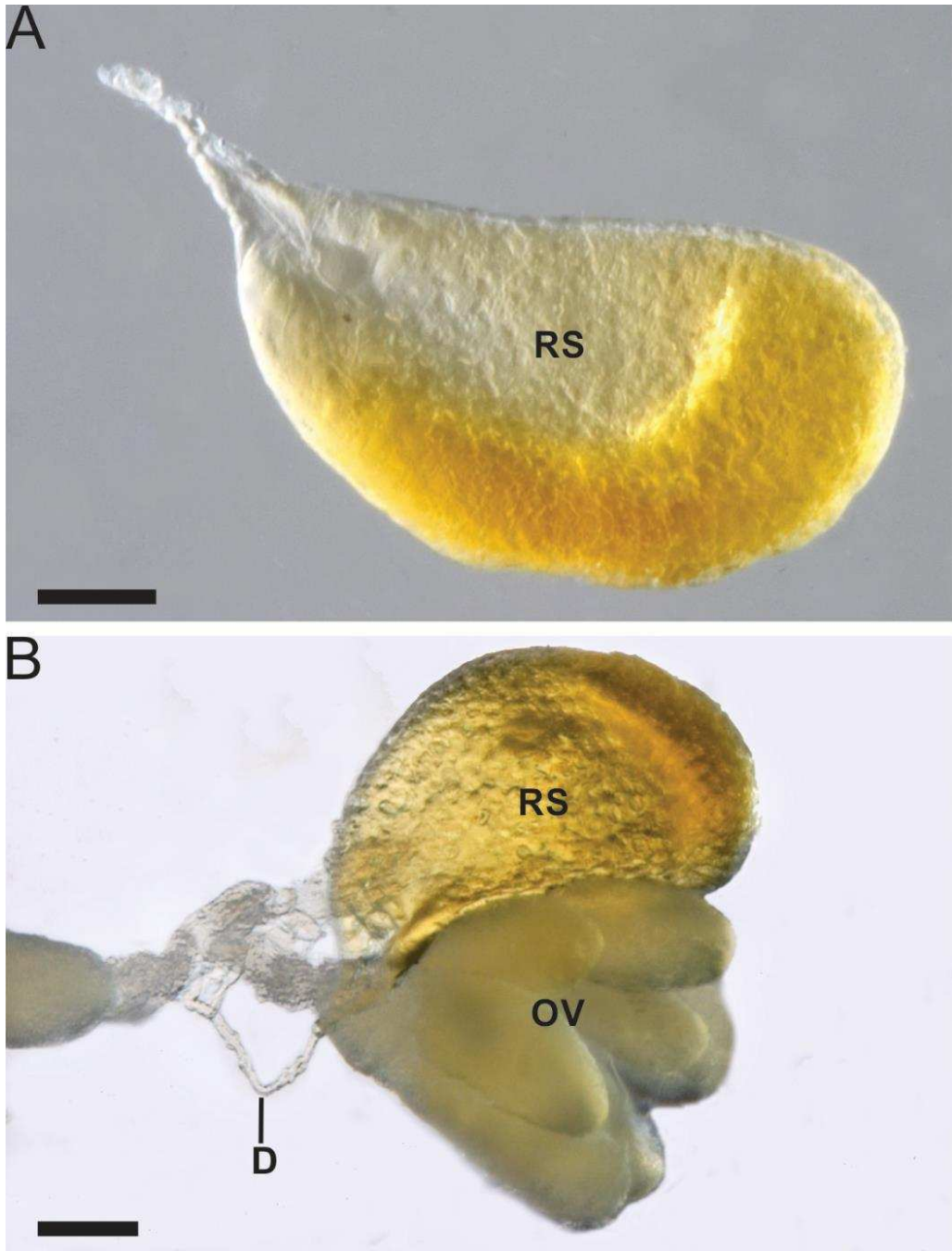


Fig. 8. Morfologia externa da espermateca de *E. tonhascai*. (A e B) Reservatório (RS); Ducto espermatecal (D); Ovário (OV). Barra de escalas: 100 μ m.

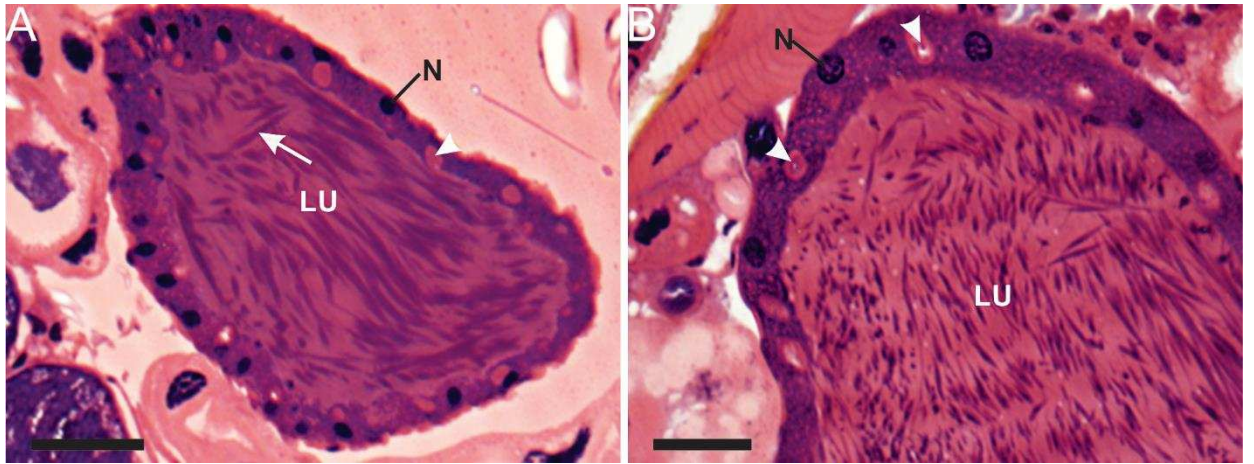


Fig. 9. Imagens de microscopia de luz da espermateca de *E. tonhascai*. (A e B) A parede do reservatório é composta por uma camada de células glandulares com núcleo (N) e ductos glandulares evidentes (cabeça da seta branca). O lúmen da espermateca (LU) está preenchido com espermatozoides (seta branca). Barra de escalas: 50 μ m.

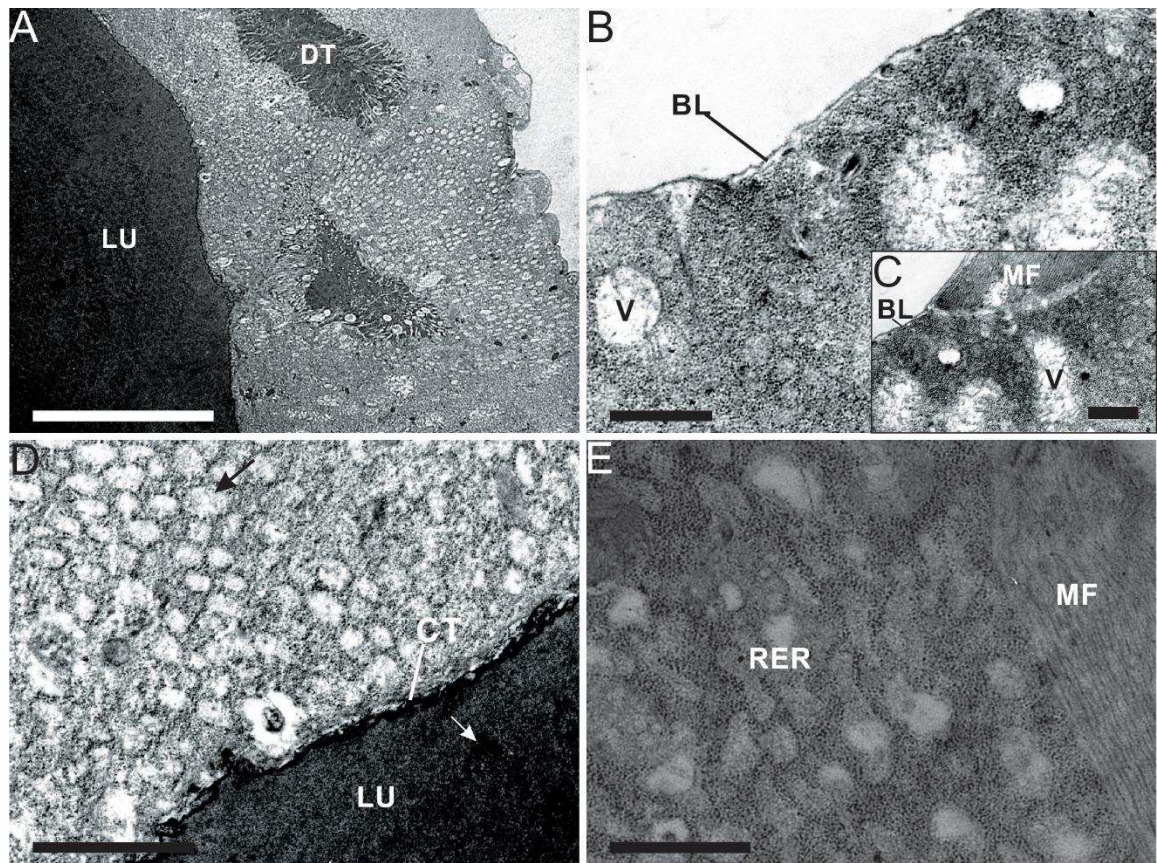


Fig. 10. Micrografias eletrônicas de transmissão da espermateca de *E. tonhascai*. (A) visão geral da espermateca, mostrando o lúmen da espermateca (LU) e o ducto proeminente da célula glandular da espermateca (DT). Barra de escalas: 10 μ m. (B e C) a lâmina basal (BL), fibras musculares (MF) e vesículas (V) contendo material particulado na região basal. Barra de escalas: 1 μ m. (D) Região apical, evidenciando a cutícula (CT) que reveste o lúmen da espermateca (LU) que apresentou depósitos floculados (seta branca) no interior. Vesículas contendo material particulado (seta negra). Barra de escalas: 2 μ m. (E) Retículo endoplasmático rugoso (RER) no citoplasma das células glandulares que compõem a espermateca; Fibras musculares (MF). Barra de escalas: 2 μ m.

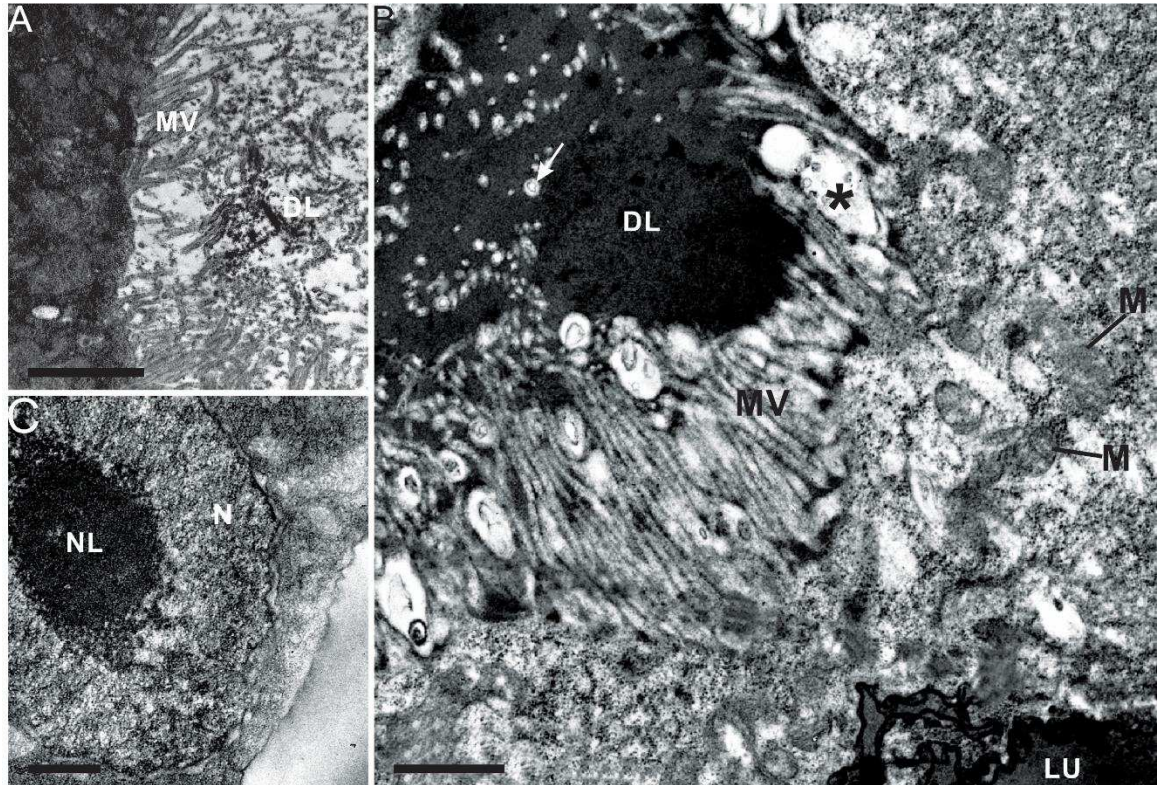


Fig. 11. Micrografias eletrônicas de transmissão da espermateca de *E. tonhascai*. (A) Detalhe do ducto das células glandulares, mostrando as microvilosidades (MV) e o lúmen do ducto (DL) contendo material particulado. Barra de escalas: 2 μ m. (B) Lúmen do ducto glandular (DL) com a secreção elétron-densa das células glandulares em seu interior. Vesículas contendo material particulado, próximo as microvilosidades (asterisco) e dentro do ducto (seta branca); Microvilosidades (MV); Mitocôndrias (M); Lúmen da espermateca (LU). Barra de escalas: 1 μ m. (C) Núcleo (N) e nucléolo (NL) das células glandulares. Barra de escalas: 1 μ m.

4. Discussão

4.1 Morfologia do ovário

Os resultados aqui obtidos mostram que em *E. tonhascai*, os ovócitos em todos os ovariolos, se desenvolvem de forma sincrônica, assim como relatado para *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) Fabricius (Chaiwong et al., 2012) e *Tachypeza nubila* (Diptera: Hybotidae) Meigen (Jaglarz et al., 2010). No desenvolvimento sincrônico, os ovócitos nos ovariolos se desenvolvem quase ao mesmo tempo. Dessa forma, há a produção de numerosos ovócitos

maduros prontos para a fertilização (Chaiwong et al., 2012; Liu et al., 2014). Esse sincronismo permite que as fêmeas ovipositem muitos ovos em um curto período de tempo (Koteja et al., 2003; Ngernsiri et al., 2015) o que parece estar ocorrendo em *E. tonhascai*. Considerando que forídeos parasitoides adultos vivem poucos dias (Olufemis e Fadamiro, 2016), o sincronismo ovariano pode maximizar a oviposição durante o curto ciclo de vida desse inseto.

Na região do germário de *E. tonhascai*, os cistócitos em estágios mais iniciais de desenvolvimento se localizavam na região apical dos ovários. O germário de outros insetos com ovários do tipo meroístico politrófico é subdividido em regiões, com base nas características morfológicas das células durante a formação dos cistos ovarianos (Santos e Gregório, 2006; Pearson et al., 2016). Dessa forma, sugere-se que o germário de *E. tonhascai* também seja dividido em regiões, embora não tenha sido possível caracterizá-las morfológicamente. É no germário que a ovogênese é iniciada através da divisão de células germinativas (Pearson et al., 2016) e em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) Meigen, o cistoblasto produzido através dessa divisão sofre sucessivas mitoses para produzir o cistócito de 16 células germinativas, sendo que uma originará ovócito e as demais as células nutridoras (Cooley e Theurkauf, 1994).

O citoplasma das células nutridoras de *E. tonhascai* rico em mitocôndrias, ribossomos livres e complexo de Golgi indica que essas células estão ativas metabolicamente, sintetizando RNAs, ribonucleoproteínas e outros componentes que são transferidos para o ovócito, contribuindo com o desenvolvimento e crescimento inicial deste (Mahajan-Niklos e Cooley, 1994; Mazurkiewicz e Kubrakiewicz, 2001; Zelazowska e Bilinski, 2001). No início da ovogênese, as células nutridoras de *D. melanogaster* são poliploides e sintetizam grandes quantidades de RNA e proteínas que são transferidos ao ovócito (De Loof et al., 1990; Royzman et al., 2002). Assim, o mesmo mecanismo deve ocorrer em *E. tonhascai*.

As border cells, encontradas entre as células nutridoras do forídeo, são células foliculares que migram do polo anterior das células nutridoras para o polo anterior do ovócito, secretando nessa região, a placa da micrópila que permite a passagem do espermatozoide para dentro do ovócito (Kubrakiewicz et al., 2003; Jaglarz et al., 2010).

As células foliculares que circundam o ovócito de *E. tonhascai* se separam parcialmente (patência) formando espaços intercelulares amplos que permitem a rápida passagem das vitelogeninas para dentro do ovócito, aumentando drasticamente o seu tamanho (Seidelmann et al., 2016). As vitelogeninas são as proteínas precursoras do vitelo produzidas pelo corpo gorduroso e liberadas por este órgão na hemolinfa (Raikhel e Dhadialla, 1992; Ronnau et al., 2016). Elas alcançam o ovócito através desses espaços entre as células foliculares (Trogakos et al., 1999; (Mazurkiewicz e Kubrakiewicz, 2008). As células foliculares podem também atuar na produção dessas proteínas em dípteros (White e Bownes, 1997; Lin et al., 2015). Assim como relatado para *Dacus oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae) (Trogakos et al., 1999), as células foliculares de *E. tonhascai* também perdem a patência, voltando ao estado normal após o acúmulo de vitelo e início da síntese da casca do ovo.

Uma característica interessante de *E. tonhascai* é a ocorrência de espaços intracelulares amplos no epitélio folicular envolvendo a câmara nutridora, indicando que algumas substâncias da hemolinfa podem ser absorvidas pelas células nutridoras que apresentam intensa atividade metabólica.

Muito do citoplasma das células nutridoras de *E. tonhascai* foi transferido para o ovócito (injeção terminal) ao final do processo de acúmulo de vitelo no citoplasma do ovócito (Mahajan-Niklos e Cooley, 1994; Ferreira et al., 2014). Esse transporte é regulado pelo citoesqueleto de actina que auxilia na extrusão do citoplasma, ao mesmo tempo que ancora o núcleo dessas células na membrana, impedindo-o de bloquear o fluxo de citoplasma para fora da célula (Guild et al., 1997; Anan'ina et al., 2010). Como consequência, permanecem apenas o núcleo e um pouco do citoplasma nas células nutridoras, como observado neste estudo. Logo após a injeção terminal, o restante das células nutridoras foi eliminado do folículo ovariano (Foley e Cooley, 1998). Nesta fase do desenvolvimento do ovócito, as células nutridoras de *E. tonhascai* apresentaram núcleos condensados e desintegração do citoplasma que são características de morte celular programada (Buszczak e Cooley, 2000; Kubrakiewicz et al., 2003; Mpakou et al., 2006).

Nas etapas finais da ovogênese, as células foliculares que circundam ovócito de *E. tonhascai* sintetizam e secretam no espaço periovocítico, os componentes da casca do ovo que são a membrana vitelínica e o córion, assim como o relatado para *D. melanogaster* (Zarani e Margaritis, 1991) e *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) (Adham et al., 2009). A casca do ovo proporciona proteção mecânica ao embrião em desenvolvimento, além de permitir as trocas gasosas e prevenir sua dessecação (Yao & Li, 2003; Papantonis et al., 2015). Os espaços intracelulares amplos nas células foliculares de *E. tonhascai* durante a coriogênese podem estar relacionados ao recebimento de substâncias da hemolinfa que podem participar da síntese da casca do ovo. Embora o epitélio folicular se torne secretor (Wu et al., 2008), compostos oriundos da hemolinfa podem ser necessários. A redução do citoplasma e condensação da cromatina nas células foliculares de *E. tonhascai* ao final da coriogênese sugere, também, morte celular programada (Nezis et al., 2002; Aguirre et al., 2013).

O formato elíptico e alongado do ovo de *E. tonhascai* foi semelhante ao relatado para o forídeo parasitoide *Pseudacteon wasmanni* Schmitz (Diptera: Phoridae) (Zacaro e Porter, 2003) e sugere-se que esse formato pode facilitar a passagem do ovo pelo aparelho reprodutor das fêmeas e sua subsequente oviposição (Jaglarz et al., 2010). Além disso, o citoplasma do ovo de *E. tonhascai* composto por grânulos de vitelo, lipídeos e ribossomos foi semelhante a relatada para outros dípteros (Zissler e Sander, 1977; Cardoso et al., 2010) e está relacionada ao fornecimento da energia necessária para o desenvolvimento do embrião.

Fêmeas adultas do forídeo *P. wasmanni*, parasitoide de formigas do gênero *Solenopsis* Westwood (Hymenoptera: Formicidae), não apresentaram ovócitos nas fases de pré vitelogênese ou vitelogênese, apenas ovócitos quase maduros ou maduros, indicando que tais processos ocorrem antes da emergência do adulto (pró-ovigênia) (Zaccaro e Porter, 2003). Entretanto, o contrário foi relatado neste estudo para o parasitoide de formiga cortadeira *E. tonhascai* que apresenta produção contínua de ovócitos no estágio adulto (sinovigênia), de forma semelhante ao descrito para forídeos saprófagos (Benner, 1985). Assim, o padrão de maturação dos ovócitos parece ser

independente do estilo de vida desses insetos e pode estar relacionado a outros fatores intrínsecos de cada espécie.

4.2 Morfologia da espermateca

A espermateca pode variar na estrutura e quantidade em diferentes insetos. Espécies de besouros do gênero *Stolas* Billberg (Coleoptera: Chrysomelidae) podem apresentar diferentes ornamentações na espermateca que em muitos casos, podem ser utilizadas para diferencia-las (Borowiec e Pomorska, 2009). Mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen (Diptera: Culicidae) possuem apenas uma espermateca enquanto *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) possui três (Erbey et al., 2007; Pascini et al., 2012 e 2013).

Eibesfeldtphora tonhascai apresenta a parede do reservatório da espermateca com característica secretora, como o relatado para *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) (Pascini et al., 2013) e diferente de *D. melanogaster*, no qual as células glandulares estão localizadas externamente (Mayhew e Merrit, 2013). Porém, ao contrário do relatado para *A. aquasalis* (Pascini et al., 2013), não foi observada a presença de células epiteliais entre ou abaixo das células glandulares.

O lúmen da espermateca de *E. tonhascai* repleto de espermatozoides era esperado, pois os parasitoides foram coletados durante as tentativas de oviposição nas formigas. A corte e o acasalamento de muitas espécies de forídeos já foi relatada e pode envolver, em alguns casos, o enxame de ambos os sexos e a posterior cópula (Disney, 1994). Porém, não se tem informações semelhantes sobre os forídeos parasitoides de formigas cortadeiras.

As numerosas vesículas contendo material floculado e elétron-denso encontrados no citoplasma das células glandulares indicam a intensa atividade metabólica dessas células (Pascini et al., 2013). Esse aspecto floculado e elétron-denso é característico de secreções proteicas (Clements e Potter, 1967; Fritz e Truner, 2002). Além disso, os abundantes ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso encontrados no citoplasma glandular corroboram, também, para a possível composição proteica das secreções glandulares do epitélio da espermateca de *E. tonhascai*.

Os espermatozoides de *E. tonhascai* estão isolados dentro do lúmen por uma fina cutícula, como o relatado para *A. aquasalis* e *A. aegypt* (Pascini et al., 2012 e 2013). Essa cutícula contém a proteína cuticulina que proporciona a rigidez e resistência necessária para a proteção e isolamento dos espermatozoides (Ilango, 2005; Pascini et al., 2012).

A extensa rede de microvilosidades associada com as mitocôndrias no aparato terminal das células glandulares reflete função secretora do epitélio glandular (Pascini et al., 2012). As microvilosidades aumentam a superfície celular para a absorção e secreção de substâncias enquanto as mitocôndrias sustentam a atividade metabólica. Assim, ambos estão intimamente relacionados ao transporte ativo de substâncias em direção ao lúmen da espermateca (Wheeler e Krutzsch, 1994; Fritz e Turner, 2002; Martins et al., 2008; Lange, 2011; Pascini et al., 2013).

Além do citoplasma, o material floculado foi encontrado dentro dos aparatos terminais das células glandulares e em vesículas próximas às microvilosidades, evidenciando sua secreção para o interior do lúmen da espermateca, no qual o material também foi observado (Pascini et al., 2012 e 2013). Esse material pode ser armazenado no lúmen do ducto antes de ser secretado para o lúmen da espermateca, assim como relatado para *A. aquasalis* (Pascini et al., 2013). As secreções da glândula da espermateca desempenham funções como fornecimento de substâncias que servirão como nutriente para os espermatozoides e manutenção da sua viabilidade (Bhatnagar e Musgrave, 1971; Prokupek et al., 2008; Wolfner et al., 2011). Em *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae), as secreções proteicas das glândulas acessórias dos machos são importantes para a sobrevivência dos espermatozoides e as secreções das glândulas da espermateca das fêmeas parecem ter o mesmo efeito (den Boer et al., 2009).

5. Conclusão

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o par de ovários meroísticos politróficos do forídeo de *E. tonhascai* possui três ovaríolos cada e os ovócitos nesses ovaríolos se diferenciaram de forma sincrônica. O

desenvolvimento do ovócito dentro dos ovariolos foi observado e se assemelha ao de outros dípteros. O par de espermatecas estava repleto de espermatozoides e as células glandulares estão aderidas no epitélio da espermateca. A compreensão da organização e função do sistema reprodutivo feminino pode contribuir para o entendimento dos detalhes sobre a reprodução e biologia de forídeos, principalmente das espécies que possam contribuir com futuros programas de controle biológico de formigas cortadeiras. O presente estudo foi o primeiro a fornecer a descrição detalhada da morfologia do ovário e espermateca de forídeos parasitoides. Além disso, os resultados obtidos podem ser usados como base para futuros estudos sobre vários aspectos da biologia reprodutiva e desenvolvimento ainda desconhecidos desses inimigos naturais.

6. Referências bibliográficas

Adham, F.K., Mehlhorn, H., El-Basheir, Z.M. e Yamany, A.S., 2009. Light and electron microscopic studies on the development of the ovaries of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 105, 939-948.

Aguirre, S.A., Pons, P., Settembrini, B.P., Arroyo, D. e Canavoso, L.E., 2013. Cell death mechanisms during follicular atresia in *Dipetalogaster maxima*, a vector of Chagas' disease (Hemiptera: Reduviidae). *J Insect Physiol* 59, 523-541.

Anan'ina, T.V., Vedernikov, A.E., Khodzhanov, A.E. e Stegnii, V.N., 2010. Development of ovarioles and nurse-cell cytoskeleton in *Calliphora erythrocephala* Mg (Diptera: Calliphoridae). *Cell Tissue Biol* 4, 192-198.

Belles, X. e Piulachs, M.D., 2015. Ecdysone signalling and ovarian development in insects: from stem cells to ovarian follicle formation. *Biochim Biophys Acta* 1849, 181-186.

Benner, D.B. e Curtis, S.K., 1988. Internal reproductive organs of the female humpbacked fly, *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Phoridae). *Int J Insect Morphol Embryol* 17, 197-205.

Benner, D.B., 1985. Oocyte development and fecundity in *Megaselia scalaris* (Phoridae: Diptera). *Int J Entomol* 27, 280-288.

Bhatnagar, R.D.S. e Musgrave, A.J. 1971. Aspects of histophysiology of the spermathecal gland of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera). *Can J Zool* 49, 275-277.

Borowiec, L. e Pomorska, J., 2009. The structure of the spermathecae of the genus *Stolas* (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae: Mesomphaliini) and its taxonomic significance. *Ann Zool Fenn* 59, 201-221.

Bragança, M.A.L., Tonhasca Jr, A. e Moreira, D.D.O., 2002. Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol* 31, 241-244.

Bünning, J., 1994. The insect ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. 1st edition. Chapman & Hall, London.

Buszczak, M. e Cooley, L., 2000. Eggs to die for: cell death during *Drosophila* oogenesis. *Cell Death Differ* 7, 1071-1074.

Cardoso, A.F., Cres, R.L., Moura, A.S., Almedia, F. e Bijovsky, A.T., 2010. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis: morphological and biochemical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 254-262.

Chaiwong, T., Sukontason, K., Chaisri, U., Kuntalue, B., Vogtsberger, R.C. e Sukontason, K.L., 2012. Ovarian ultrastructure and development of the blow fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Int J Parasitol Res* 4, 65-70.

Chapman, R.F., 2013. *The Insects: Structure and Function*. 5th edition. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Clements, A.N. e Potter, S.A., 1967. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 13, 1825-1836.

Cooley, L. e Therkauf, W.E., 1994. Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. *Science* 266, 590-596.

Core, A., Runckel, C., Ivers, J., Quock, C., Siapno, T., DeNault, S., Brown, B., DeRisi, J., Smith, C.D. e Hafernik, J., 2012. A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*. *PLoS ONE* 7, 1-9.

Cruz-Landim, C. e Serrão, J.E., 2002. Ultrastructure of the spermathecal gland of *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Braz J Morphol Sci* 19, 9-16.

Dallai, R., Mercati, D., Gottardo, M., Machida, R., Mashimo, Y. e Beutel, R.G., 2012. The fine structure of the female reproductive system of *Zorotypus caudelli* Karny (Zoraptera). *Arthropod Struct Dev* 41, 51–63.

De Loof, A., Geysen, J., Cardoen, J. e Verachtert, B., 1990. Comparative developmental physiology and molecular cytology of the polytrophic ovarian follicles of the blow fly *Sarcophaga bullata* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol* 96, 309-321.

Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C. e Guedes, R.N., 2014. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci* 70, 14-23.

den Boer, S.P.A., Boomsma, J.J. e Baer, B., 2009. Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. *J Insect Physiol* 55, 538-543.

DiMario, P.J. e Mahowald, A.P., 1987. Female sterile (1) *yolkless*: a recessive female sterile mutation in *Drosophila melanogaster* with depressed numbers of

coated pits and coated vesicles within the developing oocytes. *J Cell Biol* 105, 199-206.

Disney, R.H.L., 1994. *Scuttle Flies: The Phoridae*. 1st edition. Chapman & Hall, London.

Erbey, M., Candan, S. e Hasbenli, A., 2007. Morphology of the spermatheca of several species of *Dysmachus* (Diptera: Asilidae) from Turkey: a scanning electron microscope study, second part. *Entomol News* 118, 475-485.

Farder-Gomes, C.F., Oliveira, M.A., Gonçalves, P.L., Gontijo, L.M., Zanuncio, J.C., Bragança, M.A.L. e Pires, E.M., 2016. Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. *Bull Entomol Res* 1, 1-6.

Ferreira, T., Prudêncio, P. e Martinho, R.G., 2014. *Drosophila* protein kinase N (Pkn) is a negative regulator of actin-myosin activity during oogenesis. *Dev Biol* 394, 277-291.

Fooley, K. e Cooley, L., 1998. Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. *Development* 125, 1075-1082.

Fritz, A.H. e Turner, F.R., 2002. A light and electron microscopical study of the spermathecae and ventral receptacle of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) and implications in female influence of sperm storage. *Arthropod Struct Dev* 30, 293-313.

Gobin, B., Fuminori, I., Peeters, C. e Billen, J., 2006. Queen-worker differences in spermatheca reservoir of phylogenetically basal ants. *Cell Tissue Res* 326, 169-178.

Gotoh, A., Billen, J., Hashin, R. e Ito, F., 2008. Comparison of spermatheca morphology between reproductive and non-reproductive females in social wasps. *Arthropod Struct Dev* 37, 199-209.

Guild, G.M., Connelly, P.S., Shaw, M.K. e Tilney, L.G., 1997. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. *J. Cell Biol* 138, 783-797.

Guillade, A.C. e Folgarait, P.J., 2015. Effect of phorid fly density on the foraging of *Atta vollenweideri* leafcutter ants in the field. *Entomol Exp Appl* 154, 53-61.

Ilango, K., 2005. Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotomine sandfly *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae): I. Ultrastructure and histology. *J Biosci* 30, 711-731.

Jaglarz, M.K., Jablonska, A., Kisiel, E. e Bilinski, S.M., 2009. Diversification of follicular cells in the ovaries of the horse fly *Haematopota italica* (Diptera: Tabanidae). Similarities and differences with the *Drosophila* model system. *Folia Biol* 57, 1-12.

Jaglarz, M.K., Kubrakiewicz, J. e Bilinski, S.M., 2010. A novel pattern of follicular epithelium morphogenesis in higher dipterans. *Zoology* 113, 91-99.

King, M., Eubel, H., Millar, A.H. e Baer, B., 2011. Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 57, 409-414.

Klenk, M., Koeniger, G., Koeniger, N. e Fasold, H., 2004. Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera*. *Apidologie* 35, 371-381.

Koteja, J., Pyka-Fosciak, G., Vogelgesang, M. e Szklarzewicz, T., 2003. Structure of the ovary in *Steingelia* (Sternorrhyncha: Coccinea), and its phylogenetic implications. *Arthropod Struct Dev* 32, 247-256.

Kubrakiewicz, J., Jablonska, A., Mazurkiewicz, M. e Bilinski, S.M., 2003. Differentiation and diversification of the follicular cells in flies: insight from the studies of the lower brachycerans' ovaries. *Genesis* 36, 214-224.

Lange, K., 2011. Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J Cell Physiol* 226, 896-927.

Lin, W.J., Chien, C.Y., Tsai, C.L. e Chen, M.E., 2015. A nonovary-specific vitellogenin receptor from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Arch Insect Biochem Physiol* 90,169-180.

Liu, W., Xie, Y., Dong, J., Xue, J., Tian, F. e Wu, J., 2014. Ultra- and microstructure of the female reproductive system of *Matsucoccus matsumurae*. *Arthropod Struct Dev* 43, 243-253.

Lodesani, M., Balduzzi, D. e Galli, A., 2004. A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera ligustica*) queen spermathecae. *J Apic Res* 43, 21-22.

Mahajan-Miklos, S. e Cooley, L., 1994. Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* 165, 336-351.

Martins, G.F. e Serrão, J.E., 2002. A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera: Apoidea). *Sociobiology* 40, 711-720.

Martins, G.F., Zanuncio, J.C. e Serrão, J.E., 2008. Spermatheca morphology of the social wasp *Polistes erythrocephalus*. *B Insectol* 61, 37-41.

Mayhew, M.L. e Merrit, D.J., 2013. The morphogenesis of spermathecae and spermathecal glands in *Drosophila melanogaster*. *Arthropod Struct Dev* 42, 385-393.

Mazurkiewicz, M. e Kubrakiewicz, J., 2008. Follicular cell differentiation in polytrophic ovaries of a moth midge, *Tinearia alternata*. *Int J Dev Biol* 52, 267-278.

Mazurkiewicz, M. e Kubrakiewicz, J., 2001. Intercellular cytoplasm transport during oogenesis of moth midge, *Tinearia alternata* Say (Diptera: Psychodidae). *Folia Biol* 49, 205-213.

Mazurkiewicz-Kania, M., Jędrzejowska, I. e Kubrakiewicz, J., 2012. Differences in the relative timing of developmental events during oogenesis in lower dipterans (Nematocera) reveal the autonomy of follicular cells' differentiation program. *Arthropod Struct Dev* 41, 65–70.

Mpakou, V.E., Nezis, I.P., Stravopodis, D.J., Margaritis, L.H. e Papassideri, I.S., 2006. Programmed cell death of the ovarian nurse cells during oogenesis of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ* 48, 419-428.

Neoh, K.B. e Lee, C.Y., 2010. Behavioral and morphological changes in soldiers of *Macrotermes gilvus* (Termitidae: Macrotermitinae) parasitized by *Misotermes mindeni* (Diptera: Phoridae). *Environ Entomol* 39, 835-840.

Nezis, I.P., Stravopodis, D.J., Papassideri, I., Nicoud-Robert, M. e Margaritis, L.K., 2002. Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stage of *Drosophila* oogenesis. *Cell Tissue Res* 307, 401-409.

Ngernsiri, L., Piyajaraprasert, W., Wisoram, W. e Merrit, D.J., 2015. Structure of the female reproductive system of the lac insect, *Kerria chinensis* (Sternorrhyncha, Coccoidea: Kerridae). *Acta Zool* 96, 312-318.

- Olufemis, A. e Fadamiro, H.Y., 2016. Comparing longevity of Pseudacteon species of different sizes: effect of sugar feeding. *Physiol Entomol* 41, 260-266.
- Papantonis, A., Swevers, L. e Iastrou, K., 2015. Chorion genes: a landscape of their evolution, structure, and regulation. *Annu Rev Entomol* 60, 177-194.
- Pascini, T.V. e Martins, G.V., 2016. The insect spermatheca: an overview. *Zoology*. In Press.
- Pascini, T.V., Ramalho-Ortigão, J.M. e Martins, G.F., 2012. Morphological and morphometrical assessment of spermathecae of *Aedes aegypti* females. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 705-712.
- Pascini, T.V., Ramalho-Ortigão, J.M. e Martins, G.F., 2013. The fine structure of the spermatheca in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 106, 857-867.
- Pearson, J.R., Zurita, F., Tomás-Gallardo, L., Díaz-Torres, A., Díaz de la Loza M.d.C., Franze, K., Martín-Bermudo, M.D. e González-Reyes, A., 2016. ECM-Regulator timp is required for stem cell niche organization and cyst production in the *Drosophila* ovary. *PLoS ONE* 12, 1-25.
- Prokupek, A., Hoffmann, F., Eyun, S.I., Moriyama, E., Zhou, M. e Harshman, L., 2008. An evolutionary expressed sequence tag analysis of *Drosophila* spermatheca genes. *Evolution* 62, 2936-2947.
- Raikhel, A.S. e Dhadialla, T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol* 37, 217-251.
- Ronnau, M., Azevedo, D.O., Fialho, M.C.Q., Gonçalves, W.G., Zanuncio, J.C. e Serrão, J.E., 2016. Changes in follicular cells architecture during vitellogenin transport in the ovary of social Hymenoptera. *Protoplasma* 253, 815-820.

Royzman, I., Hayashi-Hagihara, A., Dej, K.J., Bosco, G., Lee, J.Y. e Orr-Weaver, T.L., 2002. The E2F cell cycle regulator is required for *Drosophila* nurse cell DNA replication and apoptosis. *Mech Dev* 119, 225-237.

Santos, D.C. e Gregório, E. A., 2006. Morphological aspects of cluster formation in the germarium of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotrop Entomol* 35, 644-653.

Seidelmann, K., Helbing, C., Göbeler, N. e Weinert, H., 2016. Sequential oogenesis is controlled by an oviduct factor in the locusts *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*: Overcoming the doctrine that patency in follicle cells is induced by juvenile hormone. *J Insect Physiol* 90, 1-7.

Stacconi, M.V.R. e Romani, R., 2011. Ultrastructural and functional aspects of the spermatheca in the american harlequin bug, *Murgantia histrionica* (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 40, 222-230.

Stefanini, M., De Martino, C. e Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173-174.

Tonhasca Jr, A., 1996. Interactions between a parasitic fly, *Neodohrniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropica* 2, 157-164.

Trougakos, I. P., Lamnissou, K. e Margaritis, L.K., 1999. Biochemical and immunocytochemical analysis of vitellogenesis in the olive fruit fly *Dacus (Bactrocera) oleae* (Diptera: Tephritidae). *Cell Biol Int* 23, 417-429.

Wheeler, D.E. e Krutzsch, P.H., 1994. Ultrastructure of the spermathecal and its associated gland in the ant *Crematogaster opuntiae* (Hymenoptera, Formicidae). *Zoomorphology* 114, 203-212.

White, N.M. e Bownes, M., 1997. Cloning and characterization of three *Musca domestica* yolk protein genes. *Insect Mol Biol* 6, 329-341.

Wolfner, M.F., 2011. Precious essences: female secretions promote sperm storage in *Drosophila*. *PLoS Biol* 9, 1-4.

Wu, X., Tanwar, P.S. e Raftery, L.A, 2008. *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell. *Semin Cell Dev Biol* 19, 271-282.

Yao, R., e Li, J., 2003. Towards global analysis of mosquito chorion proteins through sequential extraction, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 3, 2036-2043.

Zacaro, A.A. e Porter, S.D., 2003. Female reproductive system of the decapitating fly *Pseudacteon wasmanni* Schmitz (Diptera: Phoridae). *Arthropod Struct Dev* 31, 329-337.

Zarani, F.E. e Margaritis, L.K., 1991. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. VII. Formation of the micropilar canal and the role of the paracrystalline structure. *Roux's Arch. Dev Biol* 200, 95-103.

Zelazowska, M. e Bilinski, S.M., 2001. Ultrastructure and function of nurse cells in phthirapterans. Possible function of ramified nurse cell nuclei in the cytoplasm transport. *Arthropod Struct Dev* 30, 135-143.

Zissler, D. e Sander, K., 1977. The cytoplasmic architecture of the egg cell of *Smittia spec.* (Diptera, Chironomidae). II. Periplasm and yolk-endoplasm. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* 183, 233-248.