

PEDRO HENRIQUE AMBROSIO NERE

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Elasmus polistis* Burks, 1971  
(HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: EULOPHIDAE)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

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

T

N444m  
2018 Nere, Pedro Henrique Ambrosio, 1990-  
Morfologia dos espermatozoides de *Elasmus polistis* Burks,  
1971 (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae) / Pedro  
Henrique Ambrosio Nere. – Viçosa, MG, 2018.  
vi, 18 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.14-18.

1. Vespas. 2. Eulophidae. 3. Ultraestrutura (Biologia).  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
II. Título.

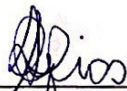
CDD 22. ed. 597.79

PEDRO HENRIQUE AMBROSIO NERE

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Elasmus polistis* Burks, 1971  
(HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: EULOPHIDAE)**

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

APROVADA: 20 de julho de 2018.



---

**Glenda Samara Dias Santos**



---

**Helen Cristina Pinto Santos**



---

**José Lino Neto  
(Orientador)**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus avós, Edmundo e Nalzira, por acolherem meus sonhos como os deles próprios.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade concedida e pela excelência em ensino.

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

Ao meu orientador, Lino, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e seus funcionários pela atenção e ajuda prestada sempre que solicitada.

A todos os professores que fizeram parte de minha trajetória acadêmica, pelo tempo cedido e conhecimento compartilhado.

A Dra Helen e Dra Glenda por prontamente aceitarem o convite para compor a banca avaliadora e por todas as contribuições feitas a este trabalho.

Aos meus avós, Edmundo e Nalzira, por não medirem esforços e recursos quando se tratando da minha educação. Essa conquista só foi possível graças a vocês.

À minha mãe, Elma, por mostrar-me o valor do aprendizado.

Aos meus amigos, Ana, Bárbara, Camila, Fernanda, Herman, Kelen, Lenise, Matheus, Reila, Thiago e Valéria, por escutarem minhas lamúrias e compartilharem de minhas alegrias ao longo dessa trajetória.

A todos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, por tornarem essa jornada prazerosa.

## SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract .....	vi
1. Introdução .....	1
2. Material e Métodos .....	2
2.1. Microscopia de luz (ML).....	3
2.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	3
3. Resultados .....	4
4. Discussão .....	9
Referências.....	14

## RESUMO

NERE, Pedro Henrique Ambrosio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Morfologia dos espermatozoides de *Elasmus polistis* Burks, 1971 (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae)**. Orientador: José Lino Neto.

Neste estudo, investigamos a morfologia dos espermatozoides do parasitoide *Elasmus polistis* (Eulophidae) utilizando microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozoides dessa espécie se mostraram filiformes, espiralados, com 165,6 ( $\pm$  4,6)  $\mu\text{m}$  de comprimento e exibindo uma região de cabeça, formada por um pequeno acrossomo e o núcleo, e uma região de flagelo. O acrossomo e parte do núcleo são revestidos por uma camada extracelular, a partir da qual inúmeros e longos filamentos irradiam. O núcleo espiralado e com 24,1 ( $\pm$  1,3)  $\mu\text{m}$  de comprimento estava preenchido com cromatina homoganeamente compacta e eletrodensa. Na região de transição núcleo-flagelo foi observado um adjunto do centríolo, também espiralado, que se estendia ao lado do núcleo por aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  e ao do corpo basal e demais componentes do flagelo por 1,1  $\mu\text{m}$ . Os dois derivados mitocondriais começaram aproximadamente juntos e exatamente na base do adjunto do centríolo. Em seção transversal, eles se mostraram simétricos, com forma levemente ovalada e diâmetro menor do que aquele do axonema. Este último, também espiralado, era constituído por 9 + 9 + 2 microtúbulos, formados a partir do corpo basal situado imediatamente abaixo e alinhado com o núcleo. Os espermatozoides de *E. polistis* exibiram as mesmas estruturas básicas observadas em outros Chalcidoidea. Contudo nesta espécie essas células podem ser distinguidas daquelas de outros Eulophidae pela longa sobreposição do adjunto do centríolo aos demais elementos flagelares e também pela presença de um par central de microtúbulos no corpo basal. As características dos espermatozoides têm sugerido que os Eulophidae estão intimamente relacionados aos Trichogrammatidae e ambas famílias mais próxima aos Eurytomidae e Pteromalidae do que aos Agaonidae.

## ABSTRACT

NERE, Pedro Henrique Ambrosio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Sperm morphology of *Elasmus polistis* Burks, 1971 (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae)**. Adviser: José Lino Neto.

In this study we investigated the sperm morphology of the parasitoid *Elasmus polistis* (Eulophidae) under light and transmission electron microscopy. The spermatozoa of this species are filiform and spiraled, with  $165.6 (\pm 4.6) \mu\text{m}$  in length with a distinctive head, formed by a small acrosome and nucleus, and a region of flagellum. The acrosome and part of the nucleus are covered by an extracellular sheath, from which many long filaments radiate. The spiral nucleus with  $24.1 (\pm 1.3) \mu\text{m}$  in length is filled with homogeneously compact chromatin. In the nucleous-flagellum transition the centriole adjunct extends towards the anterior portion in a spiral around the nucleus by approximately  $0.5 \mu\text{m}$  and by  $1.1 \mu\text{m}$  towards the posterior portion, overlaying the basal body, which has two central microtubules, and others components of the flagellum. The two mitochondrial derivatives began roughly at the same spot and at the base of the centriole adjunct. In cross-section, they were symmetrical, with a slightly oval shape and a smaller diameter than that of the axoneme. The latter, also in spiral, consisted of  $9 + 9 + 2$  microtubules and is formed from the basal body situated immediately below and aligned with the nucleus. The spermatozoa of *E. polistis* showed the same basic structures and morphological characteristics observed in other Chalcidoidea, however, it is possible to distinguish the spermatozoa of *E. polistis* from the other Eulophidae by the long length of the centriole adjunct on the flagellum and the presence of two central microtubules within the basal body. The characteristics of the spermatozoa suggest that Eulophidae is closely related to Trichogrammatidae and both families are more similar to Eurytomidae and Pteromalidae than Agaonidae.

## 1. Introdução

Os Hymenoptera são considerados a ordem mais basal dentre os insetos holometábolos e, com aproximadamente 155 mil espécies descritas (Huber, 2017), ocupam o quarto lugar entre as mais especiosas ordens de insetos. Dentre os Hymenoptera a superfamília Chalcidoidea agrupa o maior número de espécies descritas (cerca de 22, 5 mil), contudo estima-se que sejam mais de 500 mil espécies (Heraty et al., 2011, 2013; Heraty, 2017). Os Chalcidoidea são pequenas vespas parasitoides, medem em geral entre 1 a 2 mm, possuem ampla distribuição global e parasitam uma diversificada gama de táxons (Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Neuroptera, Odonata, Orthoptera, Psocoptera, Siphonaptera, Strepsiptera, Thysanoptera, entre outros). Por esse motivo, eles são importantes no controle de populações naturais e amplamente utilizados em programas de controle biológico de insetos-pragas (Quicke, 1997; Heraty, 2017).

Eulophidae é uma grande família de Chalcidoidea, com 4472 espécies descritas distribuídas em 297 gêneros. O gênero *Elasmus*, atualmente o único membro da tribo Elasmini (Eulophidae: Eulophinae), tem sua ocorrência registrada em 36 países e possui 258 espécies descritas (Noyes, 2018). Os Eulophidae possuem hábitos bastante variados, podendo ser gregário ou solitário e parasitarem ovos, larvas ou pupas de outros insetos e nematoides. Embora algumas espécies de *Elasmus* sejam parasitoides secundários (hiperparasitoides) de Braconidae e Ichneumonidae (Coote, 1997), a maioria é parasitoide primário de Lepidoptera e Coleoptera e, algumas poucas, de Vespidae (Hymenoptera), como *Elasmus polistis* que parasita pupas do gênero *Polistes* (Dorfey & Kohler 2011).

Apesar de existirem alguns trabalhos utilizando dados morfológicos tradicionais e moleculares, ainda há muitas dúvidas em relação à sistemática dos Chalcidoidea. As dificuldades encontradas por taxonomistas são decorrentes das homoplasias morfológicas, presentes em abundância no grupo (Heraty et al., 2013), e da resolução insuficiente quando aplicando um número limitado de marcadores moleculares (Munro et al., 2011).

Ao longo de todo o processo evolutivo os espermatozoides acumularam variações morfológicas que podem diferenciar os diversos grupos de insetos. Embora se trate de um tipo celular, eles fornecem uma surpreendente riqueza em número de

componentes (ver em Gottardo et al., 2016), bem como de formas e de relações entre esses componentes. Por esta razão a diversidade morfológica dessas células germinativas masculinas tem fornecido conjuntos de dados que vem sendo usados para o entendimento filogenético e das relações taxonômicas em diversos grupos de animais, incluindo os insetos (Jamieson et al., 1999; Pereira et al., 2008; Pitnick et al., 2009; Dias et al., 2013; Dallai, 2014; Barcellos et al., 2015; Dallai et al., 2016; Dallai et al., 2018).

Embora há uma extensa lista de espécies conhecidas de Chalcidoidea, os trabalhos que envolvem a ultraestrutura dos espermatozoides desses insetos ainda são poucos (Wilkes & Lee, 1965; Lino-Neto et al., 1999; 2000; Lino-Neto & Dolder 2001; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009; Silva, 2010; Santos et al., 2013; Santos et al., 2016). A morfologia e os componentes estruturais dos espermatozoides de Chalcidoidea já estudados incluem: (1) espermatozoides totalmente espiralados; (2) presença de uma bainha extracelular filamentosa recobrindo o acrossomo e parte do núcleo; (3) acrossomo muito pequeno, em geral com menos de 1  $\mu\text{m}$ ; (4) adjunto do centríolo simétrico, iniciando ao lado do núcleo e terminado junto às pontas dos dois derivados mitocondriais; (5) derivados mitocondriais simétricos e muito delgados; (6) no final do axonema, os túbulos acessórios terminando antes dos demais.

Portanto, este trabalho teve como objetivo descrever a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *E. polistis* e discutir essas novas informações à luz do que se tem na literatura.

## **2. Material e Métodos**

Os espécimes de *E. polistis* (Fig.1) foram obtidos a partir do hospedeiro *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). As colônias de *P. versicolor* foram coletadas em outubro de 2015 na área urbana da cidade de Congonhas, MG, (20° 29'S, 43° 51'W, 1000 m de elevação), e mantidas no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Este é o primeiro relato da ocorrência de *E. polistis* no estado de Minas Gerais e o segundo no Brasil, sendo o primeiro no estado do Rio Grande do Sul por Dorfey & Kohler (2011). A identificação da espécie foi feita pelo Dr. Valmir Antonio Costa do Instituto Biológico de Campinas, SP, e os espécimes testemunhos foram depositados na

Coleção de Insetos Entomófagos “Oscar Monte”, desse mesmo Instituto.

## 2.1. Microscopia de luz (ML)

Espermatozoides extraídos das vesículas seminais de três indivíduos foram espalhados sobre lâminas histológicas em presença de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e secas à temperatura ambiente. Para medir o tamanho total dos espermatozoides, algumas lâminas foram coradas com Giemsa por 15 min, para contrastar os componentes do espermatozoide, em seguida lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em um fotomicroscópio Olympus BX-60. Para medir o comprimento dos núcleos dos espermatozoides, algumas preparações foram coradas com 4,6-diamino-2-phenylindol (DAPI) 0,2 µg/ml em tampão fosfato-salino (Phosphate buffered saline – PBS), por 20 minutos, em seguida lavadas em água corrente e montadas com sacarose 50%. Os núcleos foram fotografados em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm. As medidas foram feitas utilizando o software Image-J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) de pelo menos 10 espermatozoides e 10 núcleos por indivíduo.

## 2.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Vesículas seminais de cinco indivíduos foram dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixadas por 2 h em solução de glutaraldeído a 2,5% com adição de 2% sacarose e 5 mM de CaCl<sub>2</sub> no mesmo tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o material foi lavado nesse tampão, pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 h, desidratado em série crescente de acetona e infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos (~ 60 nm) foram feitos em ultramicrotomo automático com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila a 1% e citrato de chumbo a 2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos com um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109, operando a 80 kV, do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### 3. Resultados

Os espermatozoides de *E. polistis* se mostraram finos, longos e espiralados, com comprimento total de  $165,6 \pm 4,6$  ( $157,1-174,7$ )  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ; Fig. 2A). As regiões da cabeça e do flagelo foram facilmente distinguidas quando coradas com Giemsa (Fig. 2A, B). A primeira região era formada pelo núcleo e, anteriormente, um pequeno acrossomo (Fig. 2A–G). Neste último foi visível apenas uma pequena vesícula ( $\sim 170$  nm de comprimento) sem nenhum perforatorium aparente (Fig. 2D, E). O pequeno acrossomo e a região anterior do núcleo eram revestidos por uma bainha extracelular ( $\sim 760$  nm de comprimento por 40 nm de espessura), da qual irradiavam diversos finos e longos filamentos (Fig. 2D, E). O núcleo, também filiforme e espiralado, mediu  $24,1 (\pm 1,3)$   $\mu\text{m}$  de comprimento e se mostrou gradual e anteriormente afilado a partir da região mediana, com diâmetro indo de 265 nm a 70 nm (Fig. 2A–C). Ele era completamente preenchido por cromatina compacta e eletrodensa (Figs 2E–G e 3A–C), e na maior parte das vezes exibiu a forma circular em corte transversal (Fig. 2G), no entanto, apresentou formato irregular em algumas seções devido à sua torção (Fig. 2F). A região posterior era truncada e com diâmetro levemente reduzido lateralmente onde a projeção anterior do adjunto do centríolo ( $\sim 50$  nm), em forma de meia lua, estava associada (Fig. 3A–C).

Na região de transição núcleo-flagelo foi observado o corpo basal (ou centríolo) e o adjunto do centríolo, unindo o núcleo aos demais componentes flagelares. O corpo basal, a partir do qual o axonema é formado, mediu cerca de 220 nm de comprimento (por igual diâmetro) e estava intimamente associado à base truncada do núcleo. No interior do corpo basal foi observado um par de microtúbulos (Fig. 3A, B). O adjunto do centríolo, com cerca de 1,6  $\mu\text{m}$  de comprimento e formato de meio lua em corte transversal, estendeu-se em espiral circundando parcialmente a extremidade final do núcleo ( $\sim 0,5$   $\mu\text{m}$ ) (Fig. 3A–C) e, posteriormente, o corpo basal e início do axonema ( $\sim 1,1$   $\mu\text{m}$ ) (Fig. 3D, E), terminando justo sobre as extremidades anteriores dos derivados mitocondriais (DMs) (Fig. 3B).

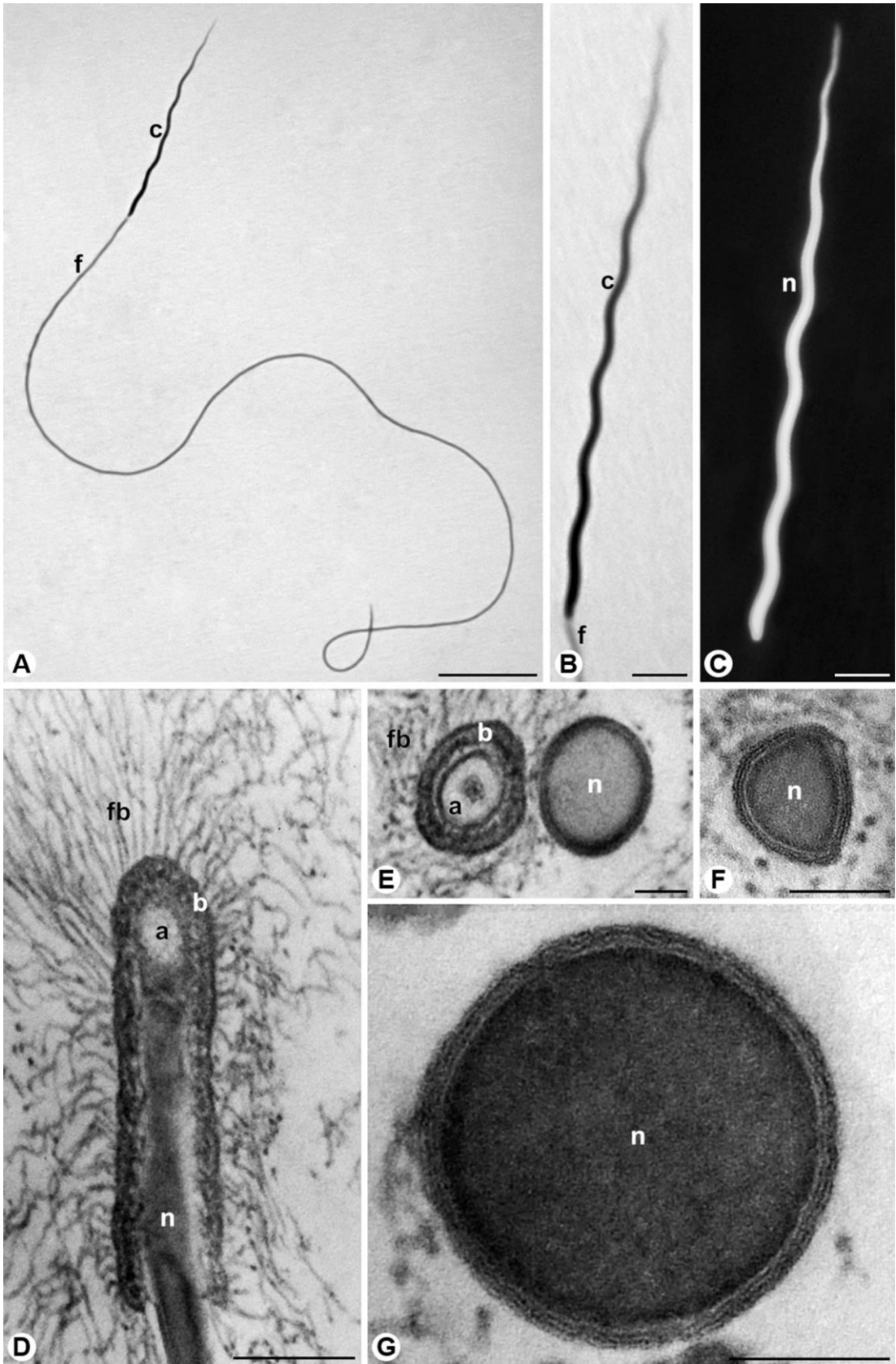
O flagelo consistiu de apenas um axonema e dois DMs (Fig. 3F–H). Essas três estruturas também exibiram um curso em espiral, com voltas completas em intervalos regulares de aproximadamente 1,55  $\mu\text{m}$  (Fig. 3F). Devido a essa disposição, cortes transversais do axonema não mostraram todos os microtúbulos

seccionados em ângulo reto (Fig. 3G, H). O axonema apresentou um arranjo de  $9 + 9 + 2$  microtúbulos, sendo nove microtúbulos mais externos (acessórios), nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais, estes ligados às duplas periféricas por raios radiais bem evidentes (Fig. 3H). Em corte transversal, os DMs se mostraram simétricos, levemente ovalados e, cada um, com área de apenas  $1/5$  àquela do axonema (Fig. 3G, H). Quando em cortes longitudinais eles mostraram cristas mitocondriais dispostas transversamente em intervalos regulares de aproximadamente 35 nm (Fig. 3F). Anteriormente os dois DMs iniciaram a aproximadamente  $1 \mu\text{m}$  abaixo da base do núcleo, em contato com a base do adjunto do centríolo (Fig. 3B). Na região final do flagelo, um DM termina imediatamente antes do outro e ambos justo antes do axonema (Fig. 3I, J). Nesta última estrutura, os microtúbulos acessórios foram os primeiros a terminarem, seguidos do par central e, por último, as duplas periféricas (Fig. 3J-L).

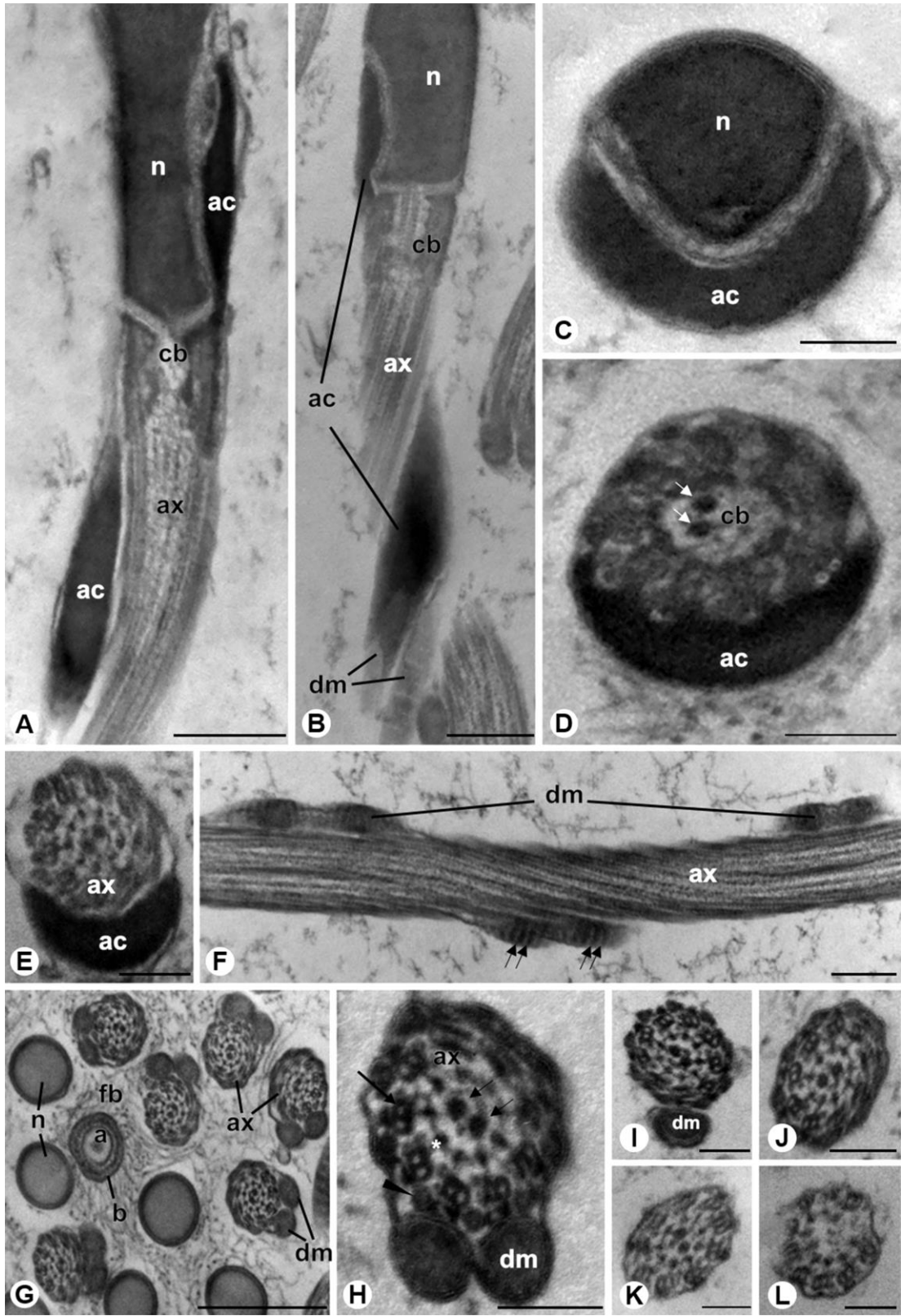


**Fig. 1.** Fêmea de *Elasmus polistis* Burks, 1971. Foto: Dr. Valmir Antonio Costa (Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas/SP).

**Fig. 2.** ML (A-C) e MET (D-G) de espermatozoides de *E. polistis* em cortes transversais (E-G) e longitudinal (D). (A, B) Espermatozoide corado com Giemsa evidenciando a região da cabeça (c) e flagelo (f). (C) Núcleo (n) corado com DAPI. (D-G) Cortes da região da cabeça mostrando o núcleo (n), o pequeno acrossomo (a) e os filamentos (fb) que irradiam da bainha extracelular (b). Barras: A = 10  $\mu\text{m}$ ; B e C = 2  $\mu\text{m}$ ; D = 0,2  $\mu\text{m}$ ; E-G = 0,1  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.** MET de espermatozoides *E. polistis* em cortes longitudinais (**A, B, F**) e transversais (**C-E, G-L**). (**A-E**) Região de transição núcleo-flagelo mostrando núcleo (n), corpo basal (cb) com microtúbulos centrais (setas), axonema espiralado (ax), o adjunto do centríolo (ac) em forma de meia lua envolvendo parcialmente o núcleo, o corpo basal e o início do axonema. Observe que os derivados mitocondriais (dm) se iniciam sob a extremidade posterior do ac. (**F**) Segmento do flagelo mostrando os derivados mitocondriais (dm) e axonema (ax) em espiral. As setas indicam cristas mitocondriais. (**G**) Espermatozoides cortados em diferentes níveis mostrando acrossomo (a), bainha extracelular (b) de onde irradiam vários filamentos (fb), núcleo (n), axonema (ax) e derivados mitocondriais (dm). (**H**) Região mediana do flagelo mostrando os derivados mitocondriais (dm) e axonema (ax) composto pelos túbulos acessórios periféricos (cabeça de seta), duplas periféricas (seta grande), o par de túbulos centrais (setas pequenas) e os raios radiais (\*). (**I-L**) Porção final do flagelo mostrando que um derivado mitocondrial (dm) termina brevemente antes do outro e ambos antes do axonema. Neste, os túbulos acessórios são os primeiros a terminarem, seguidos pelo par central e, por fim, as duplas periféricas. Escalas das barras: A e B= 0,2  $\mu\text{m}$ ; G= 0,5  $\mu\text{m}$ ; C-F, H-L= 0,1  $\mu\text{m}$ .



#### 4. Discussão

A morfologia básica dos espermatozoides de *E. polistis* se mostrou similar àquela observada na maioria dos Chalcidoidea já estudados, entre elas: (1) espermatozoides totalmente espiralados; (2) presença de uma bainha extracelular filamentosa recobrendo o acrossomo e a ponta anterior do núcleo; (3) acrossomo muito pequeno, em geral com menos de 1  $\mu\text{m}$ ; (4) adjunto do centríolo simétrico, iniciando ao lado do núcleo e terminado junto às pontas dos dois DMs; (5) derivados mitocondriais simétricos e muito delgados; (6) no final do axonema, os túbulos acessórios terminando antes dos demais. No entanto, foram observadas características que diferenciam os espermatozoides dessa espécie daqueles de outros Chalcidoidea.

Nos espermatozoides dos Chalcidoidea tem sido observado que a bainha extracelular filamentos que recobre o acrossomo e parte do núcleo varia em espessura, comprimento e na justa associação com o núcleo. Indo de fina e muito curta, como observado em *Palmistichus elaeisis* (Santos et al., 2013), a espessa e muito longa como nos espermatozoides de *Idarnes* sp2, nos quais ela recobre toda a região da cabeça e, ainda, a uma porção anterior do flagelo (Silva, 2010). Por outro lado, nenhuma bainha foi observada nos espermatozoides de *Idarnes* sp1 e *Idarnes* sp3 (Silva, 2010), e também não foi mencionada por Wilkes and Lee (1965) para *Dahlbominus fuscipennis*. Em *E. polistis*, como em outros Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009; Silva, 2010; Santos et al., 2013; Santos et al., 2016), a bainha se encontra intimamente unida ao núcleo, diferentemente dos espermatozoides de *Pegoscapus tonduzi* (Fiorillo et al., 2008) e *Trichospilus diatraeae* (Santos et al., 2013), nos quais um espaço eletro-lúcido entre a bainha e o núcleo é visível. Uma bainha extracelular filamentosa também foi observada nos espermatozoides das vespas parasíticas Braconidae (Newman & Quicke, 1998) e Ichneumonidae (Moreira et al., 2010), indicando uma relação próxima entre Chalcidoidea e Ichneumonoidea. Por outro lado, não há qualquer registro da ocorrência dessa estrutura nos espermatozoides de Aculeata (abelhas, formigas e vespas) e ‘symphyta’. A função dessa estrutura ainda permanece em debate, a qual pode ser mecânica e/ou estrutural, servindo como barreira que protege ao núcleo e acrossomo de fatores externos. Trabalhos mostraram que essa bainha e seus filamentos se ligam ao ácido fosfotúngstico etanólico (E-PTA, em inglês) (ver em Santos et al., 2013), o qual tem

afinidade seletivamente por proteínas ricas em aminoácidos básicos. Esta técnica é amplamente utilizada para observação de regiões sinápticas de contato, onde proteínas básicas são abundantes. Por esse motivo, é possível que esta estrutura esteja relacionada com o reconhecimento celular entre o espermatozoide e o oócito, contudo quais são essas proteínas e se as mesmas estão presentes neste último ainda é um assunto em aberto.

Um acrossomo muito pequeno tem sido comumente observado nos espermatozoides da maioria dos Chalcidoidea. O acrossomo formado somente pela vesícula acrossomal, como no Eulophidae aqui estudado, também foi observado em outras espécies dessa família [*Melittobia australica*, *Melittobia hawaiiensis* (Brito et al., 2009) e *T. diatraeae* (Santos et al., 2013)] e também em Trichogrammatidae (Lino-Neto et al., 2000) e Agaonidae (Silva, 2010). A presença de um perforatorium, com a base inserida em uma cavidade na ponta anterior do núcleo e recoberto pela vesícula acrossomal, foi descrito em pelo menos uma espécie para cada família de Chalcidoidea estudada (Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto & Dolder, 2001; Silva, 2010; Santos et al., 2013; Santos et al., 2016). Ainda, nenhuma das estruturas que compõem o acrossomo foi observada nas espécies do gênero *Pegoscapus* (Agaonidae; Fiorillo et al., 2008). É importante salientar que as presenças (ou ausências) do acrossomo e, especialmente, do perforatorium devem ser consideradas com cautela, pois elas são estruturas muito pequenas (em geral menor que 0,2 µm) e de densidades similares entre elas e a do núcleo, portanto podendo levar à interpretações equivocadas durante as observações das microfotografias (ver p.ex., Fig. 1B-E, em Santos et al., 2016).

De modo geral, os núcleos dos espermatozoides dos Chalcidoidea são espiralados e, quando observados por meio de técnicas de microscopia de fluorescência (DAPI) ou eletrônica de varredura, apresentam-se sob duas formas, que estão relacionadas ao comprimento do núcleo. Primeiro, espécies em que os espermatozoides possuem núcleos robustos e pequenos, não ultrapassam 20 µm em média, com formato de gota na região posterior, e que se afunilam bruscamente a partir de 1/3 do seu comprimento em direção ao ápice [ver em *Trichogramma pretiosum*, *Trichogramma atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000), *Trichogramma dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001), *M. hawaiiensis*, *M. australica* (Brito et al., 2009), *Idarnes* sp1 (Pereira et al., 2008) e *T. diatraeae* (Santos et al., 2013)]. Segundo, espécies com

núcleos dos espermatozoides longos, com comprimento superior a 24  $\mu\text{m}$ , em formato de agulha e afunilamento suave da base ao ápice [ver em *D. fuscipennis* (Wilkes and Lee, 1965), *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto et al., 1999), *Pegoscapus* sp1, *Pegoscapus* sp2, *P. tonduzi* (Fiorillo et al., 2008), *Idarnes* sp2, *Idarnes* sp3 (Pereira et al., 2008), *P. elaeisis* (Santos et al., 2013) e *E. polistis*]. Apesar das diferenças no comprimento, é possível que em ambos formatos as quantidades de cromatina nuclear sejam similares, pois a área basal mais espessa no primeiro caso pode compensar o seu tamanho reduzido.

O adjunto do centríolo, tipicamente observado na região de transição núcleo-flagelo, ocorre em diversas ordens de insetos, incluindo Hymenoptera (Jamieson et al., 1999), e é uma estrutura que varia grandemente na forma, tamanho e na relação dela com os demais componentes dessa região. Em Agaonidae, o adjunto do centríolo não se sobrepõe ao núcleo, e está restrito à região do corpo basal em *Pegoscapus* (Fiorillo et al., 2008), contudo em *Idarnes* (Silva, 2010), ele se inicia abaixo dos derivados mitocondriais e continua envolvido por eles por pelo menos 4  $\mu\text{m}$ . Em Eurytomidae (Lino-Neto et al., 1999) e Pteromalidae (Santos et al., 2013) o adjunto do centríolo se sobrepõe ao núcleo por uma longa distância, (cerca de 3  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ , respectivamente), e por uma curta distância ao flagelo, em torno de 0,5  $\mu\text{m}$  em ambas famílias. Na primeira, quando visto em corte transversal, ele é espesso, possui formato em “D” e está associado a um pequeno núcleo elíptico. Nas três espécies de Trichogrammatidae estudadas (Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001) o adjunto do centríolo mede em média 0,5  $\mu\text{m}$  e cobre uma pequena porção do núcleo e flagelo, quando visto em corte transversal possui formato elíptico e é menor em relação ao núcleo, que possui forma de “D”. Nos eulofídeos, com relação ao comprimento, o adjunto do centríolo se assemelha ao da família citada acima, ele não excede 0,5  $\mu\text{m}$  em sobreposição ao núcleo e, em *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009), ele não ultrapassa o corpo basal, enquanto que em *P. elaeisis*, *T. diatraeae* (Santos et al., 2013) e *E. polistis* ele se alonga em espiral em torno do axonema. O adjunto do centríolo em forma de meia lua envolvendo o núcleo é uma característica compartilhada por todos eulofídeos estudados, entretanto é possível distinguir os espermatozoides de *E. polistis* dos demais Eulophidae pelo seu longo comprimento sobre o flagelo, onde é comumente observado cortes transversais contendo unicamente o axonema e o adjunto do centríolo (Fig. 3E). Com exceção de

Agaonidae, a região de transição entre núcleo e flagelo mostrou ser promissora na sistemática de Chalcidoidea, pois foi possível agrupar as espécies pertencentes as mesmas famílias com base nas semelhanças entre as interações dos componentes presentes nessa região.

O corpo basal é preenchido por materiais eletrodensos que dificultam a visualização dos microtúbulos que o compõem, contudo facilmente se observa a ocorrência de um par central de microtúbulos, condição incomum a este componente flagelar (Avidor-Reiss, 2018). Em insetos, ocorrência desses microtúbulos foi observada no Orthoptera *Melanoplus differentialis* (Phillips, 1970). Contudo, nos espermatozoides daquele Orthoptera a base do axonema apresentou nove duplas periféricas e um par central (padrão 9 + 2). Como esse é um padrão observado em muitos axonema, levou à conclusão que os espermatozoides daquela espécie não possuíam corpo basal. Contudo, isso pode ser devido ao crescimento do par central dos microtúbulos axonemais para a região centriolar, como ocorre em muitos amniotas durante a espermatogênese e permaneceram nos espermatozoides maduros (Avidor-Reiss, 2018). *E. polistis* é a primeira espécie de Hymenoptera, incluindo os Eulophidae, que o corpo basal exibiu dois microtúbulos centrais, indicando que esta pode ser uma característica do gênero ou, até mesmo, da espécie. Os raios radiais são componentes integrantes do axonema e, juntamente com o par central de microtúbulos e as duplas periféricas, são responsáveis pela motilidade dos espermatozoides. Como a composição proteica e estrutura desses componentes podem variar, é possível organismos distintos exibirem essa estrutura com morfologias diferentes (Zhu et al., 2016). Nos Chalcidoidea já estudados esses raios são bem evidentes e de estrutura muito semelhante em todas as espécies, sugerindo uma composição proteica bastante conservada no grupo. Assim como na maioria dos Chalcidoidea, o axonema dos espermatozoides de *E. polistis* é a última estrutura do flagelo a terminar, tendo início pelos microtúbulos acessórios e seguidos pela dupla central. Diferentemente do observado nas três espécies de *Pegoscapus* (Agaonidae, Fiorillo et al., 2008), onde par central é o primeiro a terminar. O axonema em *P. elaeisis* (Santos et al., 2013), quando visto em corte longitudinal, possui estriações transversais ao longo de todo comprimento, algo nunca antes observado em nenhum Chalcidoidea. Em ambos os casos, tais modificações podem ser características dos respectivos gêneros.

Os derivados mitocondriais neste eulofídeo são ovais, simétricos e com diâmetro menor que o axonema, semelhantes aos observados em outros Eulophidae (Wilkes & Lee, 1965; Santos et al., 2013), Eurytomidae (Lino-Neto et al., 1999), Trichogrammatidae (Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001) e Pteromalidae (Santos et al., 2016). Entretanto, os derivados mitocondriais de *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009) são assimétricos, possivelmente representando uma característica única para este gênero de eulofídeos. Em *Pegoscapus* (Fiorillo et al., 2008), os derivados mitocondriais diferem destes mencionadas acima apenas por serem ligeiramente assimétricos. Em *Idarnes* (Silva, 2010), eles são maiores em área e inicialmente circundam completamente o axonema, posteriormente adquirindo formato triangular quando observados em corte transversal. Possivelmente um indicativo que as subfamílias a qual os dois gêneros de agaonídeos estão incluídos (Agaoninae e Sycophaginae, respectivamente) são distantemente relacionadas. Em todos Chalcidoidea estudados os derivados mitocondriais têm início próximo à base do adjunto do centríolo e estendem-se em espiral até próximo ao final do flagelo, onde um termina imediatamente antes do outro, exceto em *T. diatraeae* (Santos et al., 2013) onde eles terminam em posições bastante diferentes. Além de sua função como fonte energética para a célula, os derivados podem reduzir a flexibilidade do flagelo, a qual somado à disposição em espiral de todo o flagelo, certamente altera o padrão de batimento flagelar, influenciando no deslocamento dos espermatozoides. Os corpos acessórios, quando presentes, são muito reduzidos, como em *P. elaeisis* (Santos et al., 2013), *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999), *Muscidifurax uniraptor* (Santos et al., 2016), características que diferenciam os Chalcidoidea de outros insetos e da maioria dos Hymenoptera (ver Jamieson et al., 1999; Zama et al., 2005; Araújo et al., 2009; Moreira et al., 2012). A presença de um material centro-flagelar foi observada no euritomídeo *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999) e no pteromalídeo *M. uniraptor* (Santos et al., 2016), um indício que as duas famílias estão proximamente relacionadas. O material centro-flagelar também foi observado em Symphyta (Lino-Neto et al., 2008) e Aculeata (Mancini et al., 2009), mostrando que sua presença é uma característica dos himenópteros.

Em conclusão, as características morfológicas dos espermatozoides dos Chalcidoidea indicam que Eulophidae está intimamente relacionado com Trichogrammatidae,

como foi observado por Heraty et al., (2013) e Peters et al., (2018), e ambas as famílias estão mais próximas de Eurytomidae e Pteromalidae do que Agaonidae. Em Agaonidae, os espermatozoides de *Pegoscapus* são mais semelhantes às quatro famílias acima de que a *Idarnes*. Gauthier et al., (2000) reclassificaram a família Elasmidae, composta unicamente pelo gênero *Elasmus*, como eulofídeos pertencentes a Eulophinae e únicos membros da tribo Elasmini. Outros trabalhos confirmam essa classificação (Burks et al., 2011; Munro et al., 2011; Heraty et al., 2013; Peters et al., 2018) e aqui também conseguimos observar grande semelhança na morfologia dos espermatozoides de *E. polistis* com os demais eulofídeos estudados.

### **Agradecimentos**

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Valmir Antonio Costa e ao Dr. Thiago Marinho Alvarenga, pela identificação da espécie. Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Referências**

- Araújo, V. A., Moreira, J., Lino-Neto, J., 2009. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse Fabricius* 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). *Micron* 40, 719-723.
- Avidor-Reiss, T., 2018. Rapid Evolution of Sperm Produces Diverse Centriole Structures that Reveal the Most Rudimentary Structure Needed for Function. *Cells*, 7, 67.
- Barcellos, M. S., Martins, L. C., Cossolin, J. F., Serrão, J. E., Delabie, J. H., Lino-Neto, J., 2015. Testes and spermatozoa as characters for distinguishing two ant species of the genus *Neoponera* (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist* 98, 1254-1256.
- Brito, P., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2009. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue Cell* 41, 113-117.

- Burks, R. A., Heraty, J. M., Gebiola, M., Hansson, C., 2011. Combined molecular and morphological phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with focus on the subfamily Entedoninae. *Cladistics* 27, 581-605.
- Coote, L. D., 1997. Elasmidae. In: Gibson, G. A., Huber, J. T., Woolley, J. B. Annotated keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). NRC Research Press, 165-169.
- Dallai, R., 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Struct. Dev.* 43, 257-290.
- Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R. G., 2016. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 1-23.
- Dallai, R., Lino-Neto, J., Dias, G., Nere, P. H. A., Mercati, D., Lupetti, P., 2018. Fine structure of the ladybird spermatozoa (Insecta, Coleoptera, Coccinellidae). *Arthropod Struct. Dev.* 47, 286-298.
- Dias, G., Oliveira, C. M., Lino-Neto, J., 2013. Testicular and spermatogenic characteristics of *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae) with taxonomic inferences. *Tissue Cell* 45, 227-230.
- Dorfey, C., Kohler, A., 2011. First report of *Elasmus polistis* Burks (Hymenoptera: Eulophidae) recovered from *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) nests in Brazil. *Neotrop. Entomol.* 40, 515-516.
- Fiorillo, B. S., Lino-Neto, J., Bao, S. N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscopus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39, 1271-1280.
- Gauthier, N., Lasalle, J., Quicke, D. L., Godfray, H. C. J., 2000. Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids. *Syst. Entomol.* 25, 521-539.
- Gottardo, M., Dallai, R., Mercati, D., Hornschemeyer, T., Beutel, R. G., 2016. The evolution of insect sperm – an unusual character system in a megadiverse group. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 54, 237-256.

- Heraty, J., Ronquist, F., Carpenter, J. M., Hawks, D., Schulmeister, S., Dowling, A. P., Murray, D., Munro, J., Wheeler, W. C., Schiff, N., Sharkey, M., 2011. Evolution of the hymenopteran megaradiation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 60, 73-88.
- Heraty, J. M., Burks, R. A., Cruaud, A., Gibson, G. A. P., Liljeblad, J., Munro, J., Rasplus, J.Y., Delvare, G., Jans̃ta, P., Gumovsky, A., Huber, J., Woolley, J. B., Krogmann, L., Heydon, S., Polaszek, A., Schmidt, S., Darling, D. C., Gates, M. W., Mottern, J., Murray, E., Dal Molin, A., Triapitsyn, S., Baur, H., Pinto, J. D., van Noort, S., George, J., Yoder, M., 2013. A phylogenetic analysis of the megadiverse Chalcidoidea (Hymenoptera). *Cladistics* 29, 466-542.
- Heraty, J., 2017. Parasitoid biodiversity and insect pest management. In: Foottit, R. G., Adler, P. H. *Insect Biodiversity: Science and Society*, 603-625.
- Huber, J. T., 2017. Biodiversity of Hymenoptera. In: Foottit, R. G., Adler, P. H. *Insect Biodiversity: Science and Society*, 419-461.
- Jamieson, B. G. M., Dallai, R., Afzelius, B. A., 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, Inc. p 555.
- Lino-Neto, J., Bao, S. N., Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28, 253-259.
- Lino-Neto, J., Bao, S. N., Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81, 205-211.
- 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., Dolder, H., Mancini, K., Mercati, D., Dallai, R., 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40, 185-193.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., Dallai, R., 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Struct. Dev.* 38, 54-59.

- 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.
- Moreira, J., Brito, P., Mancini, K., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2012. The descriptions of new microanatomical structures of the male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). *Micron* 43, 292-297.
- Munro, J. B., Heraty, J. M., Burks, R. A., Hawks, D., Mottern, J., Cruaud, A., Rasplus, J. Y., Jansřta, P., 2011. A molecular phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS One* 6, e27023.
- Newman, T. M., Quicke, D. L. J., 1998. Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *J. Hymenopt. Res.* 7, 25-37.
- Noyes, J. S., 2018. Universal Chalcidoidea Database. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/chalcidoids/>>. (acessado em 15.07.18)
- Pereira, R. A. S., Lino-Neto, J., Prado, A. P. D., 2008. Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. *Symbiosis* 45, 143-147.
- Peters, R. S., Niehuis, O., Gunkel, S., Bläser, M., Mayer, C., Podsiadlowski, L., Kozlov, A., Donath, A., van Noort, S., Liu, S., Zhou, X., Misof, B., Heraty, J., Krogmann, L., 2018. Transcriptome sequence-based phylogeny of chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) reveals a history of rapid radiations, convergence, and evolutionary success. *Mol. Phylogenet. Evol.* 120, 286-296.
- Phillips, D. M., 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell. Biol.*, 44, 243-277.
- Pitnick, S., Hosken, D. J., Birkhead, T. R., 2009. Sperm morphological diversity. In Birkhead, T. R., Hosken, D. J., Pitnick, S. *Sperm biology*, 69-149.
- Quicke, D. L. (1997). *Parasitic wasps*. Chapman & Hall Ltd, p 470.

- Santos, H. P., Zama, U., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2013. Sperm morphology of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae). *Micron* 51, 36-40.
- Santos, H. P., Barcellos, M. S., Reis, A. B., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2016. Sperm morphology of *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae). *Arthropod Struct. Dev.* 45, 307-310.
- Silva, J. S. D., 2010. Caracterização ultraestrutural dos espermatozoides de três espécies do gênero *Idarnes*. Universidade de Brasília, Brasília, pp 47. <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/7389/1/2010\\_JulianaSouzadaSilva.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/7389/1/2010_JulianaSouzadaSilva.pdf)> (acessado em 05.07.18).
- Wilkes, A., Lee, P. E., 1965. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in the hymenopteron *Dahlbominus fuscipennis* (zett.) (Eulophidae). *Can. J. Genet. Cytol.* 7, 609-619.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L. A., Dolder, H., Bão, S. N., 2005. Sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium dahlbom* (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indication of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37, 313-321
- Zhu, X., Liu, Y., Yang, P., 2017. Radial Spokes – A Snapshot of the motility regulation, assembly, and evolution of cilia and flagella. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a028126.