

JANE CARLA SOARES MOREIRA

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

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS BRASIL
2011**

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

T

M838c
2011

Moreira, Jane Carla Soares, 1981-

Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides em espécies de *Hymenoptera* (Insecta) e suas contribuições para a sistemática / Jane Carla Soares Moreira. – Viçosa, MG, 2011.

ix, 60f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: José Lino Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Hemenóptera. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3. Ultra-estrutura (Biologia). 4. Hemenóptera - Espermatozoides. 5. Testículos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.79

JANE CARLA SOARES MOREIRA

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

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

APROVADA: 29 de julho de 2011.

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Prof. Clóvis Andrade Neves
Co-orientador

Prof. José Eduardo Serrão

Prof^a. Karina Carvalho Mancini

José Lino Neto
Orientador

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter
êxito, e não em ter condições de êxito. Condição de
palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o
palácio se não o fizerem ali?

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pelo ensino público e de qualidade. Aos órgãos de fomento (CNPq, Capes) por financiarem meus estudos ao longo dos últimos sete anos.

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

Aos co-orientadores e demais membros da banca, pelas sugestões e críticas ao trabalho. Em especial, agradeço ao Prof. José Eduardo Serrão pela disposição e pelas sugestões sempre pertinentes.

Aos professores da Biologia Geral Sérgio da Matta e Izabel Maldonado por estarem presentes em diversos momentos na minha vida acadêmica. Em especial, agradeço ao Profº João Marcos de Araújo por ter sido meu primeiro orientador durante minha iniciação científica e pelo exemplo de professor ético e comprometido.

Ao laboratório de Biologia Geral e agora laboratório de Ultra-estrutura Celular pela estrutura física oferecida durante todo o mestrado e doutorado.

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

Ao núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, UnB e da UNICAMP por permitir a captura e análise das imagens dos meus trabalhos. Em especial, a Dra. Cláudia Vanetti, Karla, Bruno Fiorillo e Pedro Brito pela paciência e as instruções dadas durante o manuseio dos equipamentos dos Núcleos de Microscopia Eletrônica de Transmissão da UFV, UnB e UNICAMP respectivamente.

Aos colegas que conviveram comigo no laboratório Diego, Cláudia, Kenner, Sirlene, Fernando, Katiane, Luisa e Larisse por oferecerem um ótimo ambiente de trabalho.

Aos amigos que fiz em Viçosa e nas Repúblicas em que morei, em especial a Vinícius, Madu, Cynthia, Lílian, Maria Olívia, Aline, Pollyanna, Débora, Diana, Roberta,

Simone, Sílvia, Paula, Lorena, Dalana e Carol, por terem contribuído para que eu vivesse dias tão felizes e intensos nesta inesquecível cidade! O tempo passa, mas vou relembrar-me sempre de vários momentos e situações vividas.

Aos meus pais João e Rita por nunca terem medido esforços para realizar minhas vontades, por acharem que eu sou muito inteligente e por me darem sempre um ótimo suporte emocional. Aos meus tios e primos por me darem apoio e por me incentivarem sempre nos mais variados momentos.

Ao meu amor João Paulo por acreditar em mim e por ser um grande incentivador e verdadeiro companheiro.

Aos meus irmãos João Paulo e Ana Carolina pelo amor que nos une e por acreditarem em mim sempre.

Vivi durante os últimos dez anos em Viçosa entre experiências científicas, acadêmicas e extra-acadêmicas. O que vou levar destes anos é para todas as situações uma destas palavras se encaixa: trabalho, estudo, humildade e coragem.

BIOGRAFIA

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

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

Em agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a tese em julho de 2007. Nesta mesma instituição iniciou o curso de Doutorado em 2007 em Entomologia, defendendo a tese em julho de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. Introdução Geral	1
1.1. Ordem Hymenoptera	1
1.2. Morfologia do sistema reprodutor masculino e espermatogêne.....	2
1.3. Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides.....	5
1.4. Referências Bibliográficas.....	27
2. Objetivos	11
3. Artigos	12
Capítulo 1. Morphological aspects of testes and sperm ultrastructure in the ‘symphyta’ <i>Digelasinus diversipes</i> Kirby 1882 (Hymenoptera: Argidae: Dielocerinae).....	12
Capítulo 2. Male reproductive system and sperm morphology of <i>Myschocyttarus</i> <i>cassununga</i> (Hymenoptera: Vespidae)	28
Capítulo 3. Evidências do monofiletismo em abelhas sem ferrão considerando caracteres derivados da morfologia do sistema reprodutor masculino.....	45
4. Conclusão Geral	60

RESUMO

MOREIRA, Jane Carla Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.
Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozóides em espécies de Hymenoptera (Insecta) e suas contribuições para a sistemática. Orientador: José Lino Neto. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves, Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Vinícius Albano Araújo.

Os insetos apresentam uma grande variedade de histórias de vida, padrões ecológicos, diversidade no comportamento de cópula e nas estruturas morfológicas associadas à reprodução. Os Hymenoptera são uma das quatro maiores ordens de Insecta e, provavelmente, representa o grupo com maior número de espécies. Possui grande importância econômica e ecológica, pois compreendem espécies polinizadoras, fitófagas, predadoras e parasitoides. A ordem é composta por aproximadamente 80 famílias, divididas em 'symphyta' e Apocrita. Os Apocrita são os mais estudados, sendo subdivididos em dois grupos: Parasitica e Aculeata. Os 'symphyta' são mais basais e compreendem cerca de 8 superfamílias. Trabalhos existentes mostram uma diversidade de caracteres morfológicos que podem ser usados para análises filogenéticas. A inclusão de novos caracteres, aliados aos caracteres morfológicos externos comumente utilizados, visam contribuir para a sistemática de vários grupos de insetos que ainda não possuem uma filogenia totalmente aceita. Além disso, trabalhos envolvendo sistemas reprodutores e espermatozóides auxiliam no entendimento da biologia reprodutiva, como as diferentes estratégias de cópula e a competição de espermatozóides. Nesta tese, descrevemos a morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozóides em espécies de Hymenoptera. Para isso, utilizamos técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados apontam caracteres que suportam inferências na sistemática e que auxiliam no entendimento de estratégias reprodutiva das espécies estudadas. Caracteres extraídos da morfologia dos sistemas reprodutores como: (1) anatomia geral; (2) número de espermatozóides por cisto e (3) histologia do sistema reprodutor; indicam diferenças interespecíficas capazes de

agrupar espécies ou outros táxons superiores proximamente relacionados. A partir dos dados obtidos, aliados àqueles já descritos na literatura, pretendemos fornecer caracteres consistentes que possam contribuir para estudos filogenéticos.

Abstract

MOREIRA, Jane Carla Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.
Morphology of male reproductive system and sperm in Hymenoptera species (Insecta) and the systematic contributions. Adviser: José Lino Neto. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves, Lúcio Antônio de Oliveira Campos and Vinícius Albano Araújo.

Insects have a wide variety of backgrounds, patterns ecological diversity in mating behavior and structures morphology associated with reproduction. The Hymenoptera are one of four major orders of Insecta, and probably represents the group most number of species. It has great economic and ecological importance, because understand pollinator species, phytofagous, predators and parasitoids. The order is composed of approximately 80 families, divided into Symphyta e Apocrita. The Apocrita are the most studied, subdivided into two groups: parasite ans Aculeata. The symphyta are more basal and understand about 8 superfamilies. Existing studies show a diversity of morphological characters that can be used for phylogenetic analysis. The inclusion of new characters, combined with the external morphology commonly used, contributing to the various systematic insects that do not yet have a fully accepted phylogeny. In addition studies involving reproductive systems and assist in sperm understanding of reproductive biology, such as different mating strategies and sperm competition. In this thesis, we described the morphology of male reproductive system and sperm in species of Hymenoptera. We utilize techniques of light and electron microscopy. The results show characters that support theinferences systematic, and help the bores of reproductive strategies species. Characters drawn from the morphology of the systems players such as: (1) gross anatomy, (2) number of sperm per cyst; and (3) histology of the reproductive system; indicate interspecific differences capable of grouping other species of higher taxa closely related. From the data obtained, combined with those already described in literature, we aim to provide consistent character that can contribute for phylogenetic studies.

1. Introdução Geral

1.1. A ordem Hymenoptera

Hymenoptera é uma das grandes ordens de insetos com cerca de 120 mil (Triplehorn & Johnson, 2005) a 199 mil (Nieves-Aldrey & Fontal & Cazalla, 1999) espécies descritas, excedendo em número de espécies os Lepidoptera e Diptera, e equivalendo aos Coleoptera em riqueza de espécies. A ordem é conhecida a partir do Triássico, mais de 230 milhões anos, e sua posição filogenética dentro dos holometábolos (Endopterygota) não é clara. São excelentes modelos para estudos por exibirem vasta diversidade de habitats e alta complexidade comportamental, apresentando desde grupos solitários até grupos eusociais avançados.

Muitas espécies são predadoras ou parasíticas de outros insetos, incluindo pragas agrícolas, desempenhando um importante papel no equilíbrio natural das populações de seus hospedeiros e sendo extensivamente utilizadas em programas de controle biológico de pragas. Apresentam também um importante grupo de insetos polinizadores, as abelhas, essenciais à manutenção da diversidade das angiospermas (Hanson, 1995). Ainda, aproximadamente 30% da alimentação humana vêm de espécies vegetais polinizadas por estes insetos (O'Toole, 1992). Os Hymenoptera também podem causar grandes prejuízos econômicos, como, por exemplo, as formigas cortadeiras que devastam grandes extensões de florestas (Hanson, 1995) e pastagens (Cherrett, 1986).

A ordem Hymenoptera é composta por, aproximadamente, 80 famílias divididas em 'symphyta' e Apocrita (LaSalle & Gauld, 1992). 'Symphyta' é considerado um grupo basal, com pouco mais de 5% das espécies descritas. Esse grupo é considerado parafilético e o mais primitivo de Hymenoptera composto pelas superfamílias Xyeloidea, Megalodontoidea, Cephoidea, Siricoidea, Tenthredinoidea e Orrusoidea (Hanson e Gauld, 1995). As espécies deste grupo, também conhecidas como "sawflies" e "woodwasps", são encontradas em todos os continentes (com exceção da

Antártica), com cerca de 8.000 espécies, das quais pelo menos 3.000 são do hemisfério ocidental. Muitas espécies são consideradas de importância econômica, uma vez que as larvas se alimentam em plantas, causando danos em agriculturas, plantas ornamentais e em florestas de coníferas (Smith, 1995). Os adultos são herbívoros e apresentam ausência de constrição abdominal entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais, tornando o abdômen largo e relativamente inflexível em relação ao tórax, diferindo de Apocrita. Os Apocrita são reconhecidos por apresentarem uma constrição entre o primeiro e o segundo seguimento do abdômen denominado “cintura” e estão subdivididos em dois grupos: Parasítica e Aculeata. O grupo Parasítica é constituído por todos os Apocrita que não tiveram o ovopositor modificado em ferrão. Eles estão divididos em Trigonalioidea, Megalyroidea, Evanioidea, Stephanoidea, Cynipoidea, Chalcidoidea, Proctotrupeidea, Ceraphronoidea e Ichneumonoidea. Já os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas sendo considerado o grupo mais derivado dentre os Hymenoptera, com as fêmeas apresentando ferrão originado por modificações do ovopositor. Para os Aculeata são reconhecidas três superfamílias: Chrysidioidea, Vespoidea e Apoidea (Brothers 1975).

Enquanto os Apocrita e os Aculeata têm sido aceitos como grupos monofiléticos (Rasnitsyn, 1980, 1988), ainda há dúvidas quanto as relações filogenéticas dos ‘symphyta’ e dos Parasítica. Segundo Ronquist et al. (1999), os ‘symphyta’ são provavelmente parafiléticos em relação aos Apocrita, e os Parasítica provavelmente parafiléticos em relação aos Aculeata, sendo também a relação evolutiva entre ‘symphyta’ e Parasítica ainda muito discutida. Praticamente todos os estudiosos estão de acordo de que Apocrita surgiu a partir um ‘symphyta’, embora haja discrepâncias em relação a qual grupo é o mais próximo filogeneticamente.

Nesta tese, estudamos o representante de ‘symphyta’ *Digelasinus diversipes* (Argidae: Tenthredinoidea); e representantes de Apocrita: Aculeata, dentre eles: *Myschocyttarus cassununga* (Vespidae: Vespoidea); Bombina, Meliponina, Apina e Euglossina: Apini); *Xylocopa frontalis* (Xylocopini) e *Centris tarsata*. (Centridini).

1.2 Morfologia do sistema reprodutor masculino e espermatogênese

Devido à grande variedade de ciclos de vida e padrões ecológicos, os insetos apresentam grande diversidade de comportamento de cópula, regulação endócrina, produção de feromônios e nas estruturas anatômicas associadas à reprodução (Borror et al., 1992; Chapman, 1998). Com isso, variações interespecíficas nos sistemas reprodutores podem ocorrer no tamanho ou número das estruturas, na ausência de alguma delas ou na posição das mesmas ao longo do trato reprodutivo (Chapman, 1998).

De forma geral, o sistema reprodutivo masculino nos Hymenoptera é constituído de dois testículos, duas vesículas seminais e, em geral, duas glândulas acessórias, conectados por ductos. Os testículos podem variar de esférica a fusiforme, sendo bastante desenvolvidos nas pupas e nos adultos jovens, sofrendo, em geral, degeneração gradativa até a completa regressão no final da maturidade sexual. Eles são constituídos por folículos, os quais podem variar em número, forma e tamanho nos diferentes grupos taxonômicos. Vespas parasíticas têm apenas um folículo (Fiorillo et al., 2008; Moreira et al., 2010); em Vespidae Crabronidae, Colletinae, Andreninae e Halictinae têm sido observados três folículos (Ferreira et al., 2004; Moreira et al., 2008). Em outras abelhas como Mellitinae, Apinae e alguns Megachilinae ocorrem quatro folículos (Ferreira et al., 2004). Formicidae já foi observado variando de um (p.ex., *Gnamptogenys striatula*; Lino-Neto, informação pessoal) a onze (Wheller & Krutzsch, 1992) e Apidae tem, geralmente, quatro (Roig-Alsina & Michener, 1993). Apesar de este número ser bastante constante, dentro do mesmo grupo pode existir espécies com números discrepantes, por exemplo, *Apis mellifera* que possui 200 ou mais folículos e o Megachilidae, *Hypanthidium foveolatum* com 28 folículos (Gracielle et al., 2009). Desta forma, o número de folículos testiculares constitui uma característica que, às vezes, pode separar famílias dentro da ordem Hymenoptera (Ferreira et al., 2004). No interior dos folículos testiculares são encontrados os cistos,

que são formados por clones de células germinativas revestidos por uma camada de células epiteliais não germinativas (Baccetti & Bairati, 1964).

No interior dos cistos ocorre a espermatogênese que nos Hymenoptera tem modificações acentuadas por causa de duas características: ocorrência de partenogênese arrenótoca, ou seja, a origem dos machos a partir de ovos não fertilizados; e ocorrência de haplo-diploidia, na qual os machos são haplóides e as fêmeas diplóides. Como não existem cromossomos homólogos para que ocorra o pareamento nos machos haplóides, o núcleo não se divide na meiose I, embora os cromossomos sofram alterações associadas à prófase. Na segunda divisão, as cromátides irmãs se separam num processo semelhante à mitose (Conte et al., 2005). Devido a estas características, na espermatogênese a primeira divisão meiótica é dita abortiva e a segunda divisão é semelhante àquela que ocorre na meiose tradicional. Durante a primeira divisão meiótica anômala não ocorre a desorganização do envoltório nuclear e o fuso citoplasmático quando se forma, desloca o núcleo intacto, separando-o de uma região exclusiva de citoplasma. Nesta região, ocorre a formação de uma vesícula ou broto citoplasmático, que elimina pequeno conteúdo citoplasmático, enquanto que o material nuclear permanece duplicado (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b). Na segunda divisão meiótica, o envoltório nuclear é desestruturado e o fuso citoplasmático é formado, separando, em seguida, os cromossomos duplicados. Desta forma, tem-se uma divisão equivalente do conteúdo nuclear para as duas espermátides que são haplóides. Portanto, não ocorrendo a primeira divisão meiótica tradicional, a formação dos gametas fica precedida apenas da segunda divisão durante a qual o material genético é distribuído equitativamente para as duas células formadas. Entretanto, nas abelhas a distribuição do conteúdo citoplasmático é bastante desigual, de forma que uma das espermátides praticamente não possui esse material (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b). Kerr & Silveira (1974), considerando o número de espermatozóides formados por cisto testicular, acreditaram que as duas espermátides originassem espermatozóides. Lino-neto et al. 2008c, desmonstraram

que as espermatídes atípicas não formam espermatozóides confirmando a hipótese de Hachiohe & Onishi 1952; Cruz-Landim 2001; Conte et al. 2005. Assim, durante a espermatogênese, as espermatogônias sofrem divisões mitóticas gerando um número de células constante em cada cisto. Estas células, após duas divisões meióticas originam as espermatídes (Cruz-Landim, 2001). O número de espermatídes por cisto é característico para cada espécie e pode ser expresso como 2^n onde “n” é usualmente igual a 5, 6, 7 ou 8. Durante a espermiogênese, cada espermatíde sofre um processo de diferenciação dando origem a um espermatozóide. Os espermatozóides maduros, após deixarem os testículos, ficam armazenados em uma região do ducto deferente denominada vesícula seminal. Em ‘symphyta’ e em Aculeata, os espermatozóides deixam os testículos em feixes. Em Aculeata ocorre dissociação dos espermatozóides destes feixes na vesícula durante a maturação sexual. A vesícula seminal nos Hymenoptera pode compreender quase todo o ducto deferente ou uma determinada região dilatada e diferenciada deste. As glândulas acessórias, assim como os demais órgãos do sistema reprodutivo, apresentam grande diversidade morfológica, podendo ser esféricas, ovaladas ou tubulares. Ainda, há espécies onde estas estruturas estão ausentes, como nos Meliponini (Apidae).

1.3. Estrutura e Ultra-estrutura dos espermatozóides

Os espermatozóides em Hymenoptera são células filiformes que medem de $8\mu\text{m}$ em *Meteorus* sp. (Braconidae) (Quicke et al., 1992) a $1.500\mu\text{m}$ em *Euglossa mandibularis* (Apidae) (Zama et al., 2005). De modo geral, podem ser descritos como possuindo uma região anterior, composta pelo núcleo e acrossomo, e uma região posterior, ou flagelar, composta pelo axonema, dois derivados mitocondriais, um adjunto do centríolo e dois corpos acessórios.

O acrossomo é uma organela longa, situada anterior ao núcleo e formada por duas estruturas: a vesícula acrossomal e o perforatorium (Wheeler et al. 1990;

Jamieson et al. 1999; Newman & Quicke 1999a; Zama et al. 2001; Lino-Neto & Dolder 2002). Entretanto, nos espermatozoides da maioria das vespas parasíticas ocorre uma terceira camada extracelular que recobre o acrossomo e parte anterior do núcleo (Quicke et al. 1992; Newman & Quicke 1998, 1999b; Lino-Neto et al. 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a).

Em geral em Hymenoptera o núcleo é alongado possuindo cromatina compacta, homogênea eletrondensa. Entretanto na formiga *Solenopsis invicta* (Lino-Neto & Dolder 2002) e Halictidae (Fiorillo et al. 2005) e em Xylocopini (Fiorillo et al. 2009) o núcleo possui áreas electron lúcidas. O comprimento do núcleo varia muito entre as espécies, medindo de 4 µm (Quicke et al. 1992) a 105 µm (Lino-Neto et al. 1999). Em alguns grupos o núcleo assume forma espiralada (Quicke et al. 1992; Quicke 1997; Lino-Neto et al. 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a, 2001b, Zama et al. 2007).

O adjunto do centríolo é uma estrutura eletrondensa e alongada, localizada paralelamente ao axonema, entre a base do núcleo e a extremidade anterior de um ou de ambos derivados mitocondriais (Lino-Neto et al., 2000b; Newman & Quicke 1998, 1999b, 2000; Zama et al. 2001). O adjunto de centríolo tem sido classificado em Hymenoptera como simétrico e assimétrico em relação a sua posição em relação aos derivados mitocondriais. Sendo que simétrico é quando ele termina junto às extremidades anteriores dos dois derivados mitocondriais e, assimétrico, quando ele se posiciona em paralelo com um derivado mitocondrial e o axonema e termina à frente do outro derivado.

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

et al. 2000a, 2001b; Zama et al. 2001). Assim como o núcleo, o axonema de algumas espécies apresenta um padrão espiralado (Quicke et al., 1992; Quicke, 1997; Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a, 2001b).

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

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

Trabalhos que descrevem a ultra-estrutura dos espermatozoides têm gerado um número grande de caracteres que já se mostraram promissores para trabalhos em sistemática de insetos (Araújo et al. 2005; Fiorillo et al. 2009; Lino-neto et al. 2008a, 2008c; Moreira et al. 2010; Newman & Quicke 1999a; Quicke et al. 1992; Zama et al., 2001; 2004).

1.4. Referências Bibliográficas

- Araújo VA, Zama U, Neves CA, Dolder H, Lino-Neto J. 2005. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci* 22: 129– 137.
- Baccetti, B; Bairati A. 1964. Indagini comparative sull'ultrastrutture delle cellule germinale maschili in *Dacus oleae* Gmel ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera)'. *Redia* 49:1-29.
- Brothers, DJ; 1975. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference a Mutillidae. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 50, 483-648.
- Borror, DJ; Triplehorn CA; Jonhson, NF. 1992. An introduction to the study of insects. Saunders, Harcourt Brace.
- Caetano, FH. 1980. Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). *Naturalia* 5: 105-111.
- Chapman, RF. 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cherret, JM. 1986. History of the leaf-cutting ant problem. In: Lofgren CS & Vander Meer RK. (eds.) *Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management*. Westview Press, Boulder. pp. 10-17.
- Cruz-Landim, C; Beig, D. 1980a. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Intern. J. Invert. Reprod.*, v.2, p.271-283..
- Cruz-Landim, C; Beig, D. 1980b. Meiose nos Hymenoptera. *Cien. Cult.*, v. 33, p. 937-966.
- Cruz-Landim, C; 2001. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia*, 91, 183-189.
- Conte, M; Lino-Neto J; Dolder H. 2005. Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidiodes* (Hymenoptera: Apidae): Fate of the atypical spermatids. *Caryologia* 58:183-188.
- Ferreira, A; Abdalla FC; Kerr WE; Cruz-Landim C. 2004. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop Entomol* 33: 569-576.
- Fiorillo, B; Coelho AAM; Lino-Neto J; Bão SN. 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37: 75-81.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto J; Bão SN. 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39: 1271-1280.
- Fiorillo, B; Zama U; Lino-Neto J; Bão SN. 2009. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae) *Acta Zool.* 89: 1463-1470.
- Gracielle, I.M.S; Fiorillo, B.S; Lino-Neto J; Bão S.N. 2009. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* 40, 419–425. 209

- Hachiohe, K; Onishi, A. 1952. On the meiosis of the drone of honey bee (*Apis mellifera*). Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., G3, p.83-87..
- Hanson, PE.1995. Economic importance of Hymenoptera. In: Hanson PE & Gauld ID. The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press, New York.
- Hanson, PE; Gauld, ID. 1995. The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press;Oxford, UK, xx + 893 pp.
- Jamieson, BGM., Dallai, R; Afzelius, BA.1999. Insects: their spermatozoa and phylogeny. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.
- Kerr, WE; Silveira, V. 1974. A note on the formation of honeybee spermatozoa. J. Apicul. Res., v.13, p. 121-126.
- LaSalle, J; Gauld, ID. 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: LaSalle J & Gauld ID. Hymenoptera and Biodiversity. CAB International, UK. pp 1-26.
- Lino-Neto, J; Bao, 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; Bao S.N; Dolder H. 2000a. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Acta Zoologica. (Stockholm) 81: 205-211.
- Lino-Neto, J; Bao 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 (Stockholm) 82: 159-164.
- Lino-Neto, J; Dolder, H. 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* Bauren (Hymenoptera, Formicidae). Tissue & Cell: 34, 124-128.
- Lino-Neto, J; Zama, U; Mancini, K. 2008a. Morfologia dos espermatozóides de Hymenoptera. In: Vilela EF; Santos IA; Schoereder JH; Campos LAO; Lino-Neto J (Org.). Insetos Sociais: Da Biologia  Aplicaao. 1 ed. Viçosa-MG: UFV, 2008, v. 1, p. 150-173.
- Lino-Neto, J; Dolder, H; Mancini, K; Mercati, D; Dallai, R. 2008b. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). Tissue Cell 40: 185–193.
- Lino-Neto, J; Araújo, VA., Heidi, D. 2008c. Inviability of the Spermatids with Little Cytoplasm in Bees (Hymenoptera, Apidae) Sociobiology Vol. 51, No. 1,
- Moreira, PA; Araújo, VA; Zama, U; Lino-Neto J. 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). Neotropical Entomology 37(4): 429-435.

- Moreira, J; Araújo, VA, Bão, SN; Lino-Neto, J. 2010. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron*. 41. 187-192.
- 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: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 35-47.
- Newman, TM; Quicke, DLJ. 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucilidae). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 197-203.
- Newman, TM; Quicke, DLJ. 2000. Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research* 9: 62-70.
- Nieves-Aldrey, JL; Fontal-Cazalla FM. 1999. Filogenia y evolucion del orden Hymenoptera, In: Meli, A., de Haro, J.J., Mendez, M. & Ribera, I. (eds.) *Evolucion y Filogenia de Arthropoda*. Monographico SEA No. 26. Zaragoza, PP 459-474.
- O'Toole, C.1992. Diversity of native bees and agroecosystem. In: LaSalle J & Gauld ID. *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, UK. pp. 277-293.
- 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. Scripta* 21: 381-402.
- Quicke, DJL .1997. *Parasitic wasps*. Chapman and Hall; London, UK, xvi + [1] + 470 pp.
- Rasnitsyn, AP. 1980. Origin and evolution of hymenopterous insects. *Trudy Paleontologicheskogo Instituta Akademiyi Nauk SSSR* 174: 1-191.
- Rasnitsyn, AP. 1988. An outline of the evolution of the hymenopterous insects (Order Vespida). *Orient Insects* 22: 115-145.
- Roig-Alsina, A; Michener, CD. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongue bees (Hymenoptera: Apoidea). *University Kansas Sciences Bulletin*. 55: 123-162.
- Ronquist, F; Rasnitsyn, AP; Roy, A; Eriksson, K; Lindgren, M. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. *Zool. Scr.* 28: 13-50.
- Smith, DR. 1995. The sawflies and woodwasps. In *The Hymenoptera of Costa Rica*. Hanson, P. & Gauld, I (Eds.) 1995.
- Triplehorn, CA; Johnson, NF. 2005. *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. 7th ed. Thomson-Brooks/Cole, Belmont, CA.
- Wheeler, DE; Crichton, ED; Krutzsch, PH. 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae:Hymenoptera). *Journal of Morphology*. 206, 343-350.
- Wheeler, DE; Krutzsch, PH. 1992. Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* 211: 307-317.

- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research* 10: 261-270.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Dolder, H. 2004. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell* 36, 29-41.
- Zama, U; Lino-Neto J, Melo SM, Campos LAO, Dolder H. 2005. Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes. Sociaux.* 52, 122-131.
- Zama, U; Moreira, JCS; Bão, SN; Campos, LAO; Dolder, H; Lino-Neto, J. 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigma arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod. Struct. Dev.* 36, 304-316.

2. Objetivos

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

- Caracterizar a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de espécies de Hymenoptera.
- Descrever a anatomia e a histologia do sistema reprodutor em espécies de Hymenoptera.
- Descrever o número de espermatozoides por feixe em abelhas corbiculadas.
- Utilizar caracteres derivados do sistema reprodutor masculino de abelhas corbiculadas para auxiliar estudos de sistemática e biologia reprodutiva.
- Comparar os dados ultra-estruturais obtidos com os existentes na literatura, procurando caracteres consistentes que possam contribuir para futuras análises filogenéticas.

Morphological aspects of testes and sperm ultrastructure in the 'symphyta' *Digelasinus diversipes* Kirby 1882 (Hymenoptera: Argidae: Dielocerinae)

Jane Moreira^{1*,3*} Vinícius Albano Araújo² & José Lino-Neto³

Microscopy Research and Technique In press

ABSTRACT

In *Digelasinus diversipes*, spermatozoa are maintained in bundles, with 74 spermatozoa on average, in the seminal vesicle. These spermatozoa are very short (20 μm) and consist of a head and flagellum. The head includes an acrosome (perforatorium covered by the acrosomal vesicle) and a nucleus. A regular electron-lucent region separates the acrosomal vesicle from the perforatorium, which is inserted parallel to the anterior ending of the nucleus. The small flagellum is composed of two symmetrical mitochondrial derivatives, a centriolar adjunct, an axoneme (9 + 9 + 2) and two accessory bodies. The centriolar adjunct begins above the posterior end of the nucleus and ends covering the anterior tip of two mitochondrial derivatives. In the terminal region of the axoneme, the central microtubules terminate first. The presence of a sub-acrosomal space, a short mitochondrial derivative diameter and a short spermatodesm are the ultrastructure characteristics of spermatozoa shared by all 'symphyta' species. Differences in the insertion of the perforatorium into the nucleus and the position of the centriolar adjunct distinguish Dielocerinae and the Arginae studied previously. The number of spermatozoa per cyst is variable. Furthermore, additional characteristics that had not been described for 'symphyta' were also found, such as the number of follicles per testis.

Key words: reproductive system, sperm, centriolar adjunct, cyst and bundle.

1. INTRODUCTION

Hymenoptera were traditionally divided into the suborders Symphyta and Apocrita (Gauld & Bolton, 1996; LaSalle & Gauld, 1993). In fact, 'symphyta' form a paraphyletic group composed of the Xyeloidea, Tenthredinidae, Pamphiliidae, Cephoidea, Siricoidea, Xiphydriidae and Orussidae superfamilies (Schulmeister, 2003a).

Over the past 50 years, comparative studies that focused on molecular and morphological data have clarified questions related to the phylogeny of the 'symphyta' superfamilies and their relationship with Apocrita (Basibuyuk & Quicke, 1995, 1997, 1999; Gibson, 1985, 1993; Heraty et al., 1994; Johnson, 1988; Rasnitsyn, 1969, 1988; Ronquist et al., 1999; Schulmeister 2001, 2003a, b, c; Schulmeister et al., 2002; Togashi, 1970; Vilhelmsen, 1996, 1997, 1999, 2000a, b, c; Whitfield et al., 1989). Nonetheless, some questions at the genus and family levels remain to be clarified.

Argidae is the second largest family of the Tenthredinoidea, with more than 800 species already described. Based on the common synapomorphies shared by each family, the monophyly of the Tenthredinoidea has been amply discussed (Schulmeister, 2003b, c). In Argidae, only sperm ultrastructure of Arginae *Arge pagana* was described with details (Lino-Neto et al., 2008).

Quicke et al. (1992) described the spermatozoa ultrastructure of various species in 'symphyta' and reported differences in the typical characteristics of the taxa, providing new phylogenetic indicators for the group. Subsequent studies on other species of 'symphyta' (Lino-Neto et al., 2008; Newmam & Quicke, 1999; Schiff et al., 2001) reported synapomorphies and revealed the importance of describing the ultrastructure of these cells in other 'symphyta' species so that more consistent phylogenetic conclusions could be drawn.

The present study describes the morphological aspects of the testis and sperm ultrastructure of *Digelasinus diversipes* (Argidae: Dielocerinae) with the objective of describing characteristics that will add to systematic studies of this group.

2. MATERIALS AND METHODS

Digelasinus diversipes nests were collected in Atlantic forest fragments areas in Viçosa, MG, Brazil. The nests were kept in the laboratory of Structural Biology, Federal University of Viçosa until emergence of adults.

2.1. Light microscopy: For the histological investigation, testis and seminal vesicles of five mature adult males were dissected and fixed for 6 h in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid, 3% sucrose and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The materials were postfixed in 1% osmium tetroxide, in the same buffer, for 2 h. Dehydration was carried out in ethanol and embedding in GMA (Leica). Thin sections were stained with toluidine blue.

Sperm suspension was extracted from five seminal vesicles, spread on glass microscope slides and fixed for 20 min in a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, the preparations were observed with a photomicroscope (Olympus, BX-60) equipped with phase contrast and 200 spermatozoa were photographed, to then be measured. To access nucleus measurements, some of these preparations were stained for 15 min with 0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in PBS, washed, and mounted with 50% sucrose. They were examined with an epifluorescence microscope (Olympus, BX-60), equipped with a BP 360–370 nm excitation filter. All measurements were obtained with the software Image Pro-Plus, version 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA) and the lengths were averaged from the total number of spermatozoa analyzed.

2.2. Transmission electron microscopy: For the ultrastructural investigation, seminal vesicles for four males was fixed for 24 h, at 4 °C, in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid, 3% sucrose and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. After rinsing in buffer, they were post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h. Dehydration was carried out in acetone,

followed by Epon embedding. Ultrathin sections were stained with the 2% uranyl acetate and 0.2% lead citrate in 1 M sodium hydroxide and observed by transmission electron microscope (Zeiss, Leo 1011), operating at 80 kV.

3. RESULTS

The male reproductive system of *Digelasinus diversipes* consists of two testes, a pair of vas deferens and a pair of accessory glands. Each testis is composed of the 22 follicles (Figure 1A). The spermatozoa develop synchronically within each follicle in cysts maintained by the cystic cell (Figure 1B). Approximately 74 spermatozoa are found in each cyst (Figure 1C). The spermatozoa are released from the testis in bundles, passing through the efferent ducts and reaching the vas deferens. There is a specialized dilated, circular-shaped region in the vas deferens known as the seminal vesicle in which the spermatozoa are stored in bundles until the moment of copulation.

The spermatozoa of *D. diversipes* are short, measuring approximately 20 μm in length. They can be divided into two regions: the head and the flagellum. The head is composed of the nucleus, which is approximately 16 μm in length, and the acrosome (Figure 2A). The acrosome consists of the perforatorium, which is paracrystalline and covered by the acrosomal vesicle (Figure 2 A-B). The anterior end of the perforatorium ends in a sub-acrosomal space (Figure 2A). A portion of the perforatorium that exceeds half its length is found running parallel to the apex of the nucleus (Figure 2A). A regular electron-lucent region separates the acrosomal vesicle from the perforatorium (Figure 1B). A cross-section of this area shows that the perforatorium is covered on one side by the nucleus and on the other by the acrosomal vesicle (Figure 2B, C). The nucleus is uniformly filled with condensed chromatin (Figure 2D-F) and is circular in shape at the cross-sections (Figure 2D). In the posterior region, it narrows into a cone-like shape and terminates in the region preceding the centriole (Figure 2E).

The centriolar adjunct, an electron-dense structure, originates parallel to the posterior end of the nucleus and runs in parallel to this for 1.25 μm , and is located in

the nucleus-flagellum transition region (Figure 2E, G). The centriolar adjunct runs parallel to the centriole region (Figure 2H) for 0.25 μm and ends by covering the anterior tip of two mitochondrial derivatives (Figure 2I).

The flagellum is formed by two mitochondrial derivatives, the axoneme and two accessory bodies. The mitochondrial derivatives are elongated structures that run parallel to the axoneme (Figure 2I-K). The diameters of the derivatives are approximately the same (Figure 2I-K). One accessory body is found between each of the mitochondrial derivatives and the axonema (Figure 2K).

The axoneme extends along the entire length of the flagellum and has the 9 + 9 + 2 microtubule pattern, with nine external microtubule accessories, nine doublets and one central pair (Figure 2K). The axonemal region closest to the base of the nucleus, known as the centriolar region, is characterized by the absence of the central pair of microtubules (Figure 2H). The axoneme and two mitochondrial derivatives are found in the final portion of the flagellum, but possibly the axoneme is the last component to undergo disorganization (Figure 2L).

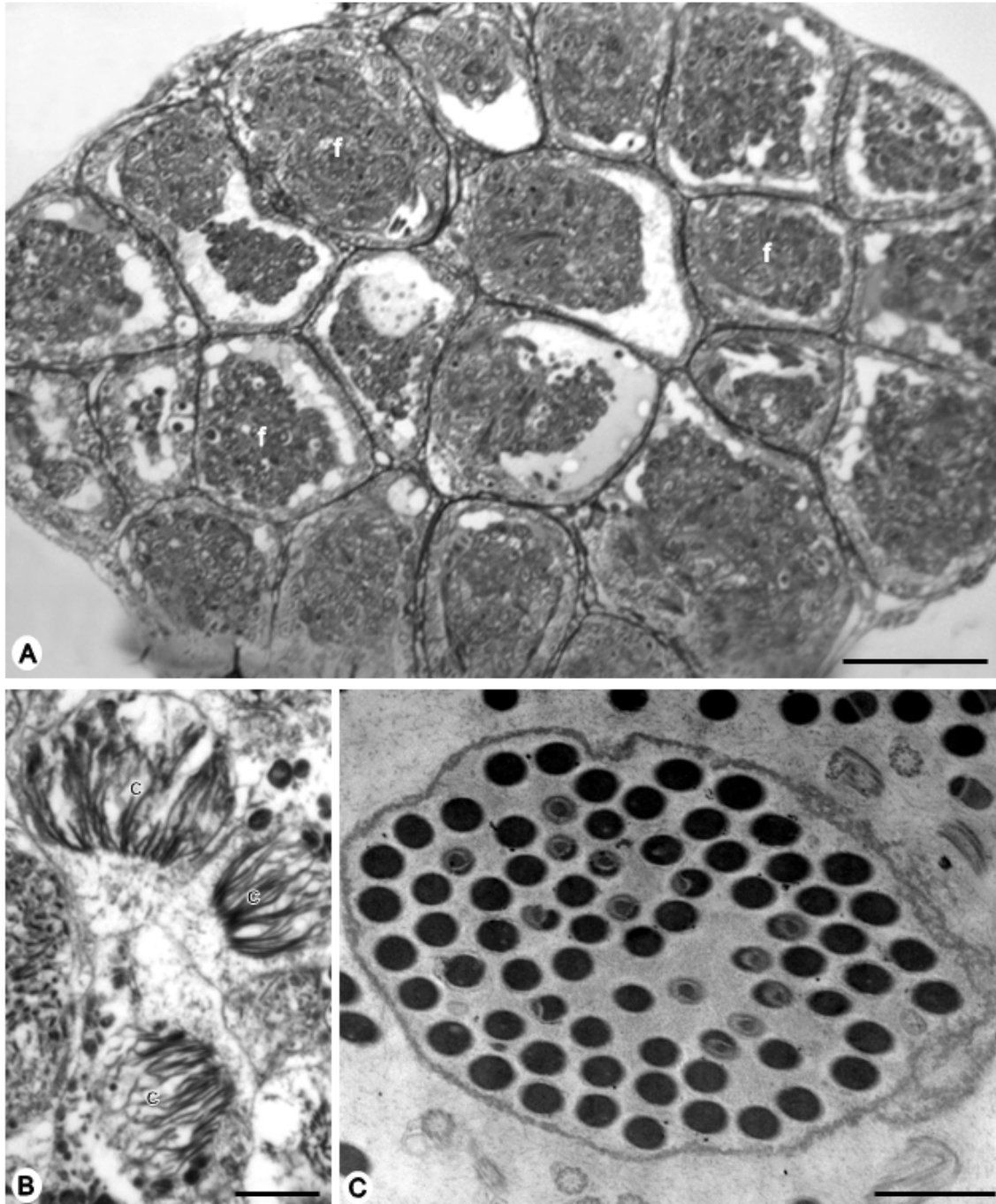


Figure 1. Morphology of the male reproductive system and spermatozoa of *Digelasinus diversipes*. **A-B.** Light micrograph of testes and **C-** Electronic micrograph of spermatozoa. **A-** Cross section of testis showing the follicles (f). **B-** Follicular cysts (c) containing spermatozoa in bundle. **C-** Cross section of a cyst containing 74 spermatozoa. Scale bars: 1 A= 10 μ m; 1 B= 0.3 μ m; 1C= 1 μ m.

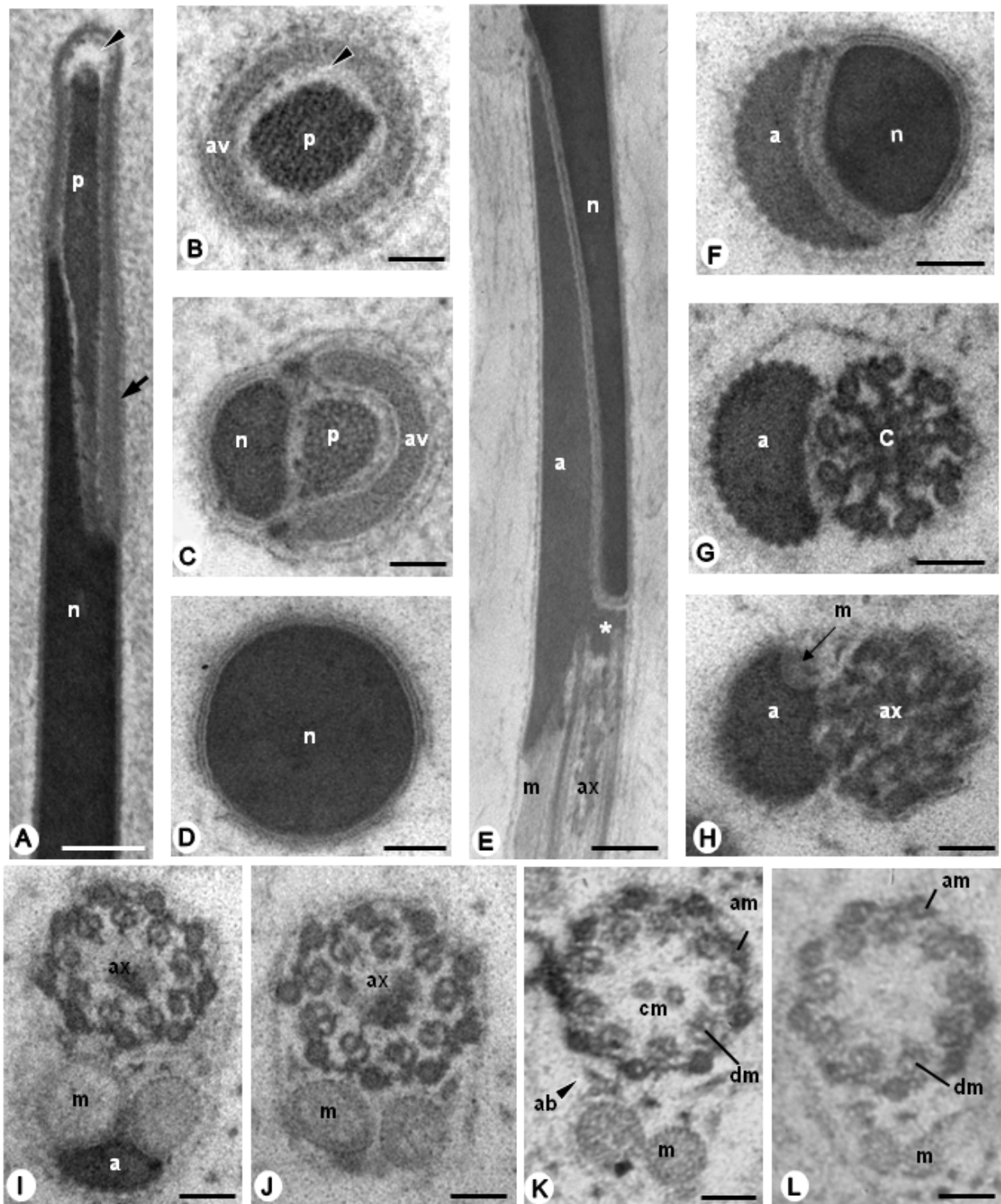


Figure 2. Electron micrograph of *Digelasinus diversipes* spermatozoa. **A-** Longitudinal section of the head region, showing the nucleus (n) and the acrosome composed by the acrosomal vesicle (arrow) and the perforatorium (p). The arrow head indicates the subacrosomal space in the region anterior to the acrosome. **B-** Cross section of the acrosome showing the regular electron-lucent region (arrow head) which separates the acrosomal vesicle (av) from the paracrystalline perforatorium (p). **C-** Cross section of the region posterior to the head, showing the perforatorium (p) enveloped by one side of the nucleus (n) and the other by the acrosomal vesicle (av). **D-** Cross section of the nucleus (n) filled with condensed chromatin. **E-** Longitudinal section of the nucleus-flagellum transition region. The posterior region of the nucleus (n) becomes pointed in the shape of a cone and terminates in the region preceding the centriole (asterisk), above the axoneme (ax). It was observed that the electron-dense centriolar adjunct (a) initiated

parallel to the posterior extremity of the nucleus. **F-** Cross section of the region in which the nucleus (n) and centriolar adjunct (a) are in parallel. **G-** Cross section of the region in which the centriolar adjunct (a) is parallel to the region of the centriole (c). **H-L-** Cross section of the flagellum. **H-I** the region in which the centriolar adjunct terminates enveloping the two mitochondrial derivatives (m). **J-** Mitochondrial derivatives (m) with similar diameter and in parallel to the axoneme (ax). **K-** The mitochondrial derivatives (m) and the axoneme, two triangular accessory bodies are observed (arrow head). The axoneme is composed of accessory microtubules (am), nine doublets (dm) and one central pair of microtubules (cm). **L-** Final portion of the flagellum, showing that the central pair of microtubules is the first to disappear in the posterior extremity. Scale bars: 2A, D= 0.25 μm ; 2B and C = 0.1 μm ; 2F to L= 0.1 μm .

4. DISCUSSION

Many similar morphological characteristics associated with the male reproductive system were found in comparative studies on the Hymenoptera (Araújo et al., 2005a, b, 2009; Brito et al., 2005; Bushrow et al., 2006; Dallacqua & Cruz-Landim, 2003; Damiens & Boivin, 2005; Ferreira et al., 2004; Fiorillo et al., 2008, 2009; Moreira et al., 2008, 2010). On the other hand, these studies also identified several features that differed between the various groups. The number of follicles per testis, for example, may vary considerably. In Aculeata Apidae, some bees subfamilies, such as Colletinae, Halictinae and Andreninae, and some members of the Megachilinae have three follicles per testis (Ferreira et al., 2004), while the majority of Apinae, Mellitinae and Megachilinae have four follicles per testis (Araújo et al., 2005b; Ferreira et al., 2004; Roig-Alsina & Michener, 1993), with the exception of *Apis mellifera*, which has 250 follicles (Chapman, 1998), and *Hypanthidium foveolatum*, which has 28 follicles (Gracielle et al., 2009). In Formicidae, the number of follicles ranges from 1 to 25 (Wheeler & Krutzsch, 1992). A single follicle was found in each testis in some species of parasitic wasps (Fiorillo et al., 2008; Moreira et al., 2010), whereas in *D. diversipes* there is 22 follicles. There are no reports in the literature for any of the other species of 'symphyta'.

In *D. diversipes*, as in other species of 'symphyta' (Lino-Neto et al., 2008; Newman & Quicke, 1999; Quicke et al., 1992; Schiff et al., 2001), spermatozoa are maintained in bundles in the seminal vesicle. Moreira et al. (2004) reported that in the majority of Aculeata the spermatozoa exit the testis in bundles; however, these bundles become unraveled by the time they reach the seminal vesicle. Lino-Neto et al. (2008)

suggested that this difference between the 'symphyta' and the Aculeata might be associated with the enzymatic content and/or the pH of the fluids present in the lumen of the seminal vesicle of Aculeata.

Males can be prospermatogenic when they emerge with all of their sperm stock or synspermatogenic if they produce sperm during their adult life (Boivin et al., 2005). The testis of adult *D. diversipes* is synspermatogenic, whereas they contain cysts with a spermatogonial lineage in the other phases of maturity. However, the males of social Hymenoptera (bees and ants) only produce spermatozoa once (Araújo et al., 2005b; Dallacqua & Cruz-Landim, 2003).

The number of spermatozoa per cyst reflects the final number of cells developing synchronously within the cysts of a single spermatogonium. Males of *D. diversipes* (Dielocerinae) are haploid and the 74 spermatozoa per cyst indicate the occurrence of six mitosis cycles. In *Arge pagana* (Arginae), there are 240 to 350 spermatozoa per cyst, indicating the occurrence of seven or eight mitosis cycles (Lino-Neto et al., 2008), while in other species of 'symphyta' a considerable variation was found in the number of spermatozoa per cyst (Schiff et al., 2001). Lino-Neto et al. (2008) attributed this variation to the probable apoptosis of the germ cells, a well-defined process in mammal germ cells and considered normal during spermatogenesis (Roose-Ruge, 1977).

Spermatozoa of the *Digelasinus diversipes*, measuring 20 µm in length, are the shortest species reported for 'symphyta'. Short spermatozoa are commonly found in members of the Argidae family, such as *A. pagana* (30 µm) (Lino-Neto et al., 2008) and *A. nigripes* (29 µm) (Quicke et al., 1992). They are smaller than those of other families of Tenthredinoidea. For example, the spermatozoa of *Diprion pini* (Diprionidae) measure 73 µm, while in five other members of the Tenthredinoidea family the length of this cell ranges from 56 to 64 µm (Quicke et al., 1992). The spermatozoa are longer in other 'symphyta' superfamilies. For example, the spermatozoa of *Xyela jullii* (Xyeloidea) are 160 µm in length (Newman & Quicke, 1999). In *Cephalcia arvensis*

(Pamphiloidea), these cells measure approximately 100 μm and in Cephoidea they range from 49 μm to 54 μm (Quicke et al., 1992). The length of these cells does not appear to be related to phylogeny in the superfamilies, although it is a homoplastic characteristic; however, this measurement may be useful in taxonomic studies, principally those involving Hymenoptera species in which the degree of sexual dimorphism is high (Pereira et al., 2008).

In *D. diversipes*, as in other Argidae such as *A. pagana* (Lino-Neto et al., 2008), and *A. nigripes* (Quicke et al., 1992), the perforatorium terminates in an apparently empty sub-acrosomal space in the anterior region of the acrosome. This characteristic is shared by *Athalia* sp., *Calameuta pallipes*, *Diprion pini* (Diprionidae) (Quicke et al., 1992), *Tremex* sp. (Siricoidea), *Cephalcia arvensis* (Pamphiloidea), and *Xyela jullii* (Xyeloidea) (Newman & Quicke, 1999), representing a synapomorphy for basal Hymenoptera 'symphyta'. However, the length and diameter of the acrosome and perforatorium vary significantly between these species.

The insertion of the base of the perforatorium into a cavity at the anterior extremity of the nucleus is a feature found in all Hymenoptera, and is considered a synapomorphic characteristic of the order (Jamieson et al., 1999). However, variations in the depth of insertion are found between the different species. In *D. diversipes* (Dielocerinae), the perforatorium extends alongside the nucleus and continues parallel for approximately half its length. However, in *A. pagana* (Arginae) (Lino-Neto et al., 2008), the perforatorium is inserted into a central cavity of the nucleus over an extension of approximately a quarter of its length. This characteristic can be used to separate these subfamilies within the Argidae.

In the nuclear-flagellar transition zone, a common characteristic among *D. diversipes* (Dielocerinae) and *A. pagana* (Arginae) (Lino-neto et al., 2008) is that the centriolar adjunct originates above the nuclear base. However, the mitochondrial derivatives have different insertions since in *D. diversipes* they start together and below the centriolar adjunct and *A. pagana* the large mitochondrial derivative comes before

the smaller mitochondrial derivative. The position of two mitochondrial derivatives enables *D. diversipes* (Dielocerinae) to be separated from *Arge pagana* (Arginae). The position of the centriolar adjunct in *A. pagana*, running parallel to one of the two mitochondrial derivatives, was also observed in the tenthredinid *Athalia* sp. (Quicke et al., 1992). This arrangement also occurs in other 'symphyta', such as Cephoidea (Quicke et al., 1992) and Xyeloidea and Megalodontoidea (Newman & Quicke, 1999). In *Tremex* sp. (Siricoidea), the centriolar adjunct begins below the nuclear base and ends, as in *D. diversipes*, surrounding the anterior tip of the two mitochondrial derivatives. In contrast to *D. diversipes* and *A. pagana*, in many Aculeata, the mitochondrial derivative originates above the nuclear base (Araújo et al., 2005b; Fiorillo et al., 2008).

In *D. diversipes*, as in all of the other reported 'symphyta', the two mitochondrial derivatives are oval shaped and have a similar diameter at their cross-sections (Lino-Neto et al., 2008; Newman & Quicke, 1999; Quicke et al., 1992). The single exception is the spermatozoa of *Xyela jului* (Xyeloidea) (Newman & Quicke, 1999), in which these structures are circular with different diameters. The smaller diameter of the mitochondrial derivatives in *D. diversipes*, *A. pagana* (Lino-Neto et al., 2008) and *Athalia* sp. (Quicke et al. 1992) is a synapomorphy that gathers these three species of Tenthredinidae into a group and differentiates them from other 'symphyta' families.

The axoneme in *D. diversipes* terminates abruptly, with the central microtubules being the first to terminate as in the other 'symphyta' (Lino-Neto et al., 2008; Quicke et al. 1992).

The spermatozoa of the *D. diversipes* species analyzed in the present study have various morphological characteristics in common with other previously described 'symphyta'. These similarities may aid in phylogenetic studies of the group based on the following characteristics: (1) the presence of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle; (2) a sub-acrosomal space in the region anterior to the acrosome and (3) small mitochondrial derivative diameters. Other characteristics differ significantly from those

of other 'symphyta', such as the number of spermatozoa per bundle. The insertion of the perforatorium into the nucleus and the position of the mitochondrial derivatives enable two subfamilies to be differentiated in Argidae. Such differences point to the need to characterize spermatozoa in various species of the different 'symphyta' families so that phylogenetic inferences can contribute toward explaining the evolutionary features of this group.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Nucleus of Electron Microscopy and Microanalyses of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) and the Universidade de Brasília (UnB). This study was supported by the Brazilian agencies *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES); *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG).

REFERENCES

- Araújo VA, Zama U, Neves CA, Dolder H, Lino-Neto J. 2005a. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci* 22: 129–137.
- Araújo VA, Zama U, Dolder H, Lino-Neto J. 2005b. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sci* 22: 137–141.
- Araújo VA, Moreira J, Lino-Neto J. 2009. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron* 40: 719–723.
- Basibuyuk HH, Quicke DLJ. 1995. Morphology of the antenna cleaner in the Hymenoptera with particular reference to nonaculeate families (Insecta). *Zool Scr* 24: 157–177.
- Basibuyuk HH, Quicke DLJ. 1997. Hamuli in the Hymenoptera (Insecta) and their phylogenetic implications. *J. Nat. Hist.* 31: 1563–1585.
- Basibuyuk HH, Quicke DLJ. 1999. Gross morphology of multiporous plate sensilla in the Hymenoptera (Insecta). *Zool Scr* 28: 51–67.
- Boivin G, Jacob S, Damiens D. 2005. Spermatogeny as a life-history index in parasitoid wasps. *Oecologia* 143: 198–202.

- Brito P, Moreira J, Lino-Neto J. 2005. Morphology of male reproductive system and sperm of *Mischocyttarus* sp. (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Braz. J. Morphol. Sci* 22(Suppl.): 175–176.
- Bushrow ES, Fuller CL, Cowan DP, Byrd CA. 2006. Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invert. Biol* 125(4): 354-362.
- Chapman RF. 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge. 770p.
- Dallacqua RP, Cruz-Landim C. 2003. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anatomia Histologia Embryologia. J. Vet. Med. Series C* 32: 276-281.
- Damiens D, Boivin G. 2005. Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. *Physiol Entomol* 30: 241-247.
- Ferreira A, Abdalla FC, Kerr W, Cruz-Landim C. 2004. Systematics, morphology and physiology. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol* 33: 569-576.
- Fiorillo BS, Lino-Neto J, B ao SN. 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39: 1271-1280.
- Fiorillo B, Zama U, Lino-Neto J, B ao SN. 2009. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae) *Acta Zool.* 89: 1463-1470.
- Gauld I, Bolton B. 1996. *The Hymenoptera*. London, Oxford University Press, 839 p.
- Gibson GAP. 1985. Some pro-and mesothoracic structures important for phylogenetic analysis of Hymenoptera, with a review of terms used for the structures. *Can Entomol* 117: 1395–1443.
- Gibson GAP. 1993. Groundplan structure and homology of the pleuron in Hymenoptera based on a comparison of the skeletomusculature of Xyelidae (Hymenoptera) and Raphidiidae (Neuroptera). *Mem Ent Soc Can* 165: 165–187.
- Gracielle IMS; Fiorillo BS; Lino-Neto J; B ao SN. 2009. Morphology male reproductive system and spermatogenesis of the *Hypanthidium rubriventris* (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* 40: 419–425.
- Heraty JM, Woolley JB, Darling DC. 1994. Phylogenetic implications of the mesofurca and mesopostnotum in Hymenoptera. *J Hym Res* 3: 241–277.
- Jamielson BGM; Dallai R; Afzelius BA (1999) *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, New Hampshire, p. 554.
- Johnson NF, 1988. Midcoxal articulations and the phylogeny of the order Hymenoptera. *Ann. Ent Soc Am* 81: 870–881.
- LaSalle J, Gauld ID. 1993. In: LaSalle, J., Gauld, I.D. (Eds.), *Hymenoptera: Their Diversity and Their Impact on the Diversity of Other Organisms Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B International, UK, pp. 1–26.
- Lino-Neto J, Araújo VA, Dolder H. 2008. Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* 51 (1): 163–172.

- Moreira J, Zama U, Lino-Neto J. 2004. Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *B. J. Morphol. Sci.*, 21(4), 185-189
- Moreira PA, Araújo VA, Zama U, Lino-Neto J. 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop Entomol* 37 (4): 429–435
- Moreira J, Araújo VA, Báo SN, Lino-Neto J. 2010. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron* 41: 187.192.
- Newman TM, Quicke DLJ. 1999. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: symphyta). *J Hym Res* 8: 35–47.
- Pereira RAS, Lino-Neto J, Prado AP. 2008. Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. *Symbiosis* 45: 143–147
- Quicke DLJ, Ingram SN, Baillie HS, Gaitens PV. 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool Scripta* 21: 381-402.
- Rasnitsyn AP. 1969. Origin and evolution of the lower Hymenoptera. *Trudypaleontologicheskii Instituta (Akademiya Nauk SSSR)*. 123: 1–196.
- Rasnitsyn AP. 1988. An outline of evolution of the hymenopterous insects. *Orient Insects* 22: 115–145.
- Roig-Alsina A, Michener CD. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *University of Kansas Science Bulletin* 55: 124-162.
- Ronquist F. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): The state of the art. *Zool Scr* 28: 3–11.
- Roosen-Ruge EC. 1977. *The Process of Spermatogenesis in Animals*. Academic Press, Cambridge.
- Schif N, Flemming AJ, Quicke DLJ. 2001. Spermatodesmata of the sawflies (Hymenoptera: symphyta): evidence for multiple increases in sperm bundle size. *J. Hym. Res.* 10, 119–125.
- Schulmeister S. 2001. Functional morphology of the male genitalia and copulation in lower Hymenoptera, with special emphasis on the Tenthredinoidea s. str. (Insecta, Hymenoptera, 'Symphyta'). *Acta Zoologica* 82:331–349.
- Schulmeister S, Wheeler WC, Carpenter JM. 2002. Simultaneous analysis of the basal lineages of Hymenoptera (Insecta) using sensitivity analysis. *Cladistics* 18: 455–484.
- Schulmeister S. 2003a. Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): introducing robust-choice sensitivity analysis. *B J Linnean Soc* 79: 245–275.
- Schulmeister S. 2003b. Review of morphological evidence on the phylogeny of basal Hymenoptera (Insecta), with a discussion of the ordering of characters. *B J Linnean Soc* 79: 209–244.
- Schulmeister S. 2003c. Morphology and evolution of the tarsal plantulae in Hymenoptera (Insecta), focussing on the basal lineages. *Zool Scrip* 32: 153–172.
- Togashi I. 1970. The comparative morphology of the internal reproductive organs of the Symphyta (Hymenoptera). *Mushi* 43 (Suppl.): 1–114.

- Vilhelmsen L. 1996. The preoral cavity of lower Hymenoptera (Insecta): comparative morphology and phylogenetic significance. *Zool Scr* 25: 143–170.
- Vilhelmsen L. 1997. The phylogeny of lower Hymenoptera, with a summary of the early evolutionary history of the order. *J Zool Syst Evol Res* 35: 49–70.
- Vilhelmsen L. 1999. The occipital region in the basal Hymenoptera (Insecta): a reappraisal. *Zool Scr* 28: 75–85.
- Vilhelmsen L. 2000a. Before the wasp–waist: comparative anatomy and phylogenetic implications of the skeleto-musculature of the thoraco-abdominal boundary region in basal Hymenoptera (Insecta). *Zoomorphology* 119: 185–221.
- Vilhelmsen L. 2000b. Cervical and prothoracic skeleto-musculature in the basal Hymenoptera (Insecta): comparative anatomy and phylogenetic implications. *Zool Anz* 239: 105–138.
- Vilhelmsen L. 2000c. The ovipositor apparatus of basal Hymenoptera (Insecta): phylogenetic implications and functional morphology. *Zool Scr* 29: 319–345.
- Wheeler DE, Krutzsch PH. 1992. Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J Morphol* 211: 307–317.
- Whitfield JB, Johnson NF, Hamerski MR. 1989. Identity and phylogenetic significance of the metapostnotum in nonaculeate Hymenoptera. *Ann Ent Soc Am* 82: 663–673.

The descriptions of new microanatomical structures of the male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae)

Jane Moreira, Pedro Brito, Karina Mancini, Heidi Dolder and José Lino-Neto

Micron In press

ABSTRACT

The male reproductive system of *Mischocyttarus cassununga* consists of two testes, each one with three follicles, as occurs in most Vespidae. The seminal vesicle is divided in two chambers, separated by a constriction, so that the anterior locus is a little larger. In the testicular follicles, the spermatozoa are organized in cysts, with approximately 128 per cyst, where the nuclei are oriented toward the follicle center. The spermatozoa of *M. cassununga* is about 97 μm in length, which makes them the shortest sperm described for Vespidae. Sperm ultrastructure of *M. cassununga* is very similar of the others Vespidae. But, despite these similarities, the bilobated mitochondrial derivative represents an autapomorphy for *M. cassununga*. The subdivision of the seminal vesicle has never been observed in any other Vespidae. Thus, this study supports the validity of insect sperm morphology as a tool for phylogenetic analysis within Hymenoptera.

Key words: Testes, insect, ultrastructure, cyst and seminal vesicle

1. INTRODUCTION

Studies in temperate and tropical regions indicate that Hymenoptera is the order of Insecta that is richest in species (Gaston, 1991; Grimaldi and Engel, 2005; Sharkey, 2007). These species are pollinators, phytophagous, predators and parasitoids and therefore are of great interest, economically and ecologically.

With approximately 4500 species described, the Vespidae family is classified in six apparently monophyletic subfamilies (Carpenter, 1991), varying from solitary to eusocial (Crespi and Yanega, 1995). The Polistinae subfamily is cosmopolitan, presenting eusocial behavior and most of their 26 genera are Neotropical (Brothers and Finnamore, 1993). The eusocial wasp *Myschocyttarus* sp. is indicated in this subfamily as a model for studies of social behavior evolution in wasps (Giannotti, 1999; Togni and Giannotti, 2008). Still, there are many doubts about the biology, reproductive behavior and phylogeny in this group.

Sperm ultrastructure has become an important character source for phylogenetic studies (Jamieson et al. 1997). Quicke et al. (1992) described the spermatozoa ultrastructure of various species in Hymenoptera and reported differences in the typical characteristics of the taxa, providing new phylogenetic indicators for the group. When it is allied with other morphological characters, such as follicle number per testis and sperm number per bundle, it increases the knowledge about the group and can be used in phylogeny, taxonomy and reproductive biology (Pereira et al., 2008).

In Vespidae, sperm ultrastructure has been described for *Vespa crabro* (Vespinae) and *Agelaia vicina* (Polistinae) (Mancini et al., 2006, 2009). The reproductive system was described in *Ancistrocerus antilope* (Eumeninae) (Bushrow et al., 2006) and in *Polistes* sp. (Polistinae) (Araújo et al., 2010; Dirks and Sternburg, 1972).

In the present study, the morphology of the male reproductive system and the spermatozoa of *Myschocyttarus cassununga* have been described to supply information for reproductive biology and phylogeny in Vespidae.

2. MATERIAL AND METHODS

Adult males of *Myschocyttarus cassununga* were collected in natural nests in forest fragments near the city of Viçosa (Minas Gerais, Brazil).

2.1. Light microscopy – For the histological investigation, testes and seminal vesicles of five mature adult males were dissected and fixed for 6 h in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid, 3% sucrose and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The materials were post-fixed in 1% osmium tetroxide, in the same buffer, for 2 h. Dehydration was carried out in ethanol and embedding in GMA (Leica). Thin sections were stained with toluidine blue.

For each male, a sperm suspension was extracted from one of the seminal vesicles, spread on glass microscope slides and fixed for 20 min in a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, the preparations were observed with a photomicroscope (Olympus, BX-60), equipped with phase contrast and 200 spermatozoa were photographed, to then be measured. To access nucleus measurements, some of these preparations were stained for 15 min with 0.2 mg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in PBS, washed, and mounted in 50% sucrose. They were examined with an epifluorescence microscope (Olympus, BX-60), equipped with a BP 360–370 nm excitation filter. All measurements were obtained with the software Image Pro-Plus, version 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, USA) and the lengths were averaged from the total number of spermatozoa analyzed.

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

sodium hydroxide and observed using a Jeol 1011 transmission electron microscope, operating at 80 KV.

3. RESULTS

The male reproductive system of *Myschocyttarus cassununga* consists of two testes, a pair of deferent ducts, a pair of accessory glands and one ejaculatory duct (Fig. 1A). The deferent duct possesses an extensive, specialized region, the seminal vesicle, where spermatozoa are stored until mating. Therefore, the deferent duct can be divided in pre and post-vesicular regions (Fig. 1B). Each testis is formed by three fusiform follicles (Fig. 1C) which release their spermatozoa into the deferent duct (Fig. 1D). The accessory gland is found near the seminal vesicle and discharges its secretion into the post-vesicular deferent duct (Fig. 1B). A connective tissue capsule involves the testes and seminal vesicles (Figs. 1B, C and F). In the distal portion of the abdomen, the deferent ducts join in a short ejaculatory duct (Fig. 1A).

In the testicular follicles, cysts of spermatozoa can organize both, parallel or transverse to the greater axis of the follicle. In each cyst, surrounded by the cystic cells, approximately 128 spermatozoa can be counted. Upon reaching the deferent duct the spermatozoa are still organized in bundles (Fig. 1D). However, spermatozoa observed in the seminal vesicles are encountered individually (Fig. 1F). The seminal vesicle of *M. cassununga* presents a simple, prismatic epithelium, in a cell layer that varies between 10 and 30 μm in height. The nucleus is found in the basal portion of the cells, with a brush border at the apex. The seminal vesicle is divided in two chambers (c1, c2) (Figs. 1B, F, G): c1 is the largest locus, nearer to the testes which receives spermatozoa transported by the pre-vesicular deferent duct; c2 is smaller and separated from c1 by a muscular constriction (Fig. 1G).

The accessory glands present a simple and prismatic epithelium, with a large quantity of clear secretory vesicles (Fig. 1E). The lumen of the gland is filled with a granular secretion and is continuous with the post-vesicular deferent duct (Fig. 1B).

Spermatozoa of *M. cassununga* are slender, measuring approximately 97 μm in length. They can be divided in head and flagellum. The head of the spermatozoa is composed of the nucleus with approximately 14 μm in length and the acrosome, above the nucleus (Fig. 1H). The acrosomal vesicle consists in a perforatorium with paracrystalline organization coated by an electron-dense material and extends a little beyond the perforatorium (Fig. 2A). This region is circular in a cross-section (Fig. 2B). In the region where the perforatorium is sectioned, the acrosome is elliptical in cross-sections. An electron lucid region is observed between the acrosomal vesicle and the perforatorium (Fig. 2C). At the nucleus apex, the perforatorium is inserted in a cavity with approximately 0.25 μm in depth (Fig. 2D), this region has an elliptical shape in cross-sections (Fig. 2E). The nucleus is uniformly filled with condensed chromatin and also present an elliptical shape in cross-sections (Fig. 2F). The basal portion of the nucleus presents a projection in direction of the axoneme (Fig. 2G, H).

The flagellum of the spermatozoa consist of an axoneme, a centriolar adjunct, two mitochondrial derivatives, one large and the other small, and two accessory bodies (Fig. 2H, M).

The head-flagellum transition region is marked by the presence of the centriolar adjunct. This is an electron-dense protein structure which initiates at the nuclear base, between the large mitochondrial derivative and the nucleus (Fig. 2H, I). Below, it becomes thicker, assuming a triangular shape in cross sections; in this region it is observed laterally to the large mitochondrial derivative and the axoneme (Figs. 2J–L). The centriolar adjunct extends until slightly above the shorter mitochondrial derivative.

Mitochondrial derivatives are structures which extend parallel along the flagellum. The larger mitochondrial derivative begins lateral to the nuclear base (Fig. 2H, I). In cross-sections, the larger mitochondrial derivative presents an oval shape. Along nearly its entire extension it is possible to distinguish two regions, one paracrystalline more distant from the axoneme and another region where the

mitochondrial cristae are encountered, near to the axoneme (Figs. 2L–N). The small mitochondrial derivative initiates below the centriole adjunct, and presents only the mitochondrial cristae region, near the axoneme (Fig. 2M). Mitochondrial cristae of the derivatives are organized parallel to each other (Fig. 2O). The small derivative terminates first in the final portions of the flagellum, in the region near its termination; it presents morphological alterations, with two lobes, separated by a constriction (Fig. 2N). When the larger mitochondrial derivative is observed alone at the end of the flagellum, it no longer presents a region with paracrystalline organization (Fig. 2P). Between each of the mitochondrial derivatives and the axoneme is an accessory body; these structures which has a triangular shape when observed in cross sections (Figs. 2L – N).

The axoneme of the spermatozoa of *M. cassununga* extends along the entire flagellum in a 9 + 9 + 2 pattern, with nine most external accessory microtubules, nine doublets and one central pair of microtubules (Fig. 2L). The region of the axoneme closest to the nucleus base, known as the centriole region, is marked by the absence of the central pair of microtubules (Fig. 2K). In the final portion of the flagellum, the axoneme is the last component to disorganize, being observed alone in cross-sections (Fig. 2Q). The microtubule doublets are the first elements of the axoneme that begin to disorganize (Fig. 2R), however the central pair of microtubules is the first to completely disappear (Fig. 2S). The accessory microtubules are the last elements of the axoneme to disorganize (Fig. 2T).

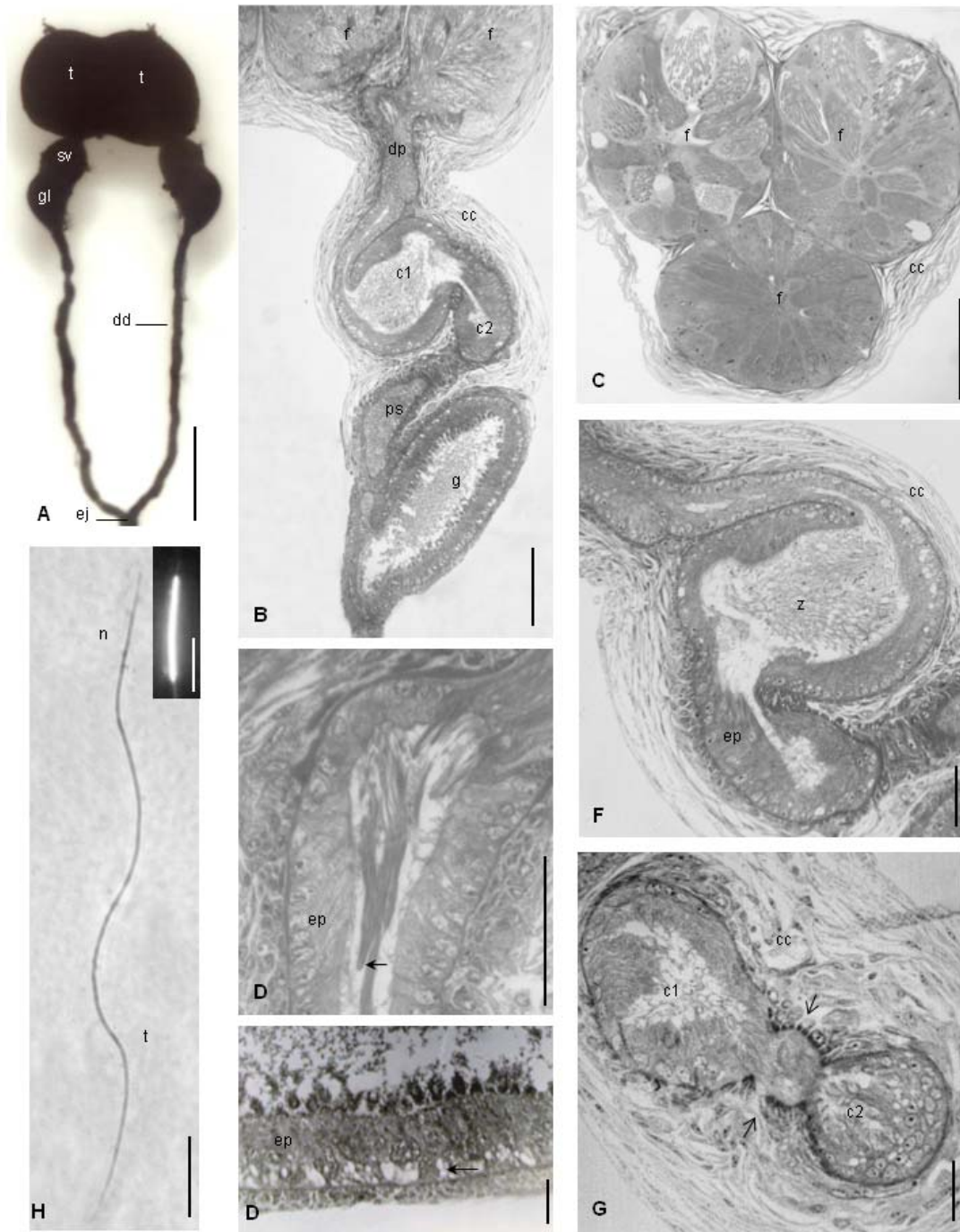


Figure 1. Light microscopy of male reproductive system of *Myschocyttarus cassununga*. **A.** Anatomy showing the testes (t), seminal vesicle (sv), accessory glands (g), deferent ducts (dd), and the ejaculatory duct (ej) (Bar 0,5 mm). **B.** Longitudinal section showing the presence of testicular follicles (f), seminal vesicle with two chambers (c1, c2), accessory glands and the conjunctive capsule (cc) involving the testes and the seminal vesicle. Note the two portions of the deferent duct: pre-vesicular region (pv) and the post-vesicular region (ps) (Bar 100 μ m). **C.** Cross section of the testes showing the presence of three follicles per testes and the testicular capsule (Bar 50 μ m). **D.** Pre-vesicular deferent duct with sperm bundles in the lumen (arrows). Note the prismatic epithelium (e) (Bar 25 μ m). **E.** Detail of the accessory gland epithelium with secretory vesicles (arrow) (Bar 25 μ m). **F.** Seminal vesicle showing the connective tissue capsule surrounding the epithelium (ep) of the two chambers containing sperm (z) inside c1 (Bar 25 μ m). **G.** Detail of the muscle constriction (open arrows) between c1 and c2 and connective tissue capsule (Bar 25 μ m). **H.** In phase contrast micrograph of sperm, (h) head, (t) tail. Inset: fluorescent microscopy showing the nucleus (n) (Bar 10 μ m).

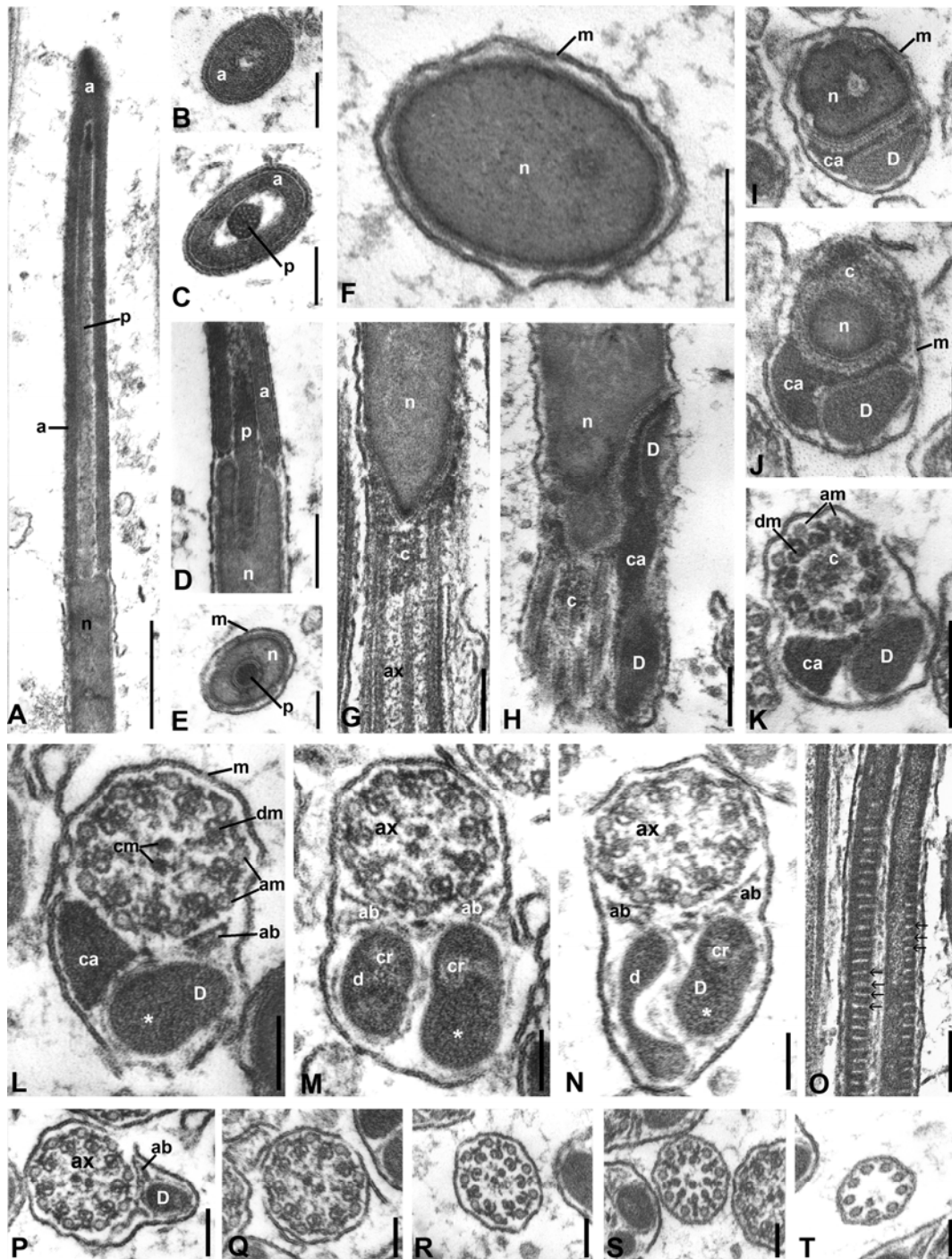


Figure 2. Transmission electron microscopy of *Myschocyttarus cassununga* sperm. **A.** Longitudinal section of head showing the acrosomal vesicle (a), the perforatorium (p) and nucleus (n) (Bar 0,5 μ m). **B and C.** Acrosome in transverse sections of different heights, (B) edge of the acrosome and (C) middle region of the acrosome (Bar 0,1 μ m). **D and E.** Longitudinal (D) and transverse (E) sections showing the perforatorium inserted in the nucleus apex. (m) Plasmatic membrane (Bars D= 0,2 μ m and E= 0,5 μ m) **F.** Cross section of the nucleus (Bar 0,2 μ m). **G and H.** Longitudinal sections of the head-flagellum transition. (c) centriole, (ax) axoneme, (ca) centriolar adjunct, (D) larger mitochondrial derivative (Bars 0,2 μ m). **I-K.** Cross section of the head-flagellum transition. (am) accessory microtubules, (dm) microtubule doublets (Bars 0,2 μ m). **L-N.** Cross sections of the flagellum. (cm) central pair of microtubules, (ab) accessory body, (d) smaller mitochondrial derivative, (D) larger mitochondrial derivative, (*) paracrystalline region of the mitochondrial derivative, (cr) region with mitochondrial cristae (Bars 0,5 μ m). **O.** Longitudinal section of flagellum showing the mitochondrial cristae (arrows) (Bars 0,2 μ m). **P-T.** Cross section of the final flagellar portion showing the gradual disorganization of the axonema (Bar 0,5 μ m).

DISCUSSION

In *Myschocyttarus cassununga* the male reproductive system is similar to that observed in *Ancistrocerus antilope* (Eumeninae), with a capsule which envelops the testes and seminal vesicles (Bushrow et al., 2006). However in *Polistes* sp. (Polistinae), which belongs to the same subfamily as *M. cassununga*, a capsule enveloping the testes, seminal vesicle and accessory gland was observed (Araújo et al., 2010; Dirks and Sternburg, 1972). Characteristics derived from the anatomy of the male reproductive system may not be maintained constant within inferior taxa or groups closely related as observed in bees (Ferreira et al., 2004).

Testes presenting three follicles as in *M. cassununga* also occur in other Polistinae such as *P. versicolor*, *P. metricus*, *P. exclamans* and *P. annularis*, *P. gallicus*; and in the Eumaninae *Ancistrocerus antilope* (Araújo et al., 2010; Bushrow et al., 2006; Dirks and Sternburg, 1972). Bee species from the most basal subfamilies including Colletinae, Halictinae, Andreninae and some Megachilinae also presented three follicles per testis (Ferreira et al., 2004), suggesting a proximity between these groups. However the majority of Apinae, Mellitinae and Megachilinae present four follicles per testis (Araújo et al., 2005; Ferreira et al., 2004; Roig-Alsina and Michener, 1993) with the exception of *Apis mellifera* with roughly 250 follicles (Chapman, 1998) and *Hypanthidium faveolatum* with 28 follicles (Gracielle et al., 2009). Despite ants being closer related to wasps (Superfamily Vespoidea) the number of follicles in ants varies from 1 to 25 (Wheeler and Krutzsch 1992).

The release of spermatozoa in bundles from the testes to the seminal vesicles observed in *M. cassununga* is a common feature for Aculeata in general (Moreira et al., 2004), with exception of the bee *Friesella schyrotkyi* (Brito et al., 2010). The spermatogonia in *M. cassununga* undergo the same number of mitotic cycles as Meliponini bees and the sphecoid wasp *Sceliphron* sp., which also have approximately 128 spermatozoa per cyst (Cruz-Landim, 2001; Moreira et al., 2003). In contrast, it is different from another Polistinae *Polistes versicolor* which has approximately 64 per

cyst (Araújo et al., 2010) and the sphecoid wasp, *Trypoxylon* sp., which has roughly 32 spermatozoa per cyst (Moreira et al., 2008). Virkki (1973) presented the hypothesis that derived species tend to have fewer spermatozoa per cyst than basal species. However, because *Polistes versicolor* and *Mischocyttarus cassununga* present different numbers of spermatozoa per cyst, this indicates that there may be variations of this characteristic even within closely related species.

The seminal vesicle divided into two chambers, as described here, has never been observed in other Vespidae. However, this aspect is also present in Aculeata Sphecidae (Moreira et al., 2008) and some Chalcidoidea (Damiens and Boivin, 2005; Fiorillo et al., 2008; Gerling and Legner, 1968). Baer and Boomsma (2004) named these chambers as: sperm reservoir (the upper part) and ejaculatory section (the lower part). In Chalcidoidea *Pegoscapus* sp. (Fiorillo et al., 2008) and *Trypoxylon* sp. (Sphecidae) (Moreira et al., 2008), the seminal vesicle is not divided in separate chambers, but it shows two distinctive portions sharing similarities with the previously described chambers. The anterior portion stores the mature spermatozoa and participates in the reabsorption and digestion of defective cells (spermiphagy) and spermfluid, as reported for other species (Araújo et al., 2005; Dallacqua and Cruz-Landim, 2003; Viscuso et al., 1999). On the other hand, the posterior seminal vesicle portion acts on the ejaculation (Baer and Boomsma, 2004; Gerling and Legner, 1968). The presence of this second portion, probably guarantees that only a little amount of the stored spermatozoa is ejaculated per sexual copulation. This restraint would be essential to provide each male with the potential to mate with many females in rapid succession (King, 1987).

The total length of spermatozoa in Vespidae is known for some species of Vespinae, Polistinae and Eumeninae (Mancini et al., 2006; Quicke et al., 1992). The shortest and the longest sperm reported belong to the genus *Mischocyttarus*, where *M. cassununga* measures 97 μm and *Myschocyttarus* sp., 245 μm (Quicke et al., 1992).

The acrosome, formed by an acrosomal vesicle and a perforatorium, is a common characteristic of Hymenoptera. In *Myschocyttarus cassununga*, *A. vicina* (Mancini et al., 2006) e *Vespa crabro* (Mancini et al., 2009) the acrosomal vesicle shows an oval shape in cross section and a similar appearance was observed in the bee sperm (Báo et al., 2004; Cruz-Hofling et al., 1970; Fiorillo et al., 2005; Peng et al., 1992, 1993; Zama et al., 2005a), while an acrosomal vesicle with a circular profile in the anterior region and triangular in the mid region has been observed in the sperm of the stingless bees (Araújo et al., 2005; Zama et al., 2001, 2004) and ants (Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007; Wheeler et al., 1990). The cylindrical shape of the perforatorium are observed in *M. cassununga*, *A. vicina* (Mancini et al., 2006) and in most of Hymenoptera, while the conical shape of the perforatorium of *V. crabro* sperm is shared with the Euglossinae *Eufriesea violacea* (Zama et al., 2005a), as well as the Halictinae *Pseudaugochlora graminea* bees (Fiorillo et al., 2005).

In the nucleus-flagellum transition region the short centriolar adjunct and the larged mitochondrial derivative beginning the base of the nucleus is the characteristic more evident shared for *M. cassununga* and the two Vespidae (Mancini et al., 2006, 2009). In Apidae, who begins beside the nucleus is also the larger mitochondrial derivative, however the centriolar adjunct is longer (Báo et al., 2004; Fiorillo et al., 2005; Lino-Neto et al., 2000b; Peng et al., 1992, 1993; Zama et al., 2001, 2004). In Formicidae (Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007; Wheeler et al., 1990;), Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 2000a; Lino-Neto and Dolder, 2001) and the 'symphyta' *Tremex* sp. (Newman and Quicke, 1999a) the centriolar adjunct begins besides the nucleus and finishes on them mitochondrial derivatives. In *M. cassununga*, *V. crabro* and *A. vicina*, as occurs in many Hymenoptera spermatozoa (Báo et al., 2004; Fiorillo et al., 2005; Lino-Neto et al., 2008; Newman and Quicke, 1998, 1999a, 2000; Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b;), the centriolar adjunct is located between the nuclear base and one of the mitochondrial derivatives.

The occurrence in *M. cassununga* sperm of two mitochondrial derivatives with different shapes, a paracrystalline core only in the larger mitochondrial derivatives and the paracrystalline core occurring distally in relation to the axoneme, can also be found in *A. vicina* (Mancini et al., 2006) e *Vespa crabro* (Mancini et al., 2009), Apidae (Lino-Neto et al., 2000b; Zama et al., 2001, 2004, 2005a; Bao et al., 2004; Fiorillo et al., 2005) and in parasitic wasps Eucilidae e Megalyroidea (Newman and Quicke, 1999b, 2000). In Formicidae, however, the mitochondrial derivatives are equal in shape, the paracrystalline core is located in both mitochondrial derivatives and the paracrystalline is proximal in relation to the axoneme (Caetano, 1980; Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007; Wheeler et al., 1990).

In the ending of the axonemal microtubules, *M. cassununga*, resembles what has been observed in Apidae (Bao et al., 2004; Fiorillo et al., 2005; Peng et al., 1993; Zama et al., 2001, 2004, 2005a); in both the groups the accessory microtubules are the last to end. In contrast, in parasitic wasps Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000a; Lino-Neto and Dolder, 2001) and Ichneumonoidea (Moreira et al., 2010), the accessory microtubules end first.

In conclusion, the spermatozoa of *M. cassununga* have many ultrastructural characteristics in common with that described for *Vespa crabro* (Polistinae) and *Agelaia vicina* (Eumaninae), showing the following features well conserved in Vespidae: 1) the acrosome includes the acrosomal vesicle and perforatorium; 2) nucleus with compact and homogeneous chromatin; 3) centriolar adjunct located between the base of the nucleus and one of the mitochondrial derivatives; 4) posterior region of the nucleus enveloped by the centriolar adjunct; 5) elongation of the nucleus surrounded by the centriole; 6) axoneme presents a 9+9+2 microtubule pattern; 7) mitochondrial derivatives begin at different heights and have different diameters; 8) central microtubules and nine doublets terminate first, followed by accessory microtubules. The subdivision of the seminal vesicle has never been observed in any

other Vespidae. Despite the similarity of sperm morphology among Vespidae, the bilobated mitochondrial derivative is an autapomorphic character in *M. cassununga*.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This research had the financial support of the Brazilian agencies CNPq, CAPES, FAPESP, FAPEMIG.

6. REFERENCES

- Araújo, V. A., Zama, U., Neves, C.A., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2005. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). B.J.Morphol. Sci. 22, 129– 137.
- Araújo, V.A., Moreira, J., Lino-Neto, J., 2010. Morphology of the male reproductive system of the wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic considerations. J. Insect Sci. 10, 71.
- Baer, B., Boomsma, J.J., 2004. Mating system evolution and male reproductive investment in fungus-growing ants. Behav. Ecol. 15, 426–432.
- Báo, S.N., Simões, D.G., Lino-Neto, J., 2004. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia) sp.* Michener and Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 36, 23–28.
- Brito, P., Zama, U., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2010. New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae): histological and physiological development during sexual maturation. Apidologie 41, 203–215.
- Brothers, D.J., Finnamore, A.T., 1993. Family Vespidae, pp. 212-216, en: Goulet, H. y J. Huber (eds.). *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Agriculture Canada Publication 1894/E, Ottawa.
- Bushrow, E.S., Fuller, C.L., Cowan D.P., Byrd C.A., 2006. Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). Invert. Biol. 125(4), 354-362.
- Caetano, F.H., 1980. Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). Naturalia 5, 105–111.
- Carpenter J., 1991. Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In: Ross KG, Matthews RW, editors. *The social Biology of Wasps*, pp. 7- 32. Cornell University Press.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge
- Crespi, B.J., Yanega, D., 1995. The definition of eusociality. Behav. Ecol. 6, 109–115.

- Cruz-Hofling, M.A., Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1970. The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42, 69–78.
- Cruz-Landim C., 2001. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera: Apidae) testes: number of spermatozoa per cyst, *Iheringia* 91, 183–189.
- Dallacqua, R.P., Cruz-Landim, C., 2003. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anatomia Histologia Embryologia. J. Vet. Med. Series C* 32, 276-281.
- Damiens, D., Boivin, G., 2005. Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. *Physiol. Entomol.* 30, 241-247.
- Dirks, T.F., Sternburg, J.G., 1972. Male reproductive system of three species of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). *Internat. J. Insect. Morphol. Embryol.* 1(4), 315-320.
- Ferreira, A., Abdalla, F.C., Kerr, W.E., Cruz-Landim, C., 2004. Systematics, morphology and physiology. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* 33, 569-576.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.A.M., Lino-Neto, J., Báo, S.N., 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37, 75–81
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto J., Báo S.N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39, 1271-1280.
- Gaston, K.J. 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conserv. Biol.* 5, 283-296.
- Gerling, D., Legner, E.F., 1968. Developmental history and reproduction of *Spalangia cameroni*, parasite of synanthropic flies. *Annal. Entomol. Soc. Am.* 61, 1436–1443.
- Giannotti, E., 1999. Social organization of the eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* 33, 325–338
- Gracielle, I.M.S., Fiorillo B.S., Lino-Neto J., Báo S.N., 2009. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* 40: 419–425
- Grimaldi, D., Engel, M.S., 2005. *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- King, B.H., 1987. Offspring sex ratios in parasitoid wasps. *Quart. Rev. Biol.* 62, 367–395.
- Lino-Neto, J., Báo, S.N., Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Internat. J. Insect Morphol. Embryol.* 28, 253–259.
- Lino-Neto, J., Báo, S.N., 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., Báo, S.N., Dolder, H., 2000b. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus– flagellum transition region. *Tissue and Cell* 32, 322–327.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001. 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 Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue and Cell* 34, 124–128.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., Mancini, K., Mercati, D., Dallai, R., 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue and Cell* 40, 185–193.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Insect. Soc.* 53, 333–338.
- Mancini, K., Lino-Neto J., Dolder H., Dallai R., 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthrop. Struct. Develop.* 38, 54–59.
- Moreira, J., Brito, P., Lino-Neto J., 2003. Morphology and number of spermatozoa per cyst in *Sceliphron* sp. and *Trypoxylon albitarse* (Hymenoptera: sphecidae). *Annals of the XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis*. Caxambu, MG.
- Moreira, J., Zama U., Lino-Neto, J., 2004. Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Brazil. J. Morphol. Sci.* 21(4), 185–189
- Moreira, P.A., Araújo, V.A., Zama, U., Lino-Neto, J., 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (Trypargilum) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37 (4), 429–435
- Moreira, J., Araújo V.A., Bão S.N., Lino-Neto J., 2010. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron* 41, 187–192.
- Moya, J., Mancini, K., Lino-Neto, J., Delabie, J., Dolder, H., 2007. Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoologica* 88, 181–187.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 1998. Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *J. Hymenop. Res.* 7, 25–37.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 1999a. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.* 8, 35–47.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.* 8, 197–203.
- Newman, T.M., Quicke, D.L.J., 2000. Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *J. Hym. Res.* 9: 62–70.
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M., Yin, L.R.S., 1992. Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.* 17, 269–276.
- Peng, C.Y.S., Yin, C.M., Yin, L.R.S., 1993. Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.* 18, 93–101.
- Pereira, R.A.S., Lino-Neto, J., Prado A.P., 2008. Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species *Symbiosis* 45, 143–147
- Quicke, D.L.J., Ingram, S.N., Baillie, H.S., Gaitens, P.V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scri.* 21, 381–402.
- Roig-Alsina, A., Michener, C.D., 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kan. Sci. Bul.* 55, 124–162.

- Sharkey, M.J., 2007. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. *Zootaxa* 1668, 521-548.
- Togni, O.C., Giannotti, E., 2008. Nest defense behavior against ant attacks in post-emergent colonies of wasp *Mischocyttarus cerberus* (Hymenoptera, Vespidae). *Acta Ethologica* 11, 43-54.
- Virkky, N., 1973. Evolution of sperm cell number per bundle in insects. *Annales de Escuela Nacional de Ciencias Biologicas de Mexico* 20, 23-54
- Viscuso, R., Narcisi, L., Sottile, L., 1999. Structure and function of seminal vesicles of Orthoptera tettigonioides. *Int. J. Insec. Morphol. Embryol.* 28, 169-178.
- Wheeler, D.E., Crichton, E.G., Krutzsch, P.H., 1990. Comparative Ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.* 206, 343-350.
- Wheeler, D.E., Krutzsch, P.H., 1992. Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *J. Morphol.* 211, 307-317.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10, 261-270.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2004. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue and Cell* 36, 29-41.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Mello, S.M., Campos, L.A.O., Dolder, H., 2005a. Ultrastructural characterization of spermatozoa in euglossine bees (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Insectes Sociaux* 52, 122-131.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L.A.O., Dolder, H., B ao, S.N., 2005b. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Sub. Cytol. Pathol.* 37, 313-321.



Evidências do monofiletismo em abelhas sem ferrão considerando caracteres derivados da morfologia do sistema reprodutor masculino.

Resumo

Em Apini, as relações filogenéticas entre as quatro subtribos de abelhas corbiculadas (Bombina, Meliponina, Apina e Euglossina) ainda permanece controversa, apesar de vários trabalhos já feitos com o grupo. Dados derivados da morfologia externa de larvas e dados anatômicos, histológicos e citológicos derivados de estruturas internas, se mostraram plausíveis de serem usados em inferências filogenéticas das abelhas corbiculadas e dos insetos em geral. Diante disto, este trabalho compara características da morfologia do aparelho reprodutor e espermatogênese entre espécies representantes das quatro subtribos de abelhas corbiculadas. Indivíduos de *Xylocopa frontalis* (Xylocopini) e *Centris* sp. (Centridini) também foram utilizadas. Como grupo externo. Machos recém emergidos tiveram seus testículos preparados utilizando metodologia de rotina para microscopia de luz e de eletrônica de transmissão. Informações obtidas neste trabalho juntamente com os da literatura indicam duas sinapomorfias das espécies de Meliponina derivadas da morfologia do aparelho reprodutor: sete ciclos mitóticos durante a espermatogênese e ducto deferente com função secretora.

1- Introdução

A classificação tradicional para abelhas foi proposta por Michener (1944) a partir de estudos com morfologia externa comparada na qual as abelhas estão divididas em seis famílias: Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae e Melittidae. Recentemente, Melo e Gonçalves (2005) propuseram uma modificação nesta classificação, agrupando todas as abelhas em uma única família Apidae, constituída de 7 subfamílias que correspondem as famílias da classificação tradicional, 51 tribos e 27 subtribos.

Em Apidae, Apinae é a maior subfamília composta por 18 tribos. Em Apini, as relações filogenéticas entre as quatro subtribos de abelhas corbiculadas (Bombina, Meliponina, Apina e Euglossina) ainda permanece controversa, apesar do vários trabalhos já feitos com o grupo (Cameron 1991, 1993; Cameron e Mardulyn, 2001; Chavarría e Carpenter, 1994; Koulianos et al., 1999; Mardulyn e Cameron, 1999; Michener, 1944,1990; Noll, 2002; Winston e Michener, 1977; Plant e Paulus, 1987; Prentice,1991; Roig- Alsina e Michener, 1993; Sheppard e MacPheron,1991; Serrão 2001; Silveira et al., 2002).

A morfologia externa de adultos é bem conhecida em todos os grupos de abelhas e, conseqüentemente, a filogenia baseada em caracteres morfológicos externos é a comumente usada para Apidae. Dados derivados da morfologia externa de larvas e dados anatômicos, histológicos e citológicos derivados de estruturas internas, como por exemplo, o proventrículo pode fornecer novos caracteres, os quais já se mostraram plausíveis de serem usados em inferências filogenéticas das abelhas corbiculadas e dos insetos em geral. (Serrão 2001; Straka, 2007).

Estudos da anatomia do sistema reprodutor e da espermatogênese indicam que nos Hymenoptera, e nos insetos em geral, as divisões e o desenvolvimento das células germinativas masculinas ocorrem em grupos denominados de cistos localizados dentro dos folículos testiculares (Báo e Dolder, 1991). Os cistos são formados por clones de células germinativas revestidos por uma camada de células epiteliais não germinativas

(Baccetti e Bairati, 1964). Nos Hymenoptera, a haploidia é a condição típica dos machos e em decorrência deste fato, existe uma grande alteração no processo de espermatogênese para que a ploidia não seja reduzida à metade na meiose, como ocorre tipicamente nos organismos diplóides (Cruz-Landim e Beig, 1980a). Ao final da espermatogênese cada cisto é composto por um número de espermatozóides típico para cada espécie.

Considerando a potencialidade de somar dados morfológicos internos a análises filogenéticas comumente utilizadas, neste trabalho descrevemos caracteres derivados do sistema reprodutor masculino e da espermatogênese em representantes das abelhas corbiculadas.

2-Material e Métodos

Machos adultos representantes das quatro subtribos de Apini foram coletados no Apiário da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados oito indivíduos de *Melipona rufiventris*, *Friesomelita varia*, *Nanotrigona punctata*, *Friesella schrottkyi* (Melipinina), *Apis mellifera* (Apina), *Bombus atratus* (Bombina), *Euglossa mandibulares* (Euglossina). Indivíduos de *Xylocopa frontalis* (Xilocopini) e *Centris tarsata* (Centridini) também foram utilizados.

Microscopia de luz: Os sistemas reprodutores foram dissecados e fotografados para análise de características anatômicas como a presença ou ausência de glândulas acessórias e o número de folículos testiculares. Para obter o número de espermatozoides por cistos, os testículos foram dissecados e fixados em gluteraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, foram desidratados em série alcoólica crescente e embebidos em historesina[®]. Cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e fotografados em um microscópio Olympus CX 31. Foram usados vinte cistos de cada espécie, em fase final da espermiogênese, para obter a média do número de espermatozoides por cisto. Algumas destas secções foram coradas por 15 minutos com 0.2 µg/ml 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI) em tampão fosfato, e examinadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60), equipados com filtro de excitação BP360-370 nm.

Microscopia Eletrônica de transmissão: Alguns testículos foram dissecados e fixados por 3-4 horas em solução de gluteraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7.2, acrescido de sacarose 1,5%, ácido pícrico 0,2% e cloreto de cálcio 5 mM. Após lavar por 1-2 h, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão cacodilato. Em seguida foram desidratados em acetona e embebidos em Epon 812. Os cortes ultrafinos, após contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, Leo 906), operando em 60 e 80 kV.

3-Resultados

A anatomia do sistema reprodutor em machos sexualmente maduros das abelhas estudadas compreende um par de testículos, vesículas seminais, ductos deferentes, glândulas acessórias e um ducto ejaculatório (Fig. 1 A). Tal padrão não se aplica aos Meliponina (*Scaptotrigona xantotricha*; *Melipona rufiventris*, *Nanotrigona punctata*, *Friesomelita varia* e *Friesella schrottkyi*) por não possuírem glândulas acessórias ao longo do trato reprodutor (Fig. 1 B). Em *Apis mellifera* (Apina) (Fig. 1 C, D), *Bombus atratus* (Bombina) (Fig. E) e *Euglossa mandibulares* (Euglossina) (Fig. 1F) foram observados até 64 espermatozóides por cisto e 4 folículos por testículo. Já as espécies de *Friesomelita varia* (Fig. 2 A), *Melipona rufiventris* (Fig. 2 B), *Nanotrigona punctata* (Fig. 2 C), *Friesella schrottkyi* (Fig. 2 D) apresentaram até 128 espermatozóides por feixe e também possuem 4 folículos por testículo. *Centris tarsata* (Fig. 2 E) e *Xylocopa frontalis* foram utilizadas como grupo externo (Fig. 2 F).

Tabela 1- Espécies de abelhas utilizadas no estudo e características estudadas.

Subtribo/Espécie	Nº sptz /cisto	Nº folículos	Glândula acessória
Apina			
<i>Apis mellifera</i>	64	250	P
Bombina			
<i>Bombus atratus</i>	64	4	P
Euglossina			
<i>Euglossa mandibulares</i>	64	4	P
Meliponina			
<i>Melipona rufiventris</i>	128	4	A
<i>Nanotrigona punctata</i>	128	4	A
<i>Friesomelita varia</i>	128	4	A
<i>Friesella schrottkyi</i>	128	4	A
Grupo externo			
Centridini			
<i>Centris tarsata</i>	64	4	P
Xylocopini			
<i>Xylocopa frontalis</i>	64	4	P

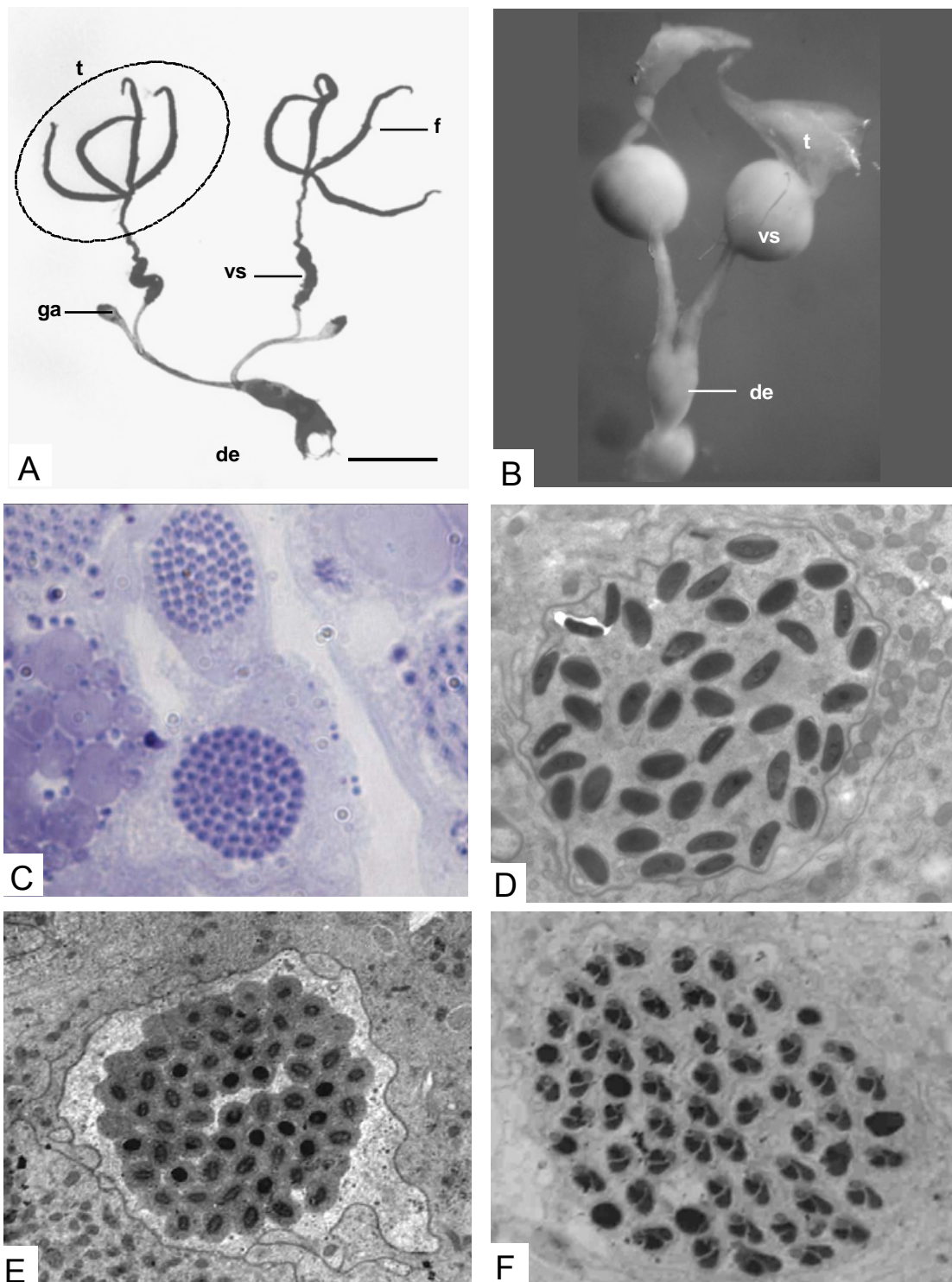


Figura 1- Micrografia de luz (A-C) e eletrônica de transmissão (D-F) do aparelho reprodutor de (A) *Euglossa mandibulares* e (B) *Scaptotrigona xantoticha*; e de feixes de espermatozoides de (C,D) *Apis mellifera*; (E) *Bombus atratus*; (F) *Euglossa mandibulares*. (t) testículo; (f) folículo; (ga) Glândula acessória; (de) ducto deferente; (vs) vesícula seminal.

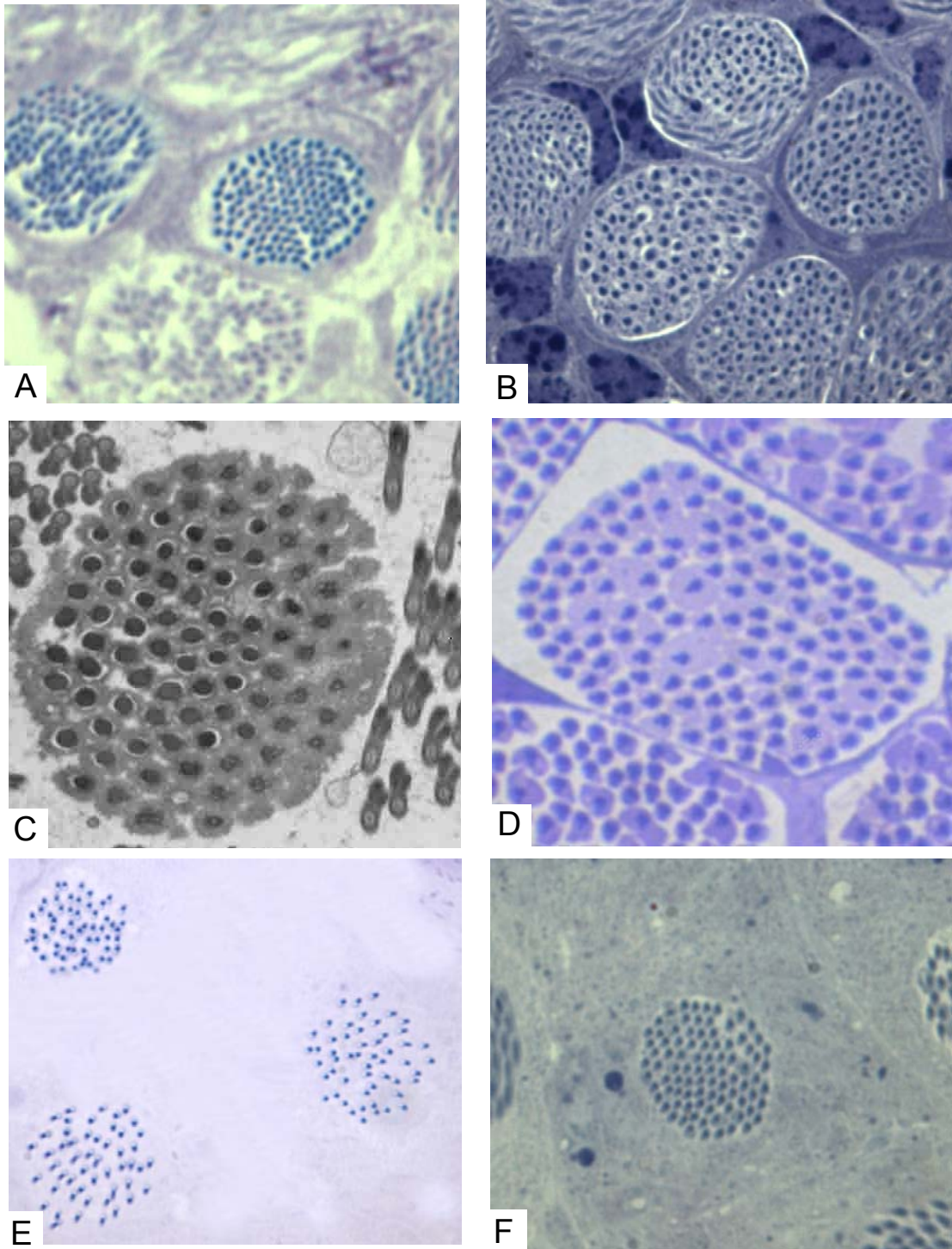


Figura 2- Micrografia de luz (A,B,D-F) e eletrônica (C) de feixes de espermatozoides de (A) *Friesomelita varia*; (B) *Melipona rufiventris*; (C) *Nanotrigona punctata*; (D) *Friesella schrottkyi*; (E) *Centris tarsata* e (F) *Xylocopa frontalis*.

4-Discussão

Poucos trabalhos enfatizam caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino de abelhas (Araújo et al. 2005; Ferreira et al. 2004; Lima et al. 2006; Lino-Neto et al. 2001), sendo que dentre eles se destaca o de Ferreira et al. (2004) pelo seu aspecto abrangente e comparativo. Nesse trabalho os autores descreveram quatro tipos diferentes de sistema reprodutor de machos. A maioria dos representantes de Bombina e Euglossina apresentou o conjunto de caracteres agrupados como o tipo III, nos quais os testículos, os ductos deferentes pré-vesicular e as vesículas seminais estão encapsulados separadamente formando duas unidades, cada uma contendo um testículo e uma vesícula. Neste tipo, as glândulas acessórias são bem desenvolvidas e o duto ejaculatório é calibroso, apresentando fissuras em sua parede externa. *Apis mellifera* foi considerado como um subgrupo do grupo III devido ao número aumentado de túbulos seminíferos. Já os Meliponini apresentaram o do tipo IV que é caracterizado principalmente pela ausência de glândulas acessórias. Segundo estes mesmos autores, ao longo do tempo houve aumento no número e no comprimento dos túbulos seminífero que resultaram num aumento na produção de espermatozóides. Nossos resultados mostram que um aumento no número de folículos em *Apina* não resultou no aumento do número de espermatozóides por feixe. Meliponina obteve um aumento do número de espermatozóides por feixe sem aumentar o número de folículos testiculares.

A espermatogênese nestes machos se assemelha a uma mitose, pois cada espermatogônia origina duas espermatídes (Cruz-Landim e Beig, 1980a, b; Lindsley e Tokuyasu, 1980; Oguma e Kurokawa, 1984; Cruz-Landim, 2001). Durante a espermiogênese somente uma espermatíde se diferencia em espermatozóides (Lino-Neto et al., 2008). Desta forma, o número de espermatídes por cisto é característico para cada espécie e pode ser expresso como 2^n onde “n” é usualmente igual a 5, 6, 7 ou 8. O número de espermatozóide por cisto é constante para cada espécie Assim, Meliponina apresenta sete divisões mitóticas, já Bombina, Euglossina e *Apina*

apresentam seis divisões na espermatogênese. A presença de um ciclo mitótico a mais em Meliponina, em relação a outros grupos de corbiculados, pode ser considerada uma sinapomorfia para espécies de Meliponina.

O número de espermatozóides por cisto nos folículos testiculares foi descrito para algumas espécies de Hymenoptera (Araújo et al., 2005; Conte et al., 2005; Cruz-Landin et al., 2008; Fiorillo et al., 2008; Lino-Neto et al., 2008; Moreira et al., 2008, 2011; Zama et al., 2007; Zama et al., 2005 b) e reflete o número de mitose e da viabilidade das espermátides na espermiogênese (Lino-Neto et al., 2008). O número de espermatozóide por cisto separa os corbiculados em dois grupos. Um grupo com 64 espermatozóides por cisto abrangendo Euglossini, Bombini e Apini que seria mais basal, uma vez que mantém as características plesiomórficas, e um grupo com 128 células por cisto contendo Meliponina que seria mais derivado sugerindo que o maior número de células é uma característica derivada. Nossos dados também apontam que são mais basais Euglossini e Bombini, já que somente Apini e Meliponini possuem diferenças e ainda Meliponini poderia ser apontada como mais derivada no ramo dos Eussociais.

As estratégias reprodutivas são diferentes se compararmos Apina e Meliponina. Apina apresenta mais folículos e produz mais cistos sem alterar o número de mitoses. Já Meliponina aumentou uma mitose na espermatogênese resultando em mais espermatozóides por feixe, mas manteve o número de folículos. Ainda, em Meliponina células epiteliais da vesícula seminal não mostraram características associadas a uma função secretora, que sugeriu que o material em que os espermatozóides foram imersos no lúmen da vesícula seminal foi produzido em outros lugares ao longo dos dutos e/ou durante a maturação sexual dos machos (Araújo et al. 2005). Desta forma, ducto com função de glândula seria uma sinapomorfia para espécies de Meliponina.

A partir de caracteres morfológicos, várias hipóteses foram sugeridas para a forma como estas quatro tribos estão relacionadas (Cameron e Mardulyn, 2001; Cardinal e Packer, 2007). Entretanto, a árvore filogenética derivada de caracteres morfológicos mais aceitos indica os altamente sociais Meliponini + Apini como grupos irmãos, com o primitivamente eusocial Bombini grupo irmão a esses dois e, o grupo de abelhas solitárias Euglossini, grupo irmão dos outros três. Dados oriundos de análises do pro-ventrículo, além de corroborar com a monofilia dos Meliponina, separam as subtribos de Apini em dois grupos, apontando uma origem única para a eussociabilidade em abelhas corbiculadas em concordância com o que foi proposto por Roig-Alsina e Michener (1993), Noll (2002) e (Serrão 2001). Nossos resultados mostram características exclusivas de Meliponina indicando que este grupo seja monofilético que são sete ciclos mitóticos na espermatogênese. Provavelmente seis ciclos mitóticos seja um caracter plesiomórfico.

Nenhuma das hipóteses baseada na morfologia foi corroborada por dados moleculares. Apesar disso, ambos os dados morfológicos e moleculares dão suporte a um padrão comum que é o monofiletismo de cada uma das quatro tribos (Whitfield e Kjer 2008). Whitfield e Kjer (2008) apontam que filogenias propostas para explicar a origem e parentesco dos grandes grupos de insetos são controversas, devido em parte ao que ele denomina de causas históricas, que resultam do fato de que algumas linhagens de insetos divergiram em rápida sucessão, dentro de um relativamente curto intervalo de tempo, gerando padrões das alterações moleculares e morfológicos que são difíceis de discernir filogeneticamente.

Como análises filogenéticas devem ser feitas utilizando o maior número possível de dados, as características derivadas da morfologia do sistema reprodutor podem auxiliar no entendimento sobre as relações em Apini.

5-Bibliografia

- Araújo, VA; Zama U; Neves CA; Dolder, H; Lino-Neto, J. 2005. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci 22: 129– 137.
- Araújo, VA; Moreira J; Lino-Neto, J. 2010. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. J. Insct. Sci. 10:86 available online: insectscience.org/10.86
- Baccetti, BM. 1987. Spermatozoa and phylogeny in orthopteroid insects. In: Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects (Baccetti BM, ed.). pp.12-112. John Wiley and Sons: New York.
- Báo, SN; Dolder, H. 1991. Abnormal characteristics observed during spermiogenesis of the RA mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): spermatid cells. Revista Brasileira de genética, Brasil. 287-297.
- Cameron, S. 1991. A new tribal phylogeny of the Apidae inferred from mitochondrial DNA sequences. In: Smith, D.R. (Ed.). Diversity in the Genus Apis, Western Press, Boulder, CO, pp. 71±87.
- Cameron, SA. 1993. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8687–8691.
- Cameron, SA; Mardulyn, P. 2001. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly social behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). Syst. Biol. 50:194–214
- Cardinal, S; Packer, L. 2007. Phylogenetic analysis of the corbiculate Apinae based on morphology of the sting apparatus (Hymenoptera: Apidae). Cladistics 23:99–118
- Chavarria, G; Carpenter, JM. 1994. "Total evidence" and the evolution of highly social bees. Cladistics, v.10, p.229-258.
- Cruz-Landim, C; Beig, D. 1980a. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Intern. J. Invert. Reprod., v.2, p.271-283.
- Cruz-Landim, C; Beig, D. 1980b. Meiose nos Hymenoptera. Cien. Cult., v. 33, p. 937-966..
- Cruz-Landim, C. 2001. Organization of the cysts in bees (Hymenoptera, Apidae) testis: Number of spermatozoa per cyst. Iheringia, Sér. Zool. 91: 183-189.
- Conte, M; Lino-Neto, J; Dolder, H. 2005. Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): fate of the atypical spermatids. Caryologia 58 (2), 183e188.
- Ferreira, A; Abdalla, FC; Kerr, WE; Cruz-Landim, C. 2004. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. Neotrop Entomol 33: 569-576.
- Koulianos, S; Schmid-Hempel, R; Roubik, DW; Schmid-Hempel, P. 1999. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. J. Evol. Biol. 12, 380–384.
- Lima, MAP; Lino-Neto, J; Campos, LAO. 2006. Sexual maturation in *Melipona mondury* males (Apidae: Meliponini). Braz J Morphol Sci 23: 369-375.
- Lindsley, DL; Tokuyasu K T. 1980. Spermatogenesis. In: Ashburner, M. & T.R. Wright (Eds.), The genetics and biology of *Drosophila*. New York. 225-295 pp.

- Lino-Neto, J; Dolder, H. 2001. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.*, 82:159-164.
- Lino-Neto, J; Araújo, VA; Heidi, D. 2008. Inviability of the Spermatids with Little Cytoplasm in Bees (Hymenoptera, Apidae) *Sociobiology* Vol. 51, No. 1,
- Mardulyn, P; Cameron, SA. 1999. The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): a promising nuclear gene for higher level phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12, 168–176.
- Melo, GAR; Gonçalves, RB. 2005. Higher-level bee classification (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (1): 153–159.
- Michener, CD. 1944. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 82, 151±326.
- Michener, CD. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univ. Kans. Sci. Bull.* 54, 75–164.
- Moreira, PA; Araújo, VA; Zama, U; Lino-Neto, J. 2008. Morphology of male reproductive system in three species of Trypoxylon (Trypargilum) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotrop. Entomol.* 37 (4), 429–435.
- Moreira, J; Brito P; Mancini K; Lino-Neto J. 2011. The descriptions of new microanatomical structures of the male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). *Micron*. In press.
- Noll, FB. 2002. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera: Apinae), with special reference to social behavior. *Cladistics* 18:137–53
- Oguma, Y; Kurokawa, H. 1984. The least cell number of first spermatocytes per cyst found in *Drosophila kanekoi*. *Japanese Journal of Genetics* 59: 263-265.
- Plant, JD; Paulus, HF. 1987. Comparative morphology of the postmentum of bees (Hymenoptera: Apoidea) with special remarks of the evolution of the lorum. *Z. Zool. Syst. Evol.* 25, 81–103.
- Prentice, M. 1991. Morphological analysis of the tribes of Apidae. In: Smith, D.R. (Ed.), *Diversity in the Genus, Apis*. Westview Press, Oxford, pp. 51–69.
- Roig-Alsina, A; Michener, CD. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera, Apoidea). *University of Kansas Science Bulletin* 55, 123±162.
- Serrao, JE. 2001. A comparative study of the proventricular structure in corbiculate Apinae (Hymenoptera, Apidae). *Micron* 32: 379–85
- Sheppard, W S; McPherson, BA. 1991. Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: Smith, D.R. (Ed.). *Diversity in the Genus Apis*, Western Press, Boulder, CO, pp. 87±102.
- Silveira, FA; Melo GAR, Almeida EA. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Composição e Arte*, Belo Horizonte, 253p.
- Whitfield, JB; Kjer, K. 2008. Ancient Rapid Radiations of Insects: Challenges for Phylogenetic Analysis. *Annu. Rev. Entomol.* 53:449–72
- Winston, ML; Michener, CD. 1977. Dual origin of highly social behavior among bees. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74, 1135–1137.

- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H. 2005a. Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux* 52 (2), 122e131.
- Zama, U; Bottura, G; Lino-Neto, J; Dolder, H; Báo, SN. 2005b. The nucleus flagellum transition in *Trypoxylon* (*Trypargilum*) subgenus, with emphasis on a singular centriolar adjunct (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22 (Suppl.), 56.
- Zama, U; Moreira J; Báo SN; Campos LAO, Dolder H; Lino-Neto J. 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure & Development* 36. 304e316

5. Conclusões Gerais

- A espécie *D. diversipes* analisada nesse estudo compartilha características morfológicas dos espermatozoides com as demais 'symphyta' já descritos. Estas semelhanças podem auxiliar em trabalhos filogenéticos do grupo baseado nos caracteres: (1) presença de espermatozoides em feixes na vesícula seminal; (2) espaço subacrossomal na região anterior do acrossomo e (3) pequenos derivados mitocondriais simétricos. Outros caracteres diferem marcadamente dos demais 'symphyta' como o número de espermatozoides por cisto, posição do perforatorium paralelo ao núcleo em grande extensão e o adjunto do centríolo do tipo simétrico. Tais diferenças apontam a necessidade de descrever os espermatozoides em várias espécies de diferentes famílias de 'symphyta' para que inferências filogenéticas contribuam para elucidação das relações evolutivas do grupo.

- A ultra-estrutura dos espermatozoides em *M. cassununga* é muito semelhante aquela descrita para os *Agelaia vicina* (Mancini et al., 2006) e *Vespa crabro* (Mancini et al., 2009) mostrando que esta característica é bastante conservada em Vespidae compartilhando as seguintes características: 1) acrossomo composto por uma vesícula acrossomal e perforatorium; 2) núcleo com cromatina compacta e homogênea; 3) adjunto de centríolo localizado entre a base do núcleo e um dos derivados mitocondriais; 4) região posterior do núcleo envolvida pelo adjunto de centríolo; 5) prolongamento do núcleo envolto pelo axonema; 6) axonema apresenta padrão 9+9+2 de microtúbulos; 7) derivados mitocondriais começam em diferentes alturas e diâmetros, 8) microtúbulos acessórios são os últimos a terminarem no axonema. O derivado mitocondrial menor bilobado na região final do flagelo é uma autapomorfia para *M. cassununga*.

- Espécies de abelhas Meliponina compartilham características derivadas da morfologia do sistema como a ausência de glândula acessória no sistema reprodutor e seis ciclos mitóticos na espermatogênese.