

EDALTON DOS REIS SILVA

**MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS MASCULINAS E DOS
ESPERMATOZOIDES EM *Mischocyttarus* (HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

EDALTON DOS REIS SILVA

**MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS MASCULINAS E DOS
ESPERMATOZOIDES EM *Mischocyttarus* (HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

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

APROVADA: 31 de março de 2011

Prof. Edmilson Amaral de Souza

Prof. Vinícios Albano Araújo

Profa. Uyrá dos Santos Zama

Profa. Luciane Cristina de O. Lisboa

Prof. José Lino Neto
Orientador

*Aos meus pais Elias e Ester Silva... Sempre presentes em
todas as etapas da minha formação!*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meus Sinceros Agradecimentos:

À Universidade Federal de Viçosa, pela excelência com que a tanto tempo vem proporcionando o desenvolvimento da pesquisa científica no Brasil.

Às Profa. Jacenir Mallet e Teresa Gonçalves, por me aceitarem no Laboratório de Transmissores há alguns anos atrás onde tudo começou. Pela valiosa orientação, pelos laços fortes de uma amizade que será cultivada até sempre, pelo carinho, pela certeza de que vocês fazem parte da minha história e pelas portas que permanecem abertas até hoje.

Ao Prof. Dr. José Lino Neto, pelo desafio de me orientar diante da minha ausência física, pelos vínculos profissionais que hora se firmam e pelos laços de amizade que ficaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de auxílio financeiro.

À Profa. Dra. Lenira Lacerda por abrir as portas do Laboratório do Meliponário no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão e por me ensinar a fazer pesquisa quando nem mesmo imaginava chegar até aqui.

À Profa. Dra. Gisele Garcia, por fazer parte desse sonho, pelo valioso auxílio na condução da primeira coleta, pelas orientações, sugestões e pela alegria contagiante com que torna os dias no Laboratório mais agradáveis.

Ao Prof. Dr. Orlando Tobias Silveira, do Museu Paraense Emílio Goeldi pela identificação das espécies utilizadas nesse trabalho.

À Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Aos meus queridos e amados pais Elias e Ester Silva, por terem me amado incondicionalmente e me ensinado a ser quem eu sou. Por acreditarem em mim, por toda uma vida de incentivos e “por me revelarem a cada momento a força de um amor que eu não sou capaz de explicar apenas de sentir”.

À minha esposa Luciana Silva que embarcou no meu sonho, aceitou sair do Rio e fazer uma “escala” de quatro anos em Viçosa... Escala que durou apenas o suficiente pra marcar nossas vidas. Por estar sempre pronta a suprir as minhas ausências nos últimos tempos. Pelo carinho desprendido e toda a dedicação com a qual conduz a minha família.

À minha amada filha Viçosense Ana Carolina Araújo Silva, “que me ensina a cada dia o valor dos pequenos milagres existentes em cada descoberta”. Por ter contribuído pra que minha vida em Viçosa valesse à pena.

Aos meus queridos irmãos, Saíle Silva, Elias Costa e Silva Júnior, Edael Silva e Edaylton Silva, pela união que temos, pelo carinho que nos une, por toda uma vida compartilhada e por estarem sempre presentes na minha vida, mesmo estando ausentes.

Ao meu cunhado João Carlos Rabelo, as minhas cunhadas Tatyana Buarque, Meiribel Nogueira e Jesseângela Caldas, por completarem minha Irmã e meus irmãos, pela convivência sempre agradável, pelos momentos de descontração nos almoços de domingo e pelos laços que nos unirão pra sempre.

Aos meus sobrinhos Isabelle Rabelo, João Carlos Filho, Isabela Nogueira, Misael Nogueira, João Elias Buarque, Rúben Buarque, por me

mostrarem todos os dias o quanto é maravilhoso ter uma família unida. Ao meu sobrinho Luís Gabriel, que acaba de chegar, mas que já sei amar.

À minha sogra Edna Araújo, por estar sempre presente em minha vida, pela maravilhosa companhia e pelo cuidado sempre desprendido à minha família.

À minha grande amiga Simone Freitas que há dez anos me traz tantas coisas boas. Por me “levar pra Viçosa”, por me abrigar muitas vezes em “suas casas”, pela amizade verdadeira demonstrada em todos esses anos, por me fazer acreditar que essa tese seria possível, por todos os momentos de alegria onde o riso corre solto, pela valiosa orientação em todas as etapas desse trabalho e por me mostrar o quanto é bom ter um amigo verdadeiro.

À minha amiga Sílvia Menezes (Silvita IOC), pela agradável companhia nos engarrafamentos da linha vermelha, por também me abrigar em sua casa, pelos inúmeros momentos de alegria e pelos laços de amizade cultivados até hoje.

Aos queridos amigos do Laboratório de Transmissores da Leishmaniose (LTL), Setor de Entomologia Forense do Instituto Oswaldo Cruz: Ana Laura Carbajal, Cristina Santos, Catarina Macedo, Daniele Misael, Leandro Borges, Margareth Almeida, Suzete Oliveira, Nathanielly Rocha, Simone Castro, Shênia Novo, Luciana Reboredo, Bento, Simone Kukushi, pelo agradável convívio em todos esses anos de idas e vindas.

Aos demais amigos do Laboratório de Transmissores da Leishmaniose, Wagner Costa, Maurício Vilela, Elisabeth Rangel, Margareth Afonso, Simone Costa, por todos esses anos de amizade e pelo incentivo.

Aos técnicos do Setor de Entomologia Forense do Instituto Oswaldo Cruz, Adalberto Silva, Simone Teves, Ana Paula Rufino, pelo empenho e

profissionalismo e ao técnico da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz, Rômulo Custódio pelo auxílio no uso do microscópio eletrônico de transmissão, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Às secretárias do quarto andar Ester e Ângela que estiveram sempre prontas a ajudar em todos os momentos.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas, em especial, Clóvis Andrade, Adilson Zácaro, Isabel Maldonado, Sérgio da Matta pelo agradável convívio no Laboratório de Biologia Estrutural.

Aos colegas de disciplinas, Marcelo Oliveira, Marcília Nascimento, Reggiane Vilela, Bruna Araújo, Katiane Coelho, Ana Paula Florentino, Danielle Barbosa, Carolina Santos, Margareth Werneck, Cristhian Perez, Fabíola Carvalho, Juliana Silveira, Nina Dutra, Juliano Nogueira, Wellington Mata (Letinho), Diego Ceolin, Ana Paula Cerqueira, Mariana Lana, Manuela Carvalho, Rosemary Mendes, Pâmela Campos, Maria do Carmo Fialho (Madu), por tantos bons momentos compartilhados e pelos conhecimentos adquiridos com o simples fato de conviver.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica, Dihego Azevedo, Cirlei Matiello, Maria Ignez Castrillon, Mônica Volpini pelo carinho e amizade que ficaram.

Às queridas Beth e Diana, secretárias do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, por me ajudarem em todos os momentos, pela alegria e paciência com que sempre nos recebem.

Às amigas Rita, Taynara e Tia Eliana, pelo apoio incondicional desprendido nos tempos de vida em Viçosa.

Aos amigos Fernando Gomes, Claudivânia Miranda, Max Gonçalves, Felipe (Bife), Patrícia Coelho, Vinícius Albano, Jane Carla, Ana Paula Caixeiro, e Alex pelo convívio no laboratório e pelos valiosos conhecimentos passados nas conversas informais e no auxílio nos momentos iniciais.

Ao Prof. Albuquerque Bastos, diretor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão - Campus Alcântara, pela confiança depositada e pelo profissionalismo e dedicação com que conduz o Campus.

Aos professores Celso Luís Azevedo, Ex-Diretor de Desenvolvimento de Ensino e Cláudia Colins Ex-Chefe do Departamento de Educação Profissional e ao Prof. José Barros Filho atual Diretor de Desenvolvimento de Ensino do Campus Alcântara pelas liberações das atividades docentes para realização dos experimentos da tese.

Aos queridos, Augusto Nascimento, Fernanda Gomes, Lídia Coelho, Elinete Pedrosa, Danielle Rocha, Luisa Belo, Sônia Pedroni do Instituto Federal do Maranhão - Campus Alcântara, amigos pra todas as horas, irmãos que eu escolhi ter, por esses dois anos de intenso convívio, pelo incentivo diário e pelos laços de amizade, respeito e confiança que se constroem a cada dia e que com certeza se perpetuarão até sempre.

As queridas, Gisele Amaral, Ana Lourdes Alves, Patrícia Machado, Francijony Brito, Lígia de Paula, Valéria Cardoso e demais funcionários e professores do Campus Alcântara pelos bons momentos compartilhados e experiências adquiridas.

A todos que contribuíram para esta conquista.

BIOGRAFIA

Edalton dos Reis Silva, natural de São Luis-MA, filho de Elias Costa e Silva e Ester dos Reis Silva, nasceu em 06 de fevereiro de 1975.

Em 1993 ingressou na Universidade Federal do Maranhão e em dezembro de 1998 graduou-se Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

No início do ano de 2000 ingressou no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde obteve em 2002 o Título de Mestre.

Durante o período de 1999 até 2006 permaneceu como bolsista, estagiário e colaborador do setor de Entomologia Médica e Forense, vinculado ao Laboratório de Transmissores da Leishmaniose (LTL) do Instituto Oswaldo Cruz-RJ.

Em 2006 ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 31 de março de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
3. RESULTADOS	11
Artigo 1: ULTRAESTRUTURA E CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS MASCULINAS EM QUATRO ESPÉCIES DE <i>Mischocyttarus</i> (HYMENOPTERA, VESPIDAE).	12
Artigo 2: ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES EM QUATRO ESPÉCIES EM <i>Mischocyttarus</i> (HYMENOPTERA, VESPIDAE).....	43
4. BIBLIOGRAFIA GERAL.....	66

RESUMO

SILVA, Edalton dos Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Morfologia das glândulas acessórias masculinas e dos espermatozoides em *Mischocyttarus* (Hymenoptera, Vespidae)**. Orientador: José Lino Neto. Co-orientadores: Jacenir Reis dos Santos Mallet, José Eduardo Serrão.

Glândulas acessórias e espermatozoides de espécies de *Mischocyttarus* foram submetidas a técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão convencional e citoquímica ultraestrutural. O epitélio glandular de *M. rotundicollis*, *M. injucundus*, *M. punctatus* e *M. cerberus* é simples, formado por células com núcleos arredondados a alongados com a cromatina descondensada e nucléolos evidentes. O citoplasma de *M. rotundicollis* e *M. injucundus* é rico em retículo endoplasmático rugoso com muitas cisternas dilatadas e ribossomos livres. Em *M. injucundus*, ribossomos livres e mitocôndrias também foram visualizados. Grânulos com formas, tamanhos variados e diferentes graus de eletrondensidade são vistos em *M. injucundus*, *M. rotundicollis* e *M. cerberus* bem como vesículas secretoras com material eletrondenso em seu interior em *M. injucundus*. Em *M. punctatus* foram vistos poucas vesículas secretoras no epitélio glandular. Nas quatro espécies, numerosos grânulos totalmente eletrondensos de tamanhos variados foram observados no epitélio e sendo eliminados no interior do lúmen glandular. Em células glandulares de *M. cerberus*, inúmeros grânulos compostos por carboidratos foram detectados no citoplasma das células epiteliais glandulares. O conteúdo dos grânulos de secreção demonstrou reação negativa para o teste de proteínas básicas. Vesículas secretoras presentes no citoplasma das células glandulares de *M. cerberus* se apresentaram negativas para ambos os testes citoquímicos usados, indicando ser seu conteúdo composto por substâncias químicas diferentes. Os espermatozoides *M. attramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus* e *M. punctatus* seguem o padrão dos espermatozoides dos Hymenoptera. São longos, finos, lineares, medem entre 108 µm e 137µm e a cabeça entre 11 µm e 16 µm de comprimento. Possuem acrossoma cônico, o *perforatorium* penetra numa cavidade na extremidade do núcleo. Este se apresenta eletrondenso com cromatina condensada. O axonema apresenta o padrão 9+9+2 microtúbulos. Os derivados mitocondriais de todas as espécies

em cortes transversais são assimétricos. Em direção à região posterior do flagelo, observa-se uma gradual desorganização do axonema, sendo as duplas de microtúbulos as primeiras desaparecerem, seguidas pelo par central, restando apenas os microtúbulos acessórios. Dados da morfologia e ultraestrutura das glândulas acessórias e dos espermatozoides constituem uma importante ferramenta que pode auxiliar no entendimento do processo reprodutivo das vespas sociais do gênero *Mischocyttarus* bem como em futuras análises filogenéticas.

ABSTRACT

SILVA, Edalton dos Reis, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2011. **Morphology of the male accessory glands and sperm in *Mischocyttarus* (Hymenoptera, Vespidae)**. Advisor: José Lino Neto. Co-advisor: Jacenir Reis dos Santos Mallet and José Eduardo Serrão.

Accessory glands and sperm of species *Mischocyttarus* were subjected to techniques of light microscopy, conventional transmission electron microscopy and ultrastructural cytochemistry. The glandular epithelium of *M. rotundicollis*, *M. injucundus*, *M. punctatus* and *M. cerberus* is simple, consisting of low cells with rounded to elongated nuclei with decondensed chromatin and evident nucleoli. The cytoplasm of *M. rotundicollis* and *M. injucundus* is rich in rough endoplasmic reticulum with many dilated cisterns and free ribosomes. In *M. injucundus*, free ribosomes and mitochondria were also seen. Granules with shapes, different sizes and different degrees of electron-density are seen in *M. injucundus*, *M. rotundicollis* and *M. cerberus* and secretory vesicles with material inside electron-dense *M. injucundus*. In *M. punctatus* few secretory vesicles were seen in glandular epithelium. In four species, numerous granules of varying sizes totally electron-dense were observed in the epithelium and are eliminated into the lumen of glands. In glandular cells of *M. cerberus*, numerous granules composed of carbohydrates were detected in the cytoplasm of glandular epithelial cells. The content of secretory granules showed negative reaction to the test of basic proteins, indicating that the mixed nature. Secretory vesicles in the cytoplasm of glandular cells of *M. cerberus* were negative for both cytochemical tests used, indicating that its content consists of different chemicals. Sperm *M. attramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus* and *M. punctatus* follow the pattern of the sperm of insects. They are long, thin, linear, measuring between 108 μm to 137 μm and the head between 11 μm and 16 μm in length. They have conical acrosome, the Penra perforatorium a cavity at the end of the core. This presents electron-dense with condensed chromatin. The axoneme has the 9 + 9 + 2 microtubule pattern. The mitochondrial derivatives of all species in cross-sections are asymmetric. Toward the posterior region of the flagellum, there is a gradual disorganization of the axoneme, with microtubule

pairs of the first disappear, followed by the central pair microtubules were left with just accessories. Data of morphology and ultrastructure of the accessory glands and sperm are an important tool that can help in understanding the reproductive process of the social wasps of the genus *Mischocyttarus* as well as In future phylogenetic analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Ordem Hymenoptera

Existem 115.000 espécies descritas de Hymenoptera (Sharkey, 2007). Estudos comparativos de riqueza de espécies entre regiões temperadas (Gaston 1991) e tropicais (Stork, 1991) indicam que Hymenoptera é a que possui maior riqueza entre todas as ordens.

Estimativas apontam que eles representam 10% de todas as espécies vivas, com representantes de importância econômica e ecológica (Gaston, 1991).

Esta ordem apresenta todos os níveis de comportamentos e organização social, variando desde espécies solitárias até altamente eusociais (Hanson & Gauld, 1995, Lino-Neto & Dolder, 2001).

Sua importância econômica é inquestionável, pois existem dentro dos Hymenoptera espécies que são consideradas pragas, como as formigas cortadeiras de folhas, as abelhas, que são os maiores polinizadores de plantas e ainda as vespas parasíticas, que são consideradas importantes para o controle biológico de algumas pragas (Hanson & Gauld, 1995).

São reconhecidas 80 famílias, distribuídas nas subordens “Symphyta” e Apocrita (Gauld & Hanson, 1995). Os “Symphyta” são considerados basais, contendo pouco mais que 5% das espécies descritas. Os Apocrita compreendem a grande maioria das espécies e ainda são divididos em Parasítica e Aculeata. As abelhas, formigas e vespas são classificadas como Aculeata e são caracterizadas basicamente pela presença de ferrão nas fêmeas, desenvolvido a partir de modificações do ovipositor. Aculeata é o

grupo mais derivado dentre os Hymenoptera, com 19 famílias distribuídas nas superfamílias Chrysoidea, Vespoidea e Apoidea.

1.2. A Família Vespidae e a Subfamília Polistinae

A família Vespidae é dividida em seis subfamílias: Euparaginae, Stenogastrinae, Vespinae, Masarinae, Eumeninae e Polistinae (Carpenter, 1982) onde apenas as quatro últimas ocorrem no Brasil. Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae são considerados eusociais, pois apresentam sobreposição de gerações, cuidado cooperativo da prole e uma divisão reprodutiva de trabalho dentro da colônia (Wilson, 1971)

Esta família é representada pelas vespas verdadeiras e fornece um excelente modelo para estudos de comportamentos sociais, pois apresentam uma ampla variação de sistemas de organização colonial (West-Eberhard, 1978, Nascimento et al., 2008 e Carpenter, 1991).

As vespas sociais são consideradas, junto com as abelhas, importantes insetos polinizadores que contribuem com 30% da reprodução de espécies vegetais utilizadas na alimentação humana (O'Toole, 1993).

Os Polistinae estão distribuídos em todo o mundo e possuem aproximadamente 800 espécies divididas em 28 gêneros com grande ocorrência e diversidade nas regiões Neotropicais (Carpenter, 1993).

No Brasil a subfamília Polistinae, a qual pertence o gênero *Mischocyttarus*, é a maior dentro da família Vespidae (Hanson & Gauld, 1995). Os Polistinae são particularmente importantes devido à sua distribuição cosmopolita e biodiversidade (Nascimento et al., 2008), além de apresentar uma enorme variedade comportamental e morfológica (Carpenter, 1991).

1.3. O gênero *Mischocyttarus*

Mischocyttarus (Saussure) 1853 é um gênero bem representado dentro do grupo das vespas sociais com cerca de 245 espécies descritas, a maioria ocorrendo em regiões neotropicais (Silveira, 2008). Esse grupo tem sido estudado por (Jeanne, 1970; 1972; 1980; Giannotti & Silva, 1993; Cooper, 1996a e b, Silveira, 2002; Silva, 1988) e aspectos como evolução do comportamento social, comportamento reprodutivo, organização do trabalho, desenvolvimento pós embrionário, taxonomia e filogenia, tem sido descritos.

A organização social da colônia foi descrita por Jeanne, 1980 onde se estabeleceu que as colônias são fundadas geralmente, independentemente, por uma única fêmea (haplometrose) ou um pequeno grupo de fêmeas associadas (pleometrose).

As vespas desse gênero não apresentam diferenciação morfológica entre castas, sendo a distinção apenas em nível comportamental. As espécies de vespas mais representativas, que fundam as colônias de forma independente, pertencem aos gêneros *Polistes* (Latreille) 1802 e *Mischocyttarus* (Saussure) 1853, (Nascimento et al.,2008).

Os ninhos são construídos com forma e tamanhos variados, em árvores ou em edificações humanas, possuem pedúnculo central ou lateral, sem invólucros e são de fibra vegetal; o pedúnculo pode ser mais longo que o tamanho do ninho, sempre revestido por substâncias repelentes a formigas e são sempre construídos embaixo de folhas, beirais e rochas (Nascimento et al., 2008). Tipicamente, as colônias primeiro produzem algumas fêmeas operárias e depois de algum tempo produzem machos e fêmeas não-operárias (reprodutivas). Algumas espécies, produzem machos somente em um período

relativamente curto do ano, próximo ao final do ciclo da colônia (Ross & Matthews, 1991).

Várias espécies de *Mischocyttarus* mimetizam espécies agressivas, como é o caso de *Mischocyttarus cerberus styx* que mimetiza *Agelaia pallipes*. Foi registrada a ocorrência de quinze casos de mimetismo Mulleriano envolvendo *Mischocyttarus* e espécies de *Agelaia*, *Angiopolybia*, *Parachartergus* e *Polybia*. (Richards, 1978).

1.4. O sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino dos Hymenoptera é constituído por um par de testículos contendo um ou uma série de túbulos, denominados túbulos seminíferos ou folículos testiculares, onde os espermatozoides são produzidos.

Uma prolongação fina e curta, originando-se da extremidade de cada folículo testicular, forma o canal eferente, estes se juntam em um canal comum, se abrem dentro de um vaso deferente e uma porção dilatada deste vaso é conhecida como vesícula seminal (Chapman, 1998; Matsuda, 1976; Snodgrass, 1935; Ferreira et al., 2004).

A vesícula seminal é considerada um órgão de estoque de espermatozoides no macho antes de serem transferidos para a fêmea (Chen, 1984). Os testículos são individualmente envolvidos por uma membrana peritonal ou cápsula testicular, formando uma estrutura única (Cruz-Landim, 2001).

O número de folículos testiculares variam para cada espécie de inseto. Forbes & Do-Van-Quy 1965 mostraram que em Hymenoptera, machos da formiga *Neivamyrmex harrisi* apresentam testículo com cerca de 22-25

folículos, enquanto que em *Camponotus festinatus* e *C. sayi* testículo apresenta 9 folículos e em *C. mina* 10 folículos (Wheeler e Krutzsch, 1992).

Estudos histológicos, ultraestruturais e citoquímicos das estruturas que compõem o sistema reprodutor masculino têm sido realizados em vários grupos de insetos (Forbes & Do-Van-Quy, 1965; Bairati, 1968; Louis & Kumar, 1973; Wheeler e Krutzsch, 1992; Ferreira et al., 2004; Mikheyev, 2004; Lemos et al., 2005, Freitas et al., 2007).

1.5. As Glândulas Acessórias Masculinas

As glândulas acessórias masculinas podem ser classificadas como ectadênias, as quais se abrem no ducto ejaculatório ou até mesmo como áreas incorporadas à parede do ducto ejaculatório ou mesadênias, as quais se abrem no vaso deferente ou na vesícula seminal, de acordo com a origem ectodérmica ou mesodérmica, respectivamente, (Leopold, 1976; Davey, 1985, Chapman, 1998).

São estruturas que asseguram o sucesso reprodutivo dos indivíduos, tanto facilitando a transferência, como protegendo os espermatozoides, auxiliando na mobilidade dos mesmos no trato genital feminino, servindo como substrato energético para manter a atividade dessas células, sustentando a penetração no ovo (Bairati, 1968), desempenhando outras numerosas funções.

As glândulas acessórias masculinas podem ocorrer aos pares, como na maioria das Ordens, podem estar totalmente ausentes, como em muitos Apterygota, Paleoptera e estruturas ímpares como em Dictyoptera ou estruturas multipareadas, como em Thysanoptera e Coleoptera (Leopold, 1976).

Cada glândula apresenta uma camada simples de células epiteliais e sua organização depende do estágio de desenvolvimento e da natureza da secreção produzida (Chapman, 1998).

Dípteros geralmente apresentam um par de glândulas com epitélio simples, e dois tipos de células, que são definidas como primárias e secundárias em *Drosophila melanogaster*. Em Culicidae, uma das glândulas acessórias é dividida por uma estreita constrição muscular denominadas de glândula anterior e glândula posterior, sendo esta última constituída por dois tipos distintos de células (Dapples et al., 1974; Ramalingam & Craig Jr., 1977).

As substâncias secretadas por essas glândulas são proteínas, lipídios e carboidratos (Gillott, 2003), prostaglandinas (Gillott, 1998), hormônio juvenil (Shirk et al., 1980) e possivelmente compostos tóxicos que provavelmente são importantes na proteção dos ovos (Blum & Hilker, 2002; Eisner et al., 2002).

As secreções produzidas pelas glândulas acessórias possuem várias funções, dentre elas destacam-se contribuição para o fluido seminal, ativação de espermatozoides (Davey, 1985; Chen, 1984), construção de espermatóforos para a transferência dos espermatozoides para as fêmeas (Viscuso et al., 2001); aumento da fecundidade e diminuição da receptividade sexual para novas cópulas, em insetos não sociais (Chen, 1984); contração do oviduto e oviposição (Raabe, 1986) maturação dos oócitos (Gillott, 1996; Eberhard, 1996).

Após sucessivas cópulas, as fêmeas em algumas espécies não acasalam por um variado intervalo de tempo. Esse comportamento é visto como uma rejeição ativa ao parceiro (refratariedade), ou um declínio passivo na atratividade (Gillot, 2003). Experimentos têm mostrado que, a injeção de um extrato homogêneo do tecido das glândulas acessórias masculinas, ou a

injeção dos componentes purificados destas glândulas, reduz a receptividade da fêmea para novas cópulas (Friedel & Gillot, 1977).

A refratariedade ou menor atratividade é um importante meio pelo qual, machos de muitas espécies asseguram a paternidade de pelo menos alguns descendentes, pois nesse período as fêmeas não copulam com outros parceiros. Outras estratégias podem estar envolvidas para assegurar que o macho seja bem-sucedido na cópula. Para o primeiro macho a copular, essa estratégia inclui o uso do tampão físico ou do espermatóforo, que previne a transferência de fluidos seminais adicionais, facilita o estoque do esperma e acelera a produção de ovos pela fêmea. Para o último macho a copular, a destruição ou deslocamento do esperma depositado é uma estratégia primordial (Gillot, 2003).

O líquido seminal tem um importante papel na modulação do comportamento e fisiologia das fêmeas e seu mecanismo de ação determina uma cascata de respostas que iniciam com a entrada do mesmo pela parede do aparelho reprodutor feminino indo até a hemolinfa, e alcançando o sistema nervoso central (Chen, 1984; Gillott, 1996).

1.6. Os espermatozoides

Os espermatozoides em Hymenoptera são células filiformes que medem de 8 μm (Quicke et al., 1992) a 1500 μm (Zama et al., 2005a). São constituídos por uma região de cabeça e outra de flagelo. A região de cabeça é formada, anteriormente, por um acrossomo seguido pelo núcleo.

O complexo acrossomal é, em geral, formado por uma vesícula acrossomal e um perforatório, que tem a base inserida em uma cavidade na

extremidade do núcleo. O núcleo também é longo e, geralmente, apresenta a cromatina muito eletrondensa e compacta. Este é conectado aos elementos do flagelo através de uma estrutura eletrondensa, cilíndrica e compacta, denominada adjunto do centríolo.

O flagelo, por sua vez, é formado pelo axonema, geralmente dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. O axonema apresenta padrão de organização microtubular $9 + 9 + 2$, sendo nove microtúbulos acessórios simples, nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais simples.

Os derivados mitocondriais são estruturas alongadas, paralelas ao axonema, que geralmente contém inclusões paracristalinas, podendo ou não ser iguais em diâmetro e comprimento. Os corpos acessórios também são estruturas longas, situadas entre os derivados mitocondriais e o axonema e, geralmente, possuem formato aproximadamente triangular, em corte transversal.

Morfologicamente, os espermatozoides são diversificados nos diferentes grupos que compõem a ordem Hymenoptera, e consistem em uma fonte de dados morfológicos para estudos filogenéticos, tendo seus caracteres uma natureza mais conservativa que os caracteres morfológicos usados tradicionalmente. Com isso, análises filogenéticas usando características estruturais e ultra-estruturais dos espermatozoides vêm sendo utilizada em estudos taxonômicos e filogenéticos de vários grupos animais, incluindo os insetos (Dallai & Afzelius, 1995; Jamieson *et al.*, 1999).

Jamieson (1987), afirma que a espermiocladística tem sido usada junto com a cladística morfológica e que juntas podem resolver problemas taxonômicos e filogenéticos dos insetos.

Cada vez mais tem sido demonstrado que a diversidade morfológica dos espermatozoides é suficiente para compor um sistema de caracteres que, associado a outros conjuntos de caracteres, poderá ser usado para esclarecer vários pontos de controvérsias das relações evolutivas dos Hymenoptera.

Dessa forma muitos autores defendem o uso da morfologia de espermatozoides em análises filogenéticas nas diversas ordens de insetos; (Wheeler et al., 1990; Quicke et al., 1992; Newmann & Quicke, 1999, 2000; Lino-Neto et al., 1999, 2000a e b; Lino-Neto & Dolder, 2001a e b, 2002; Zama et al., 2001, 2004, 2005a e b; Báó et al., 2004, Araújo et al., 2010).

Tendo em vista a importância das glândulas acessórias no processo reprodutivo dos insetos e o uso da morfologia dos espermatozoides para estudos filogenéticos, a caracterização ultraestrutural destas estruturas em *Mischocyttarus rotundicollis*, *M. injucundus*, *M. cerberus*, *M. punctatus* e *M. atramentarius* irá contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva dessas espécies, bem como, possibilitar o estabelecimento das relações filogenéticas entre estas espécies.

2. OBJETIVOS

- Descrever a morfologia ultraestrutural das glândulas acessórias masculinas de *M. injucundus*, *M. punctatus*, *M. rotundicollis*, *M. cerberus* e localizar carboidratos e proteínas básicas por meio de citoquímica ultraestrutural nas glândulas acessórias masculinas de *M. cerberus*.
- Descrever a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de *M. attramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus* e *M. punctatus*.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse estudo estão apresentados na forma de artigos científicos que serão submetidos a periódicos especializados.

Artigo 1:

ULTRAESTRUTURA E CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS MASCULINAS EM QUATRO ESPÉCIES DE *Mischocyttarus*. ((HYMENOPTERA, VESPIDAE).

Artigo 2:

ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES EM QUATRO ESPÉCIES DE *Mischocyttarus* (HYMENOPTERA, VESPIDAE).

**Artigo 1: ULTRAESTRUTURA E CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS
ACESSÓRIAS MASCULINAS EM QUATRO ESPÉCIES DE *Mischocyttarus*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

**ULTRAESTRUTURA E CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS
MASCULINAS EM QUATRO ESPÉCIES DE *Mischocyttarus*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

Edalton dos Reis Silva

RESUMO

Glândulas sexuais acessórias masculinas de *Mischocyttarus injucundus*, *M. punctatus*, *M. rotundicollis* e *M. cerberus* foram submetidas a técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e citoquímica ultraestrutural. Vinte machos, sendo cinco de cada espécie, foram coletados no período de julho a dezembro de 2008 na Reserva Biológica da Merck, Município de São José de Ribamar - MA e no município de Chapadinha - MA. Em todas as espécies, as glândulas apresentaram as mesmas características ultraestruturais. O epitélio glandular de *M. rotundicollis* é simples, formado por células baixas, apresentando duas regiões com aparências distintas, uma com vesículas secretoras esparsas e outra com alta densidade de vesículas secretoras. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso, com muitas cisternas dilatadas. As espécies *M. injucundus*, *M. punctatus* e *M. cerberus*, apresentam células com núcleos alongados, cromatina descondensada e nucléolos evidentes e em número variado. São vistos retículo endoplasmático rugoso, com cisternas dilatadas em *M. injucundus*, e ribossomos livres e mitocôndrias em todas as espécies. A membrana basal das glândulas acessórias nas quatro espécies é aparentemente estreita e envolta por uma camada muscular espessa. Grânulos com formas, tamanhos variados e diferentes graus de eletrondensidade são vistos em *M. injucundus*, *M. rotundicollis* e em *M. cerberus* bem como vesículas secretoras com material eletrondenso em seu interior. Em *M. punctatus* foram vistas poucas vesículas secretoras no epitélio glandular. Nas quatro espécies, numerosos grânulos totalmente eletrondensos de tamanhos variados foram observados no epitélio e sendo eliminados no interior do lúmen glandular. Entretanto, somente em *M. injucundus* podem ser vistas vesículas secretoras que se abrem para a luz da glândula, liberando a secreção contida em seu interior. Microvilosidades de tamanhos variados e junções aderentes são vistas na região apical das células glandulares em todas as espécies. Nas células das glândulas de *M. cerberus* submetidas ao teste citoquímico (Thierry), inúmeros grânulos de secreção tanto no citoplasma das células quanto no lúmen glandular apresentaram reação positiva ao teste, indicando a presença de carboidratos nos mesmos. Nas células submetidas ao teste citoquímico (EPTA) o conteúdo dos grânulos apresentou reação negativa ao teste, porém a membrana que envolve o grânulo apresentou-se PTA positiva. Algumas vesículas secretoras presentes no epitélio glandular apresentaram reação negativa para ambos os testes, permanecendo com conteúdo eletrondenso. Estes resultados mostram a importância de conhecimentos morfológicos e citoquímicos das glândulas acessórias sexuais masculinas de *Mischocyttarus*. Dados que devem ser auxiliados pelo estudo da biologia dos insetos e podem ser usados como ferramentas para esclarecer aspectos ainda obscuros concernentes à bioquímica da secreção e entendimento da fisiologia reprodução desses insetos.

Palavras-chaves: Morfologia; Epitélio; Grânulos; Vesículas secretoras.

**ULTRASTRUCTURE AND CYTOCHEMISTRY OF MALE ACCESSORY
GLANDS OF FOUR SPECIES OF *Mischocyttarus*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

Edalton dos Reis Silva

ABSTRACT

Accessory sex glands of male *Mischocyttarus injucundus*, *M. punctatus*, *M. rotundicollis* and *M. cerberus* were subjected to techniques of transmission electron microscopy and ultrastructural cytochemistry. Twenty males, five of each species were collected from July to December 2008 in the Biological Reserve of Merck, São José de Ribamar - MA and the municipality of Chapadinha - MA. In all species, the glands showed the same ultrastructural features. The glandular epithelium of *M. rotundicollis* is simple, consisting of low cells, showing two regions with distinct appearances, one with secretory vesicles and a sparse-dense secretory vesicles. The cytoplasm is rich in rough endoplasmic reticulum with many dilated cisterns. The species *M. injucundus*, *M. punctatus* and *M. cerberus*, have cells with elongated nuclei decondensed chromatin and evident nucleoli and varying number. Are seen rough endoplasmic reticulum with dilated cisterns in *M. injucundus*, and free ribosomes and mitochondria in all species. The basement membrane of the accessory glands in four species is apparently close and surrounded by a thick muscle layer. Granules with shapes, different sizes and different degrees of electron-dense are seen in *M. injucundus*, *M. rotundicollis* and *M. cerberus* and secretory vesicles electron-dense material inside. In *M. punctatus* few secretory vesicles were seen in glandular epithelium. In four species, numerous granules of varying sizes totally electron-dense were observed in the epithelium and are eliminated into the lumen of glands. However, only in *M. injucundus* secretory vesicles can be seen that open to the gland lumen, releasing the secretion contained within. Microvilli of varying sizes and adherent junctions are seen in the apical region of glandular cells in all species. In the gland cells of *M. cerberus* submitted to the cytochemical test (Thierry), numerous secretion granules in the cytoplasm of both cells and the glandular lumen showed a positive test, indicating the presence of carbohydrates in it. In cells subjected to the cytochemical test (EPTA) content of the granules showed negative reaction to the test, but the membrane surrounding the bead was presented EPTA positive. Some secretory vesicles present in the glandular epithelium reacted negatively to both tests and remained content with electron-lucent. These results show the importance of cytochemical and morphological knowledge of the accessory glands of male sexual *Mischocyttarus*. Data that must be aided by studying the biology of insects and can be used as tools to clarify aspects still unclear concerning the biochemistry of secretion and understanding of reproductive physiology of these insects.

Keywords: Morphology; Epithelium; granules, secretory vesicles.

1. INTRODUÇÃO

A ordem Hymenoptera representa uma das quatro ordens de insetos com maior diversidade biológica e número de espécies de importância econômica e ecológica (Gaston, 1991), visto que existem espécies polinizadoras, parasitas de plantas e até de outros insetos.

A superfamília Vespoidea é um grupo expressivo, com indivíduos que apresentam uma grande diversidade de comportamentos e organização social, variando desde espécies solitárias até altamente eusociais (Hanson & Gauld, 1995).

No Brasil, a subfamília Polistinae apresenta o maior número de espécies (Hanson & Gould, 1995), onde *Mischocyttarus* (Saussure) 1853 é um gênero bem representado, com 245 espécies descritas (Silveira, 2008).

Estudos sobre as diferentes características morfológicas do sistema reprodutor masculino dos insetos têm sido realizados em vários grupos (Bahadur, 1975 (Hemiptera); Wheeler & Krutzsch, 1992 (Hymenoptera); Ferreira et al., 2004 (Hymenoptera); Freitas et al., 2007 (Hemiptera). Com isso, aspectos histológicos, ultraestruturais e citoquímicos, das estruturas que compõem este sistema, têm sido estudados.

O sistema reprodutor masculino da maioria dos insetos é constituído por um par de testículos conectados ao edeago através de um par de canais deferentes. Cada testículo é formado por um número variado de folículos envolvidos pela membrana testicular e formam uma estrutura única (Cruz-Landim, 2001).

Uma prolongação fina e curta, originando-se da extremidade de cada folículo testicular, forma os canais eferentes, que se juntam em um canal

comum, o canal deferente, o qual apresenta uma dilatação em um ponto de sua extensão, formando a vesícula seminal, e um ou mais pares de glândulas acessórias (Ferreira et al., 2004).

Nos insetos, as glândulas acessórias masculinas podem ser de origem mesodérmica ou ectodérmica e se abrem no canal deferente ou no ducto ejaculatório, respectivamente (Snoodgrass, 1993; Chapman, 1998).

As secreções produzidas por essas glândulas acessórias possuem variadas funções: contribuem para composição do fluido seminal, ativação de espermatozoides (Davey, 1985; Chen, 1984) e formação do espermátóforo (South et al., 2008). Quando transferidas para as fêmeas durante a cópula, podem afetar vários aspectos da atividade reprodutiva (Gillot, 2003) como: aumento da fecundidade, diminuição da receptividade sexual para novas cópulas (Chen, 1984; Gillot, 2003), contração do oviduto, oviposição (Raabe, 1986) e maturação dos ovócitos (Gillott, 1998; Eberhard, 1996).

A secreção glandular é composta por uma variedade de moléculas bioativas, entre elas estão: proteínas, lipídios, carboidratos (Gillott, 2003) dentre outros compostos como prostaglandinas em *Lepidoptera* (Gillott, 1998), hormônio juvenil na mariposa *Hyalophora cecropia* e possivelmente em alguns mosquitos (Shirk et al., 1980) e compostos tóxicos que provavelmente são importantes na proteção dos ovos (Blum & Hilker, 2002; Eisner et al., 2002).

As glândulas acessórias masculinas dos insetos produzem proteínas e peptídeos que mostram uma considerável diversidade na sua sequência de aminoácidos quando se comparam as espécies (Radhakrishnan et al., 2009).

Apesar do elevado número de trabalhos feitos com espécies do gênero *Mischocyttarus* que abordam o estudo da biologia da nidificação e aspectos da organização social (Giannotti, 1999), dinâmica populacional,

comportamento de dominância e subordinação (Noda et al., 2001), determinação de castas (Silva, 2002); comportamento de machos (Togni & Giannotti, 2006), filogenia (Silveira, 2008), taxonomia (Silveira, 2004), dentre outros aspectos, estudos que abordem a morfologia e ultraestrutura dos órgãos que constituem o sistema reprodutor são escassos.

Levando-se em consideração a importância das glândulas acessórias no processo reprodutivo dos insetos, o objetivo deste estudo é descrever a ultraestrutura das glândulas acessórias masculinas de *Mischocyttarus injucundus*, *M. punctatus*, *M. rotundicollis* e *M. cerberus* bem como localizar a presença de carboidratos e proteínas básicas no citoplasma das células epiteliais glandulares por meio da citoquímica ultraestrutural.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados nesse trabalho, 20 machos adultos, sendo 5 indivíduos de cada uma das espécies: *M. injucundus*, *M. punctatus*, *M. rotundicollis* e *M. cerberus*, coletados em cima dos ninhos, nos meses de julho a dezembro de 2008 na Reserva Biológica da Merck, Município de São José de Ribamar, e no Município de Chapadinha, Estado do Maranhão. Para o teste citoquímico os ninhos foram levados ao laboratório e mantidos em tubos Falcon e os indivíduos utilizados na técnica do EPTA (ácido fosfotúngstico) tinham quatro dias após a emergência.

2.1. Para análises anatômica e histológica:

Os sistemas reprodutores foram dissecados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fotografados ao microscópio estereoscópio Zeiss (SPEMI 2000C). Em seguida, foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, lavados em água destilada, desidratados em série etanólica crescente de concentração e incluídos em historesina. Cortes de 2 μ m foram feitos em micrótomo automático Zeiss com navalha de vidro, corados hematoxilina-eosina e montados com Entelan. As análises e o registro fotográfico foram feitos em um microscópio Olympus BX.

2.2. Para microscopia eletrônica de transmissão:

Os insetos foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e suas glândulas acessórias isoladas. Estas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e ácido pícrico 0,2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por um período de 4-12 horas. Em seguida, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por um período de 1 hora, e na sequência desidratados em acetona em série crescente de concentração. Posteriormente, o material foi infiltrado em resina Epon, seguido de inclusão definitiva, para polimerização em estufa a 60° por 48 horas. Cortes ultrafinos de 50-80 nm foram recolhidos em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 3% em água, por 15 minutos e a seguir em citrato de chumbo 0,2% em água durante 2 minutos, para posterior observação ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol EM 1011.

2.3. Para o estudo citoquímico:

Foram realizadas técnicas para determinação de carboidratos e proteínas básicas nas glândulas acessórias apenas de *Mischocyttarus cerberus*:

2.3.1. Para detecção de Carboidratos:

Utilizamos o método do ácido periódico-tiosemicarbazida-proteinato de prata (Thiery, 1967), no qual, os tecidos foram processados de acordo com as técnicas de microscopia eletrônica convencional e a seguir após a incubação das grades contendo os cortes com ácido periódico 1%, elas foram submetidos a tiosemicarbazida 1% durante 72 horas. A seguir, procedemos à nova incubação em proteinato de prata 1%, e, após a lavagem do material, este foi analisado ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol EM 1011, sem contrastação.

2.3.2. Para detecção de Proteínas básicas:

Foi utilizado o método do EPTA (ácido fosfotúngstico), através do qual, após a fixação do material em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato, durante 2 horas à temperatura ambiente, este foi incubado em solução de ácido fosfotúngstico 2% em etanol absoluto durante 2 horas à temperatura ambiente. Após este procedimento, as amostras foram desidratadas, incluídas em Epon, cortadas no ultramicrotomo e observadas ao microscópio eletrônico Jeol EM 1011, sem contrastação.

3. RESULTADOS

Em todas as espécies, as glândulas acessórias possuem a mesma ultraestrutura; o epitélio simples é composto por células uninucleadas, assentadas sobre uma membrana basal e envolto por uma camada muscular (Fig. 1).

O epitélio glandular de *M. rotundicollis* é simples, formado por células com aparência distintas, uma com vesículas secretoras esparsas e outra com alta densidade de vesículas secretoras (Fig. 2 e 3). Nas células epiteliais da região com poucas vesículas secretoras, os núcleos são arredondados com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (Fig. 3). O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso (RER), com muitas cisternas dilatadas (Fig. 4) e ainda podem ser observados alguns grânulos de secreção eletrondensos de aspecto variável (Fig. 5 e 6). Na porção onde as células apresentam vesículas secretoras em alta densidade, os núcleos são alongados e irregulares, com a cromatina mais condensada e nucléolos evidentes (Fig. 7). O citoplasma encontra-se repleto de vesículas arredondadas de variados tamanhos (Fig. 8).

As glândulas de *M. injucundus*, *M. punctatus* e *M. cerberus* apresentam células com núcleos alongados, cromatina descondensada e nucléolos evidentes, em número variado (Fig. 9).

A membrana basal das glândulas das quatro espécies é aparentemente estreita e envolta por uma camada muscular espessa (Fig. 10). Em *M. injucundus* são vistas algumas regiões com projeções digitiformes para o interior das células e regiões eletrondensas, indicando a presença de hemidesmosomos (Fig. 11).

No citoplasma das células epiteliais das glândulas de *M. injucundus*, *M. punctatus* e *M. cerberus* são vistos retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, ribossomos livres e mitocôndrias também foram visualizadas (Fig. 12). Em *M. injucundus*, as cisternas do retículo encontram-se dilatadas e grânulos secretores de formas e tamanhos variados, foram observados sendo alguns eletrólucidos e outros com material eletrondenso em seu interior (Fig. 13). Não foram visualizadas cisternas do retículo endoplasmático dilatadas em *M. cerberus* (Fig. 14).

Nas quatro espécies, numerosos grânulos totalmente eletrondensos, de tamanhos variados, são observados no interior do epitélio e sendo eliminados no interior do lúmen glandular (Fig. 15 e 16). No epitélio glandular de *M. injucundus* podem ser vistas vesículas secretoras que se abrem para a luz da glândula liberando a secreção contida em seu interior (Fig. 17). Em *M. punctatus*, foram vistas poucas vesículas secretoras nas células glandulares (Fig. 9). Microvilosidades de tamanhos variados (Fig. 18) e junções aderentes (Fig. 19) são vistas na região apical das células glandulares em todas as espécies.

Nas glândulas acessórias de *M. cerberus* submetidas ao teste citoquímico utilizando o método do ácido periódico-tiosemicarbazida-proteinato de prata (Thiery, 1967) foram observados inúmeros grânulos de secreção eletrondensos indicando reação positiva para carboidratos, presentes tanto no interior do epitélio (Fig. 20) como no lúmen glandular (Fig. 21). As vesículas secretoras presentes no epitélio glandular, demonstraram reação negativa ao teste realizado, permanecendo com o material eletrólucido em seu interior (Fig. 20 e 21).

Nas glândulas de *M. cerberus* submetidas ao teste citoquímico EPTA (Ácido fosfotúngstico), foi possível identificar inúmeros grânulos secretores, presentes no lúmen, no epitélio da glândula e vesículas secretoras (Fig.22 e 23) que apresentaram reação negativa para proteínas básicas evidenciando em seu interior material eletrólucido.

Analisando os grânulos secretores presentes no lúmen glandular, foi possível observar que a reação negativa foi do conteúdo dos grânulos, mas que a membrana do mesmo apresentou reação positiva ao Thiery mostrando diferentes aspectos.

O conteúdo do grânulo secretor apresentou uma reação positiva ao teste para detecção de carboidratos e a membrana do mesmo apresentou reação positiva ao teste para detecção de proteínas básicas e isso indica que os grânulos presentes nas células epiteliais glandulares de *M. cerberus* são de natureza mista. (Fig. 24).

4. DISCUSSÃO

As glândulas acessórias das quatro espécies de *Mischocyttarus* apresentam um padrão semelhante ao encontrado em outras espécies de insetos. São estruturas pareadas, de origem mesodérmica, o que se evidencia pela ausência da camada de cutícula no lúmen da glândula (Leopold, 1976; Chapman, 1998).

O número, a classificação quanto à origem e o padrão de organização das estruturas que compõem o sistema reprodutor de *Mischocyttarus* são semelhantes a outros Hymenoptera como: abelhas dos gêneros *Centris*, *Bombus*, *Xylocopa* (Ferreira et al., 2005), *Colletes rufipes*, *Coelioxys pirata*,

Mesophia friesei (família Apidae) e de vespas como *Ancistrocerus antílope* (Bushrow et al., 2006), entre outros.

A ultraestrutura geral das glândulas acessórias de *Mischocyttarus* é composta de um epitélio glandular formado por células uninucleadas, assentado sobre uma membrana basal circundado por uma camada muscular e um lúmen central onde a secreção é depositada. Esse padrão é semelhante ao de outros insetos como: espécies de *Triatoma* (Freitas et al., 2010), *Tenebrio molitor* (Gerber, 1976), espécies de lepidoptera (Brits, 1978), *Bolivarus siculus* (Tettigonidae) (Marchini et al., 2009), *Bactrocera tryoni* (Tephritidae) (Radhakrishnan et al., 2009).

A camada muscular que envolve a glândula acessória é evidente nas quatro espécies estudadas. Segundo Radhakrishnan et al., (2009), o fato das glândulas acessórias apresentarem uma camada muscular na sua parede, sugerem que os machos exercem controle não só sobre a produção mas também sobre a transferência da secreção produzida. Camadas musculares desenvolvidas e grande inervação também foram observadas na parede das glândulas dos machos de *Apis mellífera* (Cruz-Landim & Dallacqua, 2005).

A existência de regiões distintas no epitélio de glândulas acessórias, como visualizado em *M. rotundicollis*, também foi observada em dípteros (Perotti, 1971; Marchini et al., 2009). Essa característica morfológica, segundo os autores, pode estar relacionada com aspectos distintivos das secreções e a natureza química das mesmas.

A presença de retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e muitas vesículas secretoras no citoplasma das células e no lúmen glandular de *M. rotundicollis*, *M. injucundus* e *M. cerberus* indicam uma intensa atividade secretora, sugerindo que os indivíduos já haviam atingido a maturidade sexual,

estando aptos para a cópula. De acordo com Freitas et al., 2010, Radhakrishnan et al., 2009, a presença de retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, mitocôndrias e aparelho de Golgi no citoplasma de células epiteliais glandulares indica intensa atividade de síntese e secreção de substâncias.

No citoplasma das células glandulares das espécies estudadas não foi visualizado aparelho de Golgi.

A presença de poucas de vesículas secretoras e a presença de retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido nas glândulas acessórias de *M. punctatus* podem indicar uma possível redução da atividade secretora ou imaturidade sexual conforme observado por Marchini et al., 2009 em *Bolivarius siculus* (Orthoptera, Tettigoniidae). Estes autores sugerem que a presença de células destituídas ou com organelas reduzidas nas glândulas acessórias indica o final do ciclo secretor das mesmas.

Essa característica também pode estar associada à idade do indivíduo, uma vez que estudos de Cruz-Landim & Dallacqua, 2005 sobre o aspecto ultraestrutural da glândula acessória de *Apis mellifera*, descreveram que a secreção contida em vesículas secretoras no citoplasma celular não era visualizada no lúmen da glândula de machos com dois dias de idade, enquanto que uma grande quantidade de secreção foi observada no lúmen glandular dos machos com quinze dias de idade. Diante disso, os autores concluíram que toda a secreção presente no lúmen fora produzida antes da maturação sexual e estaria disponível para uso na vida adulta. Isso se justifica pela inativação da glândula acessória nesta fase, uma vez que o macho perde a genitália durante a cópula e depois morre.

Dados obtidos por Freitas et al. (2007), em glândulas acessórias de *Triatoma rubrofasciata* (Hemiptera, Triatominae), indicam que a atividade secretora independe do estado nutricional do inseto, porém se mostra diferenciada de acordo com a idade do mesmo. Indivíduos com um dia de idade apresentam pouco retículo endoplasmático rugoso e poucos grânulos secretores no citoplasma das células epiteliais das glândulas, enquanto os indivíduos com três e cinco dias após a muda imaginal, apresentaram epitélio glandular repleto de retículo endoplasmático rugoso e de grânulos sendo secretados para o lúmen. Isso reforça a importância de um estudo temporal, pois embora os insetos sejam adultos, o tempo após a muda pode ser um fator relevante.

Em *M. punctatus* eclodidos no laboratório a vesícula seminal só esteve cheia de espermatozoides e a glândula acessória por sua vez, cheia de secreções, a partir do terceiro dia de vida adulta. O enchimento da vesícula seminal deve ser acompanhado do desenvolvimento das glândulas acessórias, o que indica que o indivíduo está pronto para a cópula quando tem espermatozoides maduros, grande quantidade de secreções das glândulas acessórias. Isso pode explicar a ausência de vesículas secretoras e retículo endoplasmático rugoso desenvolvido no epitélio glandular de *M. punctatus* pois os indivíduos utilizados no trabalho, foram coletados diretamente no campo, não sendo possível determinar a idade dos mesmos, e as glândulas ainda em desenvolvimento.

A presença de numerosos grânulos regularmente distribuídos, com aspecto regular e alta eletrondensidade, tanto no lúmen quanto no citoplasma das células das glândulas acessórias das quatro espécies, sugere que eles sejam de natureza lipídica. Marchini et al. (2009) encontraram grânulos

eletrondensos semelhantes, também localizados aleatoriamente no epitélio e no lúmen das glândulas acessórias tubulares de *Bolivarius siculus* (Orthoptera, Tettigoniidae). De acordo com os autores, a natureza específica desses grânulos secretores não é bem conhecida, porém sugerem que as proteínas sejam os maiores e mais importantes constituintes das secreções das glândulas, devido à abundância de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi no epitélio de todas as glândulas estudadas.

Segundo Leopold (1976) a secreção produzida e secretada pelas glândulas acessórias são formadas provavelmente por um misto de substâncias heterogêneas e complexas. Odhiambo (1969a e b) identificou nove secreções distintas nas glândulas acessórias masculinas do gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria*, de forma semelhante nas células glandulares do coleóptero *Lytta nuttalli*, foram identificadas oito secreções diferentes nos três pares de glândulas acessórias (Gerber et al., 1971).

Em muitos insetos, as glândulas acessórias produzem lipídios que são transferidos para a fêmea durante a cópula juntamente com proteínas e carboidratos, afetando sua fisiologia, (Blum et al., 1962; Butterworth, 1969; Hinton, 1974; Friedel e Gillot, 1977; Paemen et al., 1990; Adams, 2001; Marchini, et al., 2003).

O modo de liberação da secreção das glândulas acessórias estudadas pode ser merócrino-apócrino, onde ocorre somente a liberação do produto de secreção, através de vesículas secretoras bem como a liberação da secreção juntamente com porções do citoplasma apical das células.

Em *M. rotundicollis*, *M. punctatus* e em *M. cerberus*, foi observada a liberação do tipo apócrina sendo possível observar no lúmen, além de grânulos secretores, partes do citoplasma apical da célula. Esse modo de secreção

também foi observado em *Aedes triseriatus* (Diptera, Culicidae) por Ramalingam e Craig, 1977. Em *M. injucundus*, provavelmente a secreção liberada é do tipo merócrina, pois foram visualizadas vesículas secretoras se abrindo no lúmen glandular.

Noirot & Quenedey (1974) afirmam que secreções glandulares podem ser acumuladas em grandes cisternas extracelulares, antes de serem lançadas no lúmen glandular. Segundo Marchini et al., 2009 secreções eletrólucidas alcançam o lúmen glandular por atividade apócrina, através da dilatação do ápice da célula. Esse modo de secreção também foi visto em células de glândulas acessórias mesodermis dos Dipteras *Ceratitis capitata* e *Bactrocera oleae* (Marchini et al., 2003; Marchini & Del Bene, 2006).

Chen (1984), descreveu dois tipos celulares nas glândulas acessórias de *D. melanogaster* e em ambos os tipos o modo de secreção merócrino foi observado, visto que glândulas acessórias de machos virgens obtiveram seus picos máximos de acúmulo de secreção depois de sete dias após a eclosão e após esse tempo não foram observadas nenhuma vacuolização ou desintegração dos componentes celulares. (Strömnaes & Kvelland, 1962). Já Dapples et al., 1974 estudando glândulas acessórias de *Aedes aegypti*, constatou presença de secreção apócrina para dois tipos celulares encontrados nas glândulas acessórias. Ramalingam & Craig, 1977, definiram o modo de secreção das glândulas acessórias de *Aedes triseiratus* como macroapócrino.

Há muito, já está estabelecido que os principais componentes secretados pelas glândulas acessórias dos insetos são carboidratos, proteínas e lipídios (Gillott, 2003). Proteínas e carboidratos já foram identificados em glândulas acessórias de Orthoptera (Odhiambo, 1969a), Hemiptera (Davey, 1958), Coleoptera (Landa, 1960), Lepidoptera (Thibout, 1971), Hymenoptera

(Jeantet, 1972) e Diptera (Leopold, 1970). Freitas, et al., 2010 localizaram ultraestruturalmente carboidratos e proteínas básicas no citoplasma de *Triatoma brasiliensis* e *T. melânica*. Os autores concluíram que essas substâncias presentes nas secreções de glândulas acessórias tubulares desses triatomíneos, são produzidas no início da vida adulta dos mesmos em momentos diferentes e independe do estado nutricional dos indivíduos.

Dados obtidos neste estudo para *M. cerberus* também indicam após os testes citoquímicos para detecção de carboidratos e proteínas básicas a presença de grânulos secretores positivos para ambos testes no citoplasma das células. Os resultados indicam a presença de grânulos de natureza mista. Esses dados corroboram com os resultados obtidos pela maioria dos estudos realizados onde os autores concluíram que carboidratos e proteínas, ocorrem de forma conjugada, como muco ou glicoproteínas.

Marchini, et al., 2003, realizando o teste citoquímico, Thierry 1967, para detecção de carboidratos, identificaram a presença de carboidratos nas glândulas tubulares mesodérmicas, de *Ceratitidis capitata*. Os testes evidenciaram grânulos positivos que os autores classificaram como polissacarídeos, presentes tanto no citoplasma das células como no ápice das microvilosidades.

Vesículas secretoras eletrólucidas, portanto negativas para ambos os testes realizados, estiveram presentes no citoplasma das células. A mesma situação foi observada em Triatomíneos (Freitas et al., 2010) e isso comprova a presença de mais substâncias presentes nessas vesículas que ainda precisam ser identificadas e quantificadas.

Em conclusão, nossos resultados mostram a importância de conhecimentos morfológicos e citoquímicos das glândulas acessórias sexuais

masculinas de *Mischocyttarus*. Dados que devem ser auxiliados pelo estudo da biologia dos insetos e podem ser usados como ferramentas para esclarecer aspectos ainda obscuros concernentes à bioquímica da secreção e entendimento da fisiologia reprodução desses insetos.

5. AGRADECIMENTOS

À Plataforma de Microscopia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo uso do microscópio eletrônico de transmissão, aos técnicos Adalberto José da Silva e Rômulo Custódio de Souza pelo apoio no processamento das amostras e auxílio no manuseio do microscópio, ao Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi, pela identificação das espécies e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, T. S. 2001. Morphology of the internal reproductive system of the male and female two-spotted stink bug, *Perillus bioculatus* (F) (Heteroptera, Pentatomidae) and the transfer of products during mating. *Invert Reprod Develop* 39:45-53.
- Bahadur, J. 1975. Histology of the male reproductive organs of a bug, *Halys de,tata* F. (Hemiptera, Pentatomidae). *Zool Pool* 24: 311-318.
- Blum, M. S., Glowska, Z., Taber, S. 1962. Chemistry of the drone honey bee reproductive system. II: carbohydrates in the reproductive organs and semen. *Ann Entomol Soc Am* 55: 135-139.
- Blum, M. S., Hilker, M. 2002. Chemical protection of insect eggs. In Hilker M., Meiners T. (Ed), *Chemoecology of insect eggs and eggs deposition*. Blackwell, Berlin. pp. 61-90.
- Brits, J. A. 1978. The structure and physiology of the male reproductive system of *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Afr Entomol* 41:285–296.
- Bushrow, E. S.; Fuller, C. L.; Cowan, D. P. and Byrd, C. A. 2006. Anatomy of the male reproductive system and sperm morphology in the caterpillar-hunting wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera, Vespidae). *Invertebrate Biology* 125(4): 354–362.
- Butterworth, F. M. 1969. Lipids of *Drosophila*: a newly detected lipid in the male. *Science* 163: 1356-1357.
- Chapman, R.F. 1998. *Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Chen, O. S. 1984. The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Annu Rev Entomol* 29: 233-255.
- Cruz-Landim, C. 2001. Organization of the cysts in bees (Hymenoptera, Apidae) testis: Number of spermatozoa per cyst. *Iheringia Ser Zool* 91: 183-189.
- Cruz-Landim C., Dallacqua, R. P. 2005. Morphology and protein patterns of honey bee drone accessory glands. *Gen Mol Res* 4: 473–481.
- Dapples, C. C., Foster, W. A., Lea, A. O. 1974. Ultrastructure of the accessory gland of the male mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 3:279-91.
- Davey, K. G. 1958. The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus* Stal. *J. Exp. Biol.* 35:694-701.
- Davey, K. G. 1985. The male reproductive tract. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. I. Pergamon Press, Oxford, pp. 1–14.
- Eberhard, W. G. 1996. *Female control, Sexual Selection by Cryptic Female Choice*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Eisner, T., Rossini, C., González, A., Iyengar, V. K., Siegler, M. V. S., Smedley, S. R. 2002 Paternal investment in egg defense, in: Hilker, M., Meiners, T. (Ed), *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*, Blackwell, Berlin, pp. 91–116.
- Ferreira, A., Abdalla, F. C., Kerr, W. E., Cruz-Landim, C. 2004. Comparative study of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neo Entomol* 33: 569-578.
- Ferreira, A., Abdalla, F. C., Kerr, W. E. and Cruz-Landim, C. 2005. Systematics, Morphology and Physiology. *Comparative Anatomy of the Male*

- Reproductive Internal Organs of 51 Species of Bees. *Neotropical Entomology* 33(5):569-576.
- Freitas, S. P.C, Gonçalves, T. C. M., Serrão, J. E., Santos-Mallet, J. R. 2007. Fine structure of the male accessory glands of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Triatominae). *Microsc Res Tech* 70: 355-360.
- Freitas, S. P. C., Gonçalves, T. C. M., Serrão, J. E., Costa, J. and Santos-Mallet, J. R. 2010. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron* 41: 518–525.
- Friedel, T., Gillot, C, 1977. Contribution of male produced proteins to vitellogenesis in *Melanoplus sanguinipes*. *J Insect Physiol* 22:145-151.
- Gaston, K. J. 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conserv Biol* 5: 283–296.
- Gerber, G. H., Church, N. S., Rempel, J. G. 1971. The anatomy, histology and physiology of the reproductive system of *Lytta nuttali*. *Can. 1. Zool.* 49: 523-33.
- Gerber, G. H. 1976. Reproductive behaviour and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). III. Histogenetic changes in the internal genitalia, mesenteron, and cuticle during sexual maturation. *Can J Zool* 54:990–1002.
- Giannotti, E. 1999. Social organization of eusocial wasp *Mischocyttarus Cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* v.33, n.3. P. 325-337.
- Gillott, C. 1998. Arthropoda - Insecta. In: Adiyodi KG, Adiyodi RG (Eds) *Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. 3. Wiley, New York, pp. 319-371.

- Gillott, C. 2003. Male accessory gland secretion: modulation of female reproductive physiology and behavior. *Annu Rev Entomol* 48: 163-218.
- Hanson, P.E., Gauld, I. D. 1995. *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford Science Publication, London. 893p.
- Hinton, H. E. 1974. Accessory function of seminal fluid. *J Med Entomol* 11: 19-25.
- Jeantet, A. Y. 1972. Données cytophysiologiques sur les glandes génitales mâles de *Formica polyctena*. *Ann. Soc. Sci. Nat.* 14:285-303.
- Landa, V. 1960. Origin, development and function of the spermatophore in cockchafer (*Melolontha melolontha* L.). *Acta Soc. Entomol. Gech.* 57:297-316.
- Leopold, R. A. 1970. Cytological and cytochemical studies on the ejaculatory duct and accessory secretions in *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* 16: 1859-72.
- Leopold, R. 1976. The role of male accessory glands in insect reproduction. *Ann Rev Entomol* 21: 199–221.
- Marchini, D., Del Bene, G., Cappeli, L. and Dallai, R. 2003. Ultrastructure of the male reproductive accessory in the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) and preliminary characterization of their secretions. *Arthrop Struct Develop* 31: 313-327.
- Marchini, D., and Del Bene, G. 2006. Comparative fine structural analysis of the male reproductive accessory glands in *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Ital J Zool* 73:15–25.
- Marchini, D., Brundo, M. V., Sottile, L. and Viscuso, R. 2009. Structure of Male Accessory Glands of *Bolivarius siculus* (Fischer) (Orthoptera,

- Tettigoniidae) and Protein Analysis of Their Secretions. *J Morphol* 270:880–891.
- Noda, S. C. M., Silva, E. R. & Giannotti, E. 2001. Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology*, v.38, n.3B, p. 603-614.
- Noirot C, Quennedey A. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annu Rev Entomol* 19:61–80.
- Odhiambo, T. R. 1969a. The architecture of the accessory reproductive glands of the male desert locust. I. Types of glands and their secretions. *Tissue Cell* 1: 1 55-82
- Odhiambo, T. R. 1969b. The architecture of the accessory reproductive glands of the desert locust. IV. Fine structure of the glandular epithelium. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 256: 85- 114.
- Paemen, L., Schoofs, L., De Loof, A. 1990. Presence of myotropic peptides in the male accessory reproductive glands of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 36: 861-867.
- Perotti, M. E. 1971. Microtubules as components of *Drosophila* male paragonia secretion. An electron microscopic study, with enzymatic test. *J Submicrosc Cytol* 3:255–282.
- Raabe, M. 1986. Insect reproduction: regulation of successive steps. *Adv Insect Physiol* 19: 29–154.
- Radhakrishnan, P., Marchini, D., Taylor, P. W. 2009. Ultrastructure of male reproductive accessory glands and ejaculatory duct in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Arthrop Struc Develop* 38: 216–226.

- Ramalingam, S. and Craig Jr., G. B. 1977. Fine structure of the male accessory gland in *Aedes triseriatus*. *J Insect Physiol* 24: 251-259.
- Silva, I. M. 2002. Determinação de castas em *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini) sob a perspectiva nutricional. 2002. 36f., *Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas)* - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Silveira, O. T. 2004. The male of *Mischocyttarus nomurae* Richards, with a re-examination of the limits and contents of the *M. cerberus* species group (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae, Mischocyttarini). *Revista Brasileira de Entomologia* 48(3): 335-338.
- Silveira, O. T. 2008. Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Rev Brasil Entomol* 52: 510-549.
- Shirk, P. D., Bhaskaran, G., Roller, H. 1980. The transfer of juvenile hormone from male to female during mating in the cecropia silkworm. *Experientia* 36: 682-683.
- Snodgrass, R. E. 1935. *Principles of Insect Morphology*. McGraw-Hill Book Company, New York and London.
- South, A., Sota, T., Abe, N., Yuma, M., Lewis, S. M. 2008. The production and transfer of spermatophores in three Asian species of *Luciola* fireflies. *J Insect Phys* 54: 861-866.
- Strömnaes, O. and Kvelland, I. 1962. Sexual activity of *Drosophila melanogaster* males. *Hereditas* 48:442-70.

- Thibout, E. 1971 . Description de J'appareil genital male et formation du spermatophore chez *Acrolepia assectella*. *CR Acad. Sci. Paris* 273:2546-49.
- Thiery, J. P. 1967. Mise en evidence des polysacharides sur coupes fines in microscopie életronique. *J Microsc* 6: 987-1018.
- Togni, O. C. and Giannotti, E. 2006. Male behavior of *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae) during attacks on the nest by ants. *Sociobiology, Chico*, v. 48, n. 2, p. 553-558.
- Wheeler, D. E., Kruttsch, P. H 1992. Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae). *J Morphol* 211: 307-317.

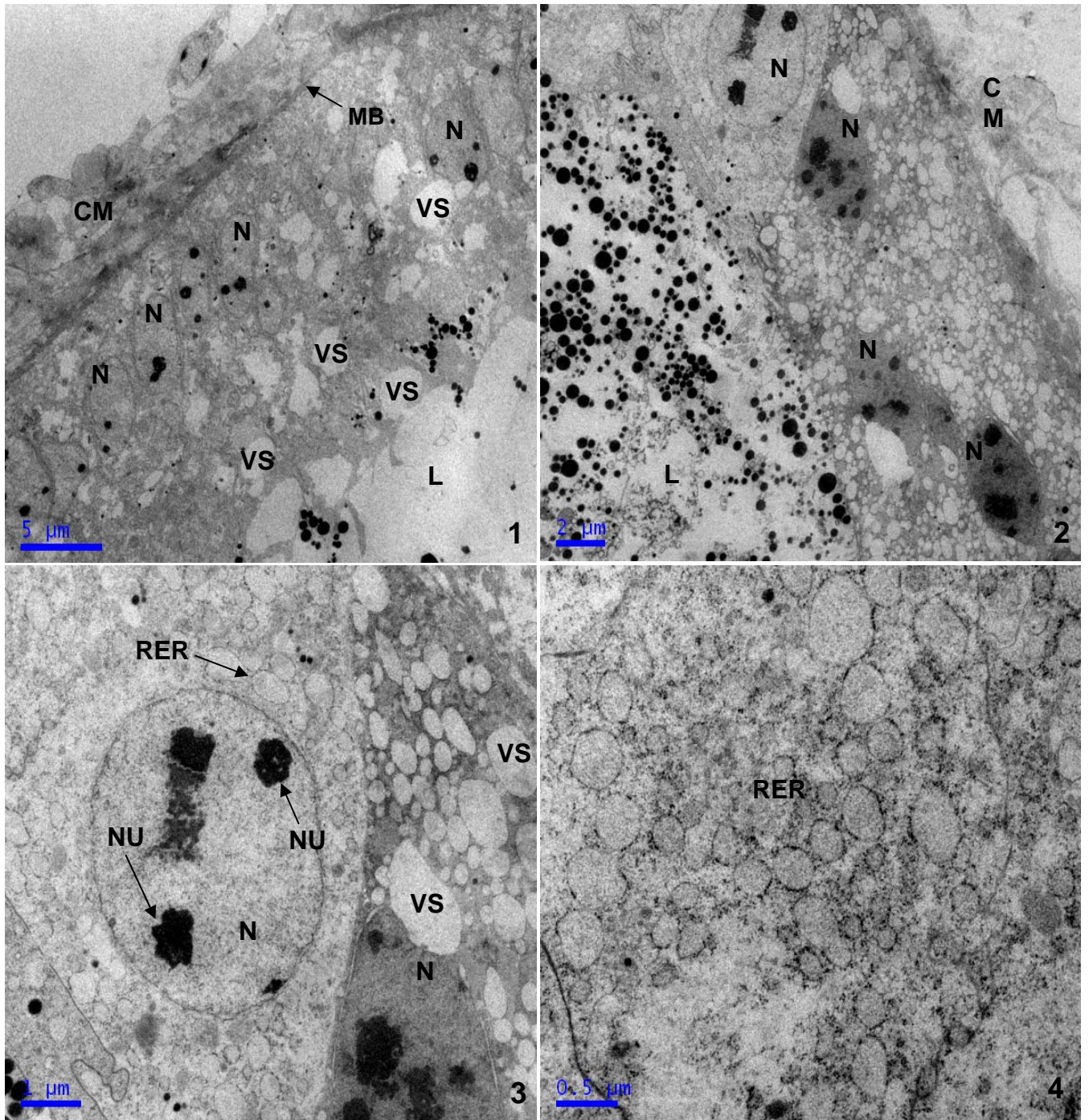


Fig. 1 e 2: Micrografia das glândulas acessórias masculinas de *Mischocyttarus*. Epitélio glandular de *M. injucundus* (1) e de *M. rotundicollis* (2). Camada muscular (CM); Vesículas secretoras (VS); lúmen (L); membrana basal (MB); núcleo (N). Fig. 3 e 4: Micrografia das glândulas acessórias masculinas de *M. rotundicollis*. (3) Epitélio glandular mostrando as diferentes regiões das células. (4) Região do citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (RER). Vesículas secretoras (VS); núcleo (N); nucléolo (Nu).

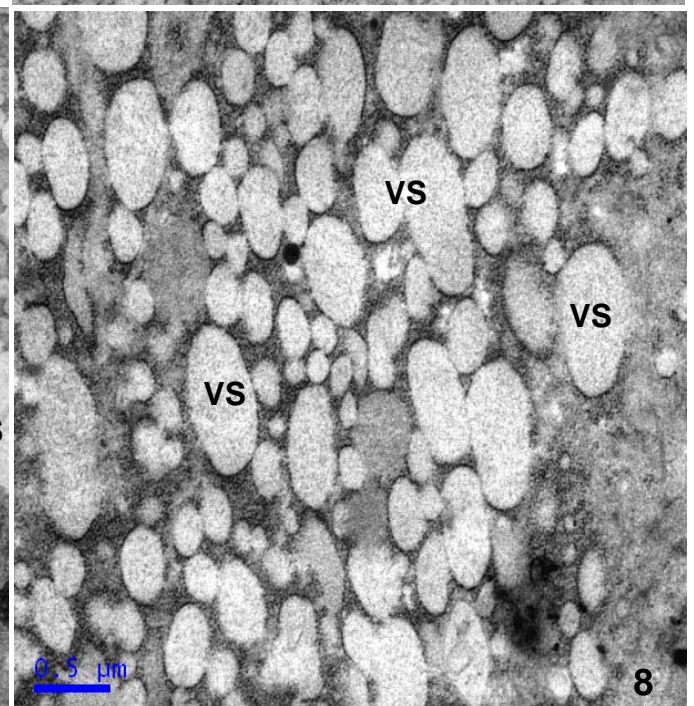
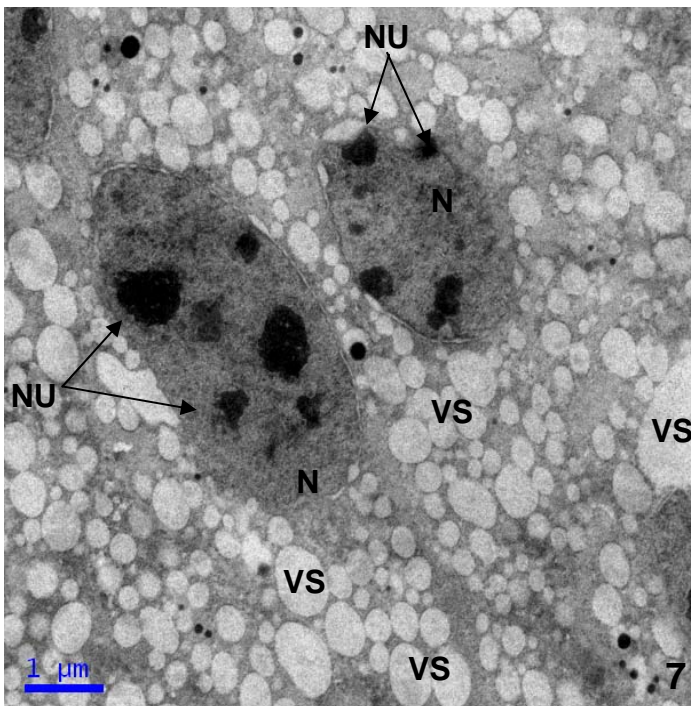
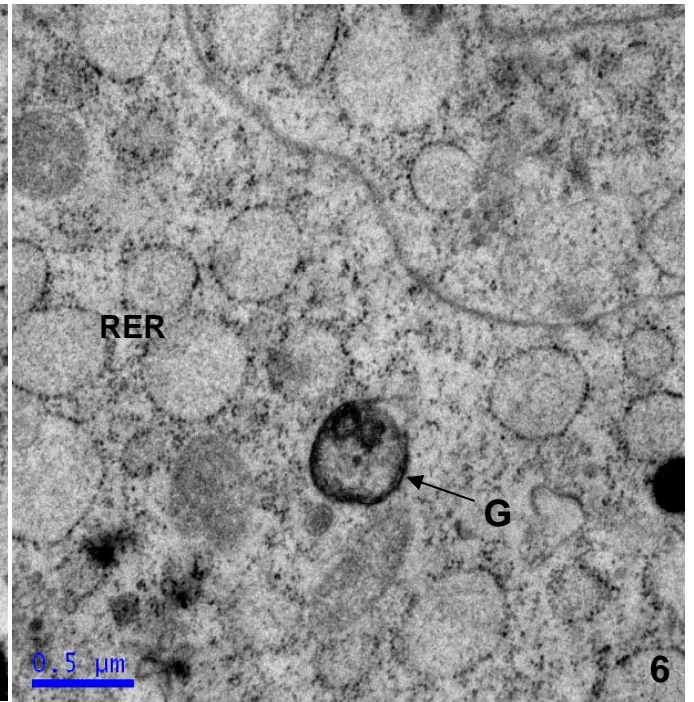
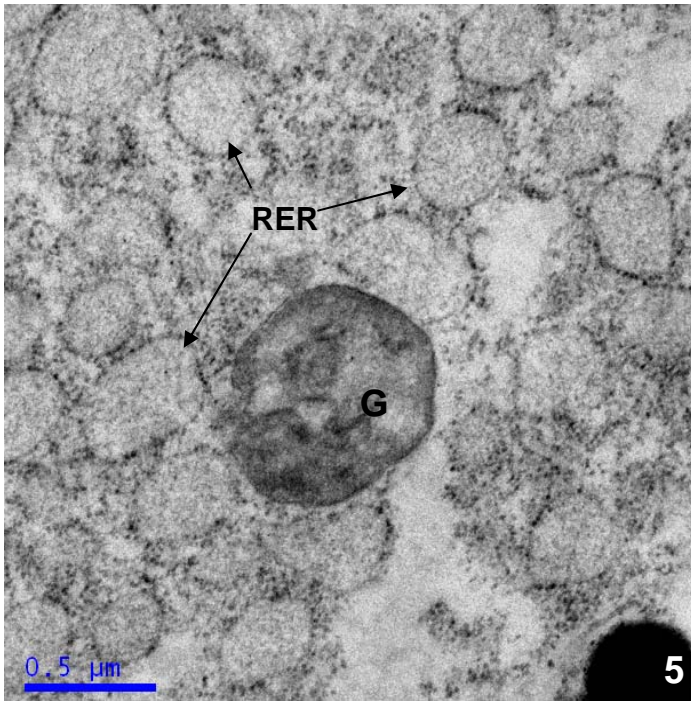


Fig. 5 a 8: Micrografia dos grânulos no citoplasma das glândulas acessórias masculinas de *M. rotundicollis*. (5 e 6) Grânulos secretores (G); cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER). (7) Epitélio glandular de uma célula. (8) Região do citoplasma rica em vesículas secretoras (VS). Núcleo (N); nucléolo (Nu).

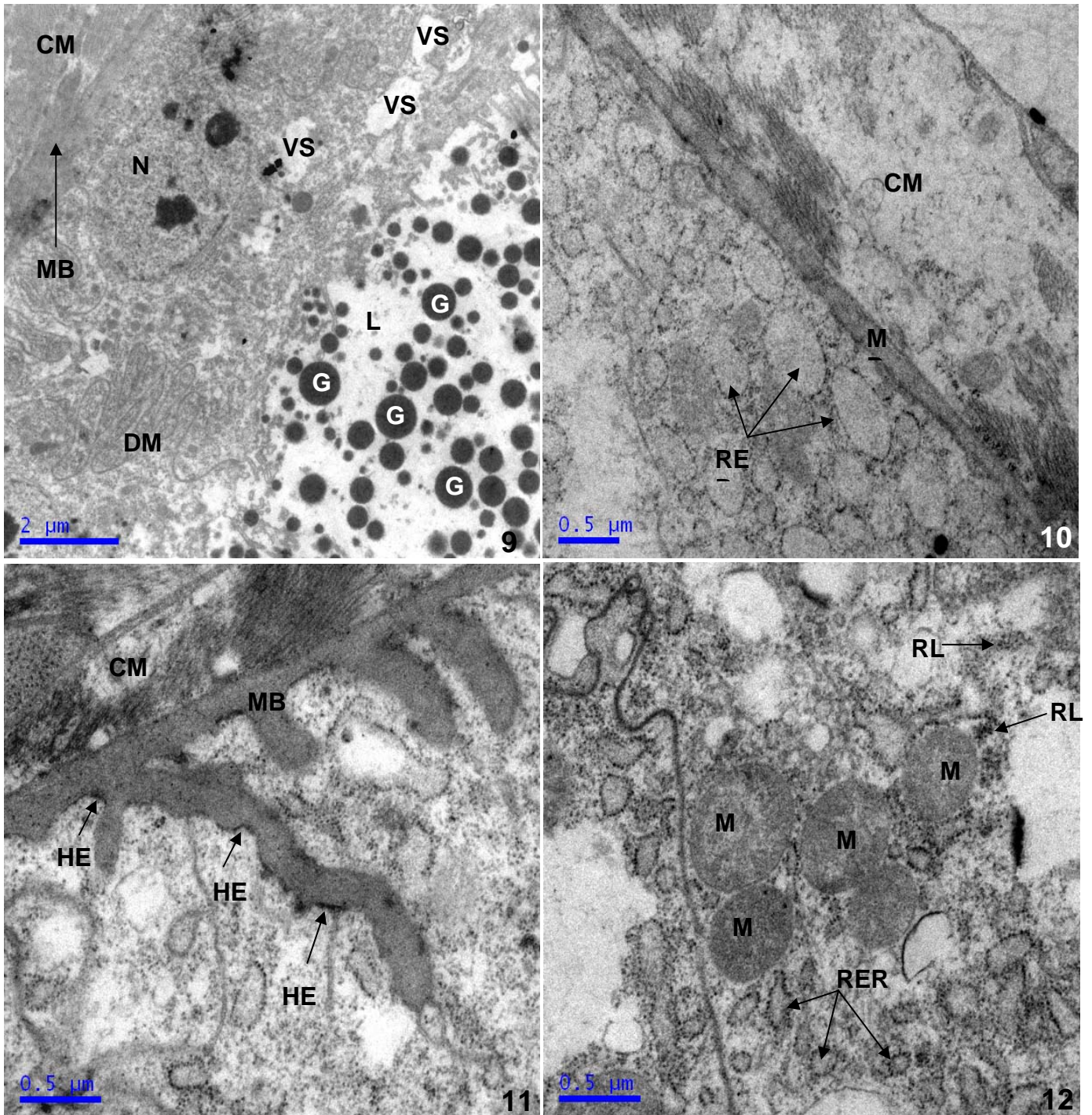


Fig. 9 e 10: Micrografia da porção basal do epitélio glandular de *Mischocyttarus*. (9) Núcleos de células epiteliais *M. punctatus*. (10) Membrana basal de *M. rotundicollis*. Camada muscular (CM); dobras da membrana (DM); grânulos secretores (G); lúmen (L); membrana basal (MB); núcleo (N); nucléolo (Nu); cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER). Fig. 11 e 12: Micrografia das glândulas acessórias masculinas de *M. injucundus*. (11) Detalhe da membrana basal (MB) Camada muscular (CM); hemidesmosmosos (HE). (12) Citoplasma de uma célula glandular. mitocôndrias (M); retículo endoplasmático rugoso (RER), ribossomos livres (RL).

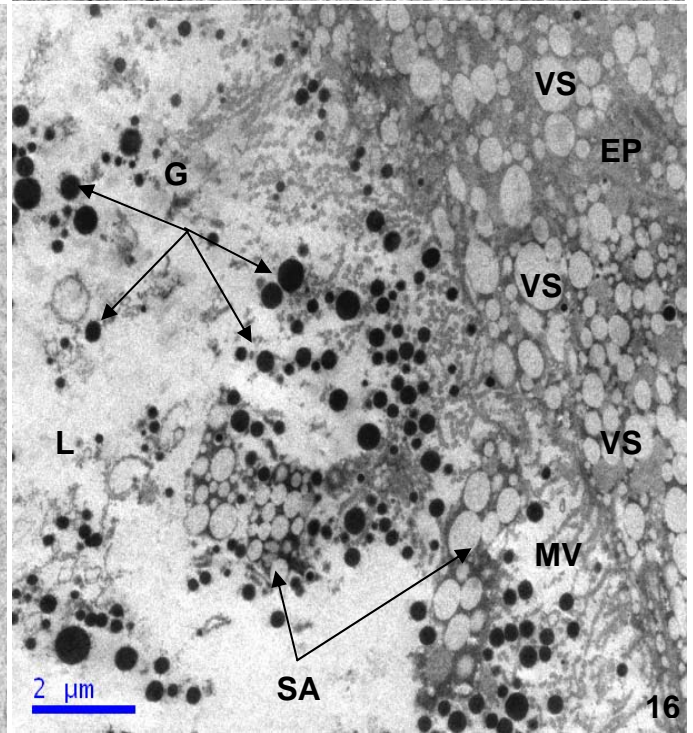
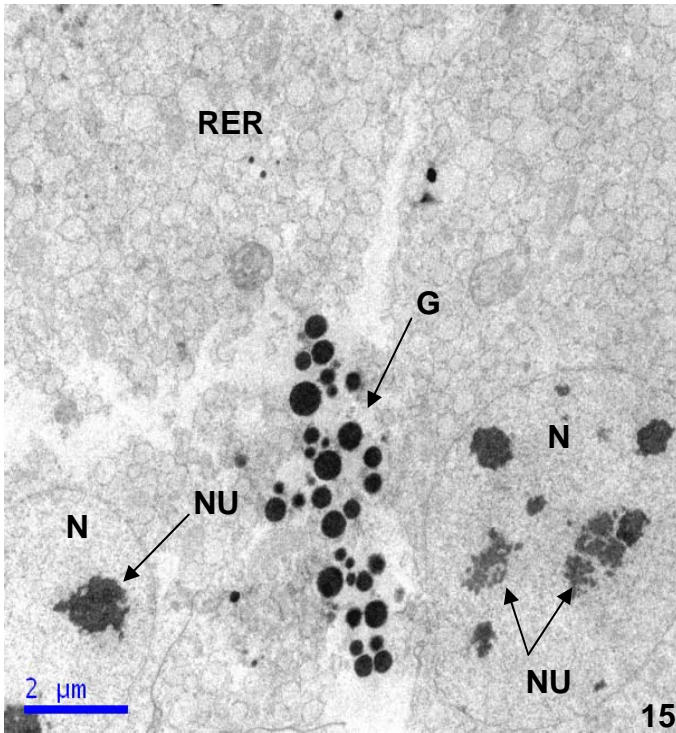
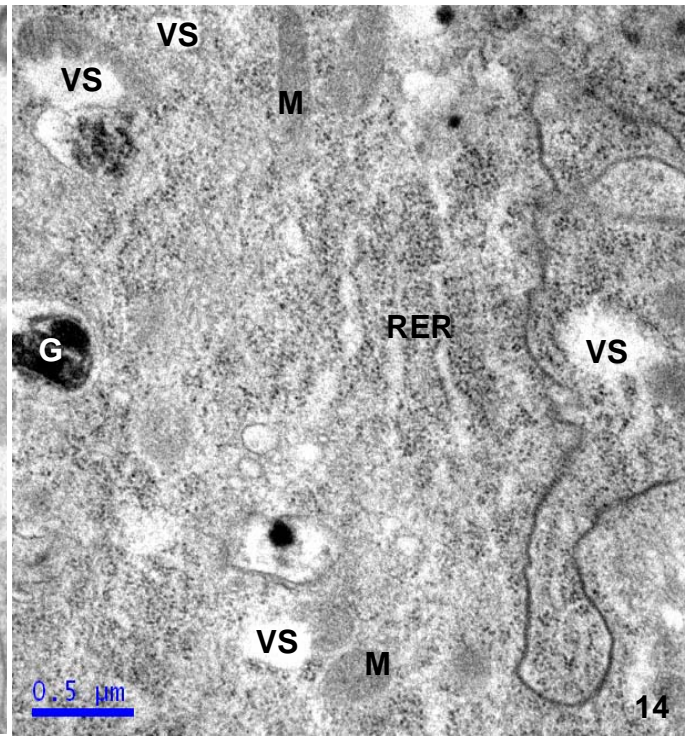
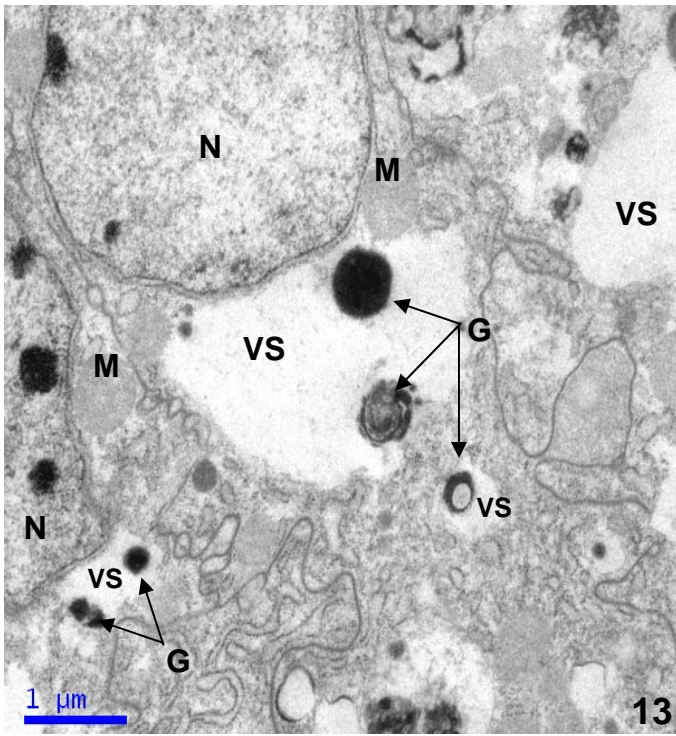


Fig.13. Vesícula secretora (VS) de *M. injucundus* com grânulos secretores (G) eletrondensos; mitocôndria (M).

Fig.14. Citoplasma de uma célula glandular de *M. cerberus*; grânulo de secreção (G); mitocôndria (M); retículo endoplasmático rugoso (RER); vesícula secretora (VS).

Fig.15. Detalhe dos grânulos eletrondensos de *M. rotundicollis* (G). Grânulo secretor (G); mitocôndria (M); núcleo (N); nucléolos (NU); cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER).

Fig.16. Secreção glandular tipo apócrina (SA) de *M. rotundicollis*; vesícula secretora (VS); grânulos secretores (G).

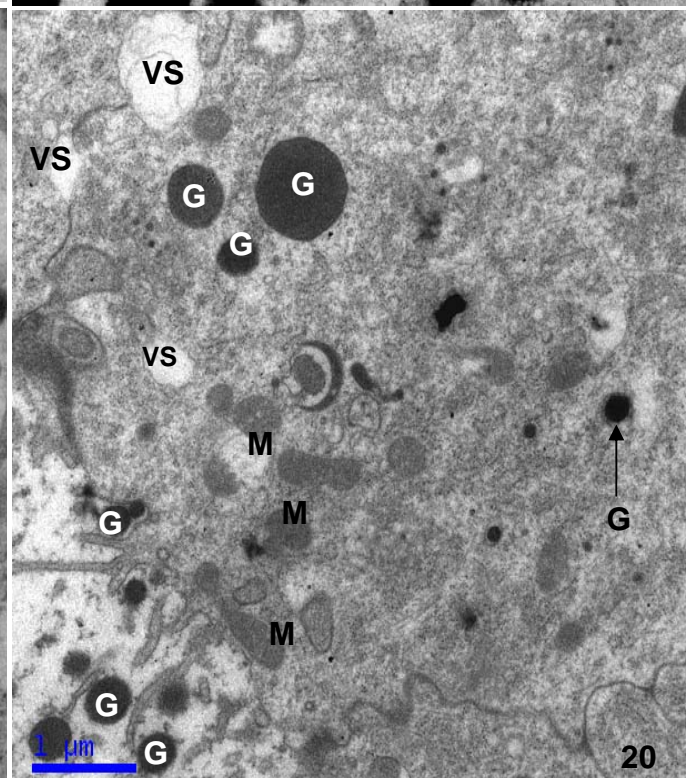
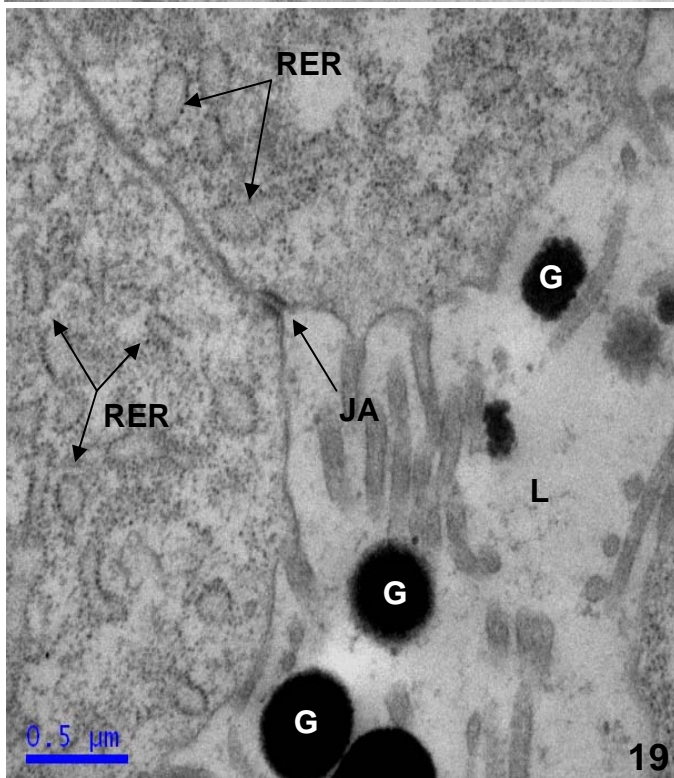
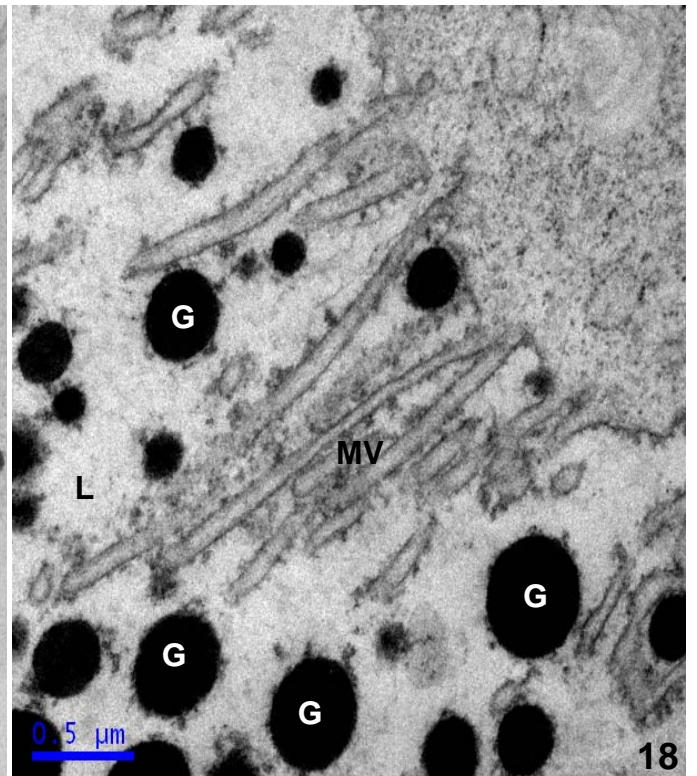
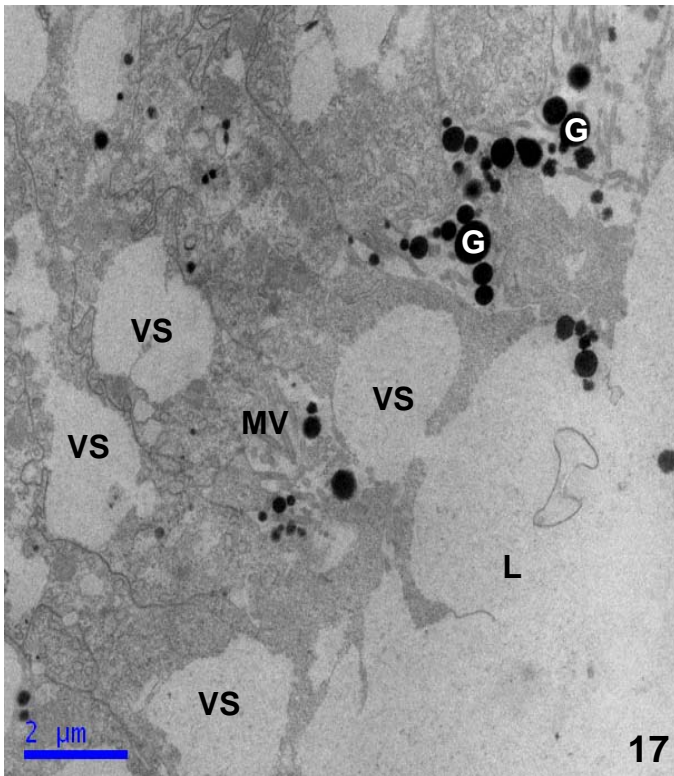


Fig.17. Vesículas secretoras de *M. injucundus*. Epitélio glandular (EP); grânulos secretores (G); lúmen (L); microvilosidades (Mv); vesícula secretora (VS).

Fig.18 e 19: (17) Microvilosidades células glandulares de *M. rotundicollis*. (18) Junção aderente de *M. injucundus* (JA).

Fig.20. Glândula acessória de *M. cerberus*, submetida à técnica do ácido periódico-tiosemicarbazida-proteinato de prata. Citoplasma de uma célula glandular com grânulos secretores eletrondensos indicando reação positiva (G); mitocôndria (M); vesículas secretoras com material elentrolucente (VS).

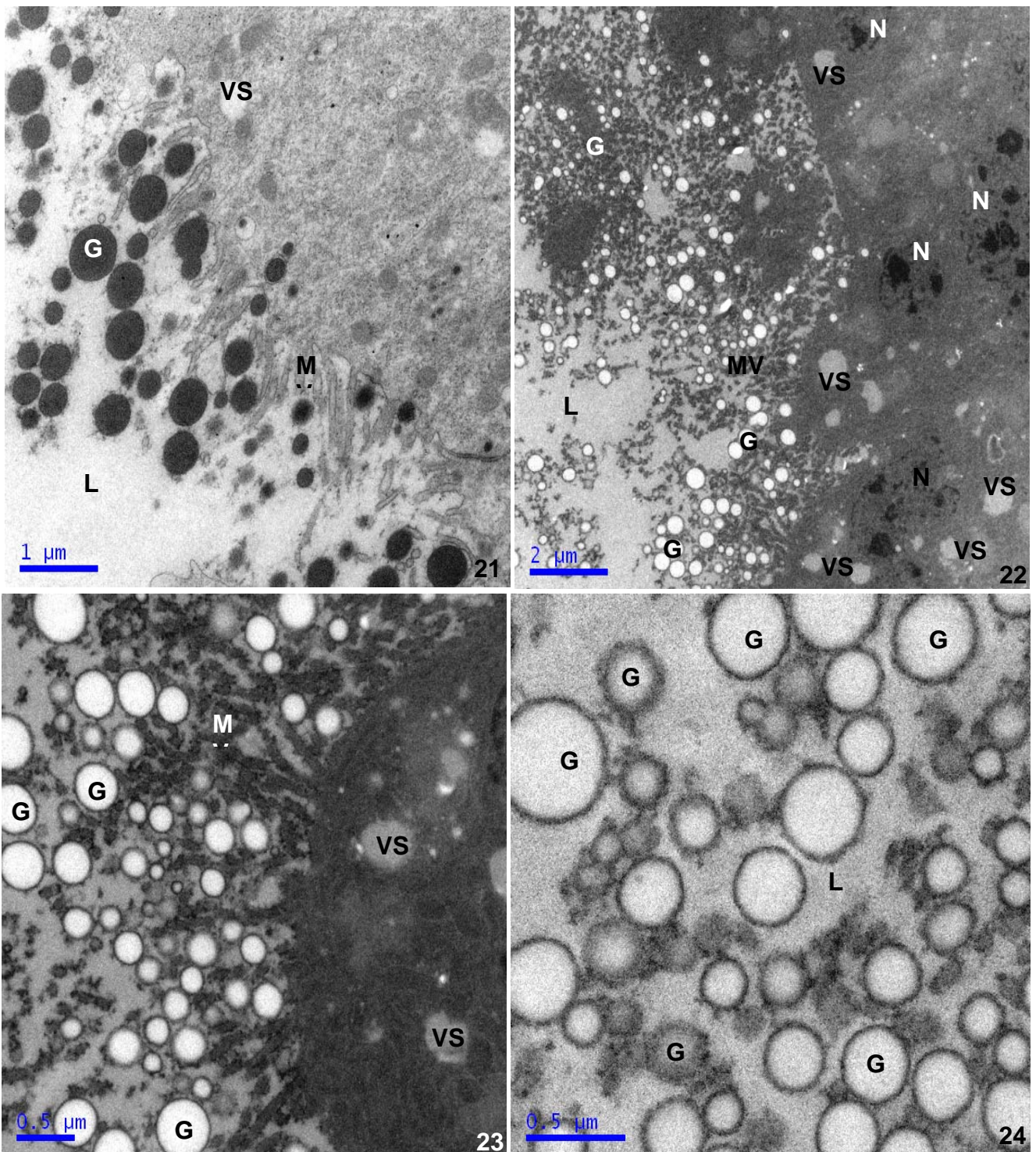


Fig. 21. Glândula acessória de *M. cerberus*, submetida à técnica do ácido periódico-tiosemicarbazida-proteinato de prata. Porção apical de células glandulares; microvilosidades (MV); grânulos de secreção (G); lúmen (L).

Fig. 22 a 24. Glândula acessória de *M. cerberus*, submetida à técnica EPTA - Ácido. Fig. 22 e 23. Porção apical de células glandulares, mostrando núcleos (N) das células glandulares. Lúmen (L); microvilosidades (MV); vesículas secretoras (VS)

com material eletrólucido indicando reação negativa e grânulos de secreção (G) também indicando reação negativa. Fig. 24. Detalhe dos grânulos de secreção presentes no lúmen glandular, indicando reação positiva apenas na membrana dos grânulos.

**Artigo 2: ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES EM QUATRO
ESPÉCIES DE *Mischocyttarus* (HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES EM QUATRO ESPÉCIES DE *Mischocyttarus* (HYMENOPTERA, VESPIDAE)

Edalton dos Reis Silva

RESUMO

Vesículas seminais de *Mischocyttarus atramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus*, *M. punctatus*, foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Os espermatozoides das quatro espécies seguem o padrão dos espermatozóides, são longos, finos, lineares, medem entre 108 μm e 137 μm e o núcleo entre 11 μm e 16 μm de comprimento. O acrossoma é cônico e em corte transversal é levemente arredondado a oval. O *perforatorium* penetra em uma cavidade na extremidade do núcleo. O núcleo de todas as espécies apresenta-se arredondado, com a cromatina condensada. Em seções longitudinais o núcleo dos espermatozoides apresenta regiões eletrólúcidas. Na região de transição núcleo-flagelo, em corte longitudinal é possível observar o axonema, e o adjunto do centríolo e em *M. cerberus* é possível visualizar regiões eletrólúcidas no interior do adjunto do centríolo. O axonema apresenta o padrão 9+9+2 microtúbulos, semelhante à maioria dos outros insetos. Os derivados mitocondriais de todas as espécies em cortes transversais são assimétricos entre si, porém apresentam uma forma semelhante. Em *M. atramentarius*, *M. injucundus* e *M. punctatus*, foi possível observar a presença de material paracristalino no derivado mitocondrial maior. Em todas as espécies existem regiões eletrólúcidas no interior de ambos os derivados. À medida que se aproxima a região final do flagelo, ambos os derivados se tornam arredondados, sendo que o derivado menor sempre termina primeiro em todas as espécies estudadas. Em direção à região posterior do flagelo observa-se uma gradual desorganização do axonema, sendo as duplas de microtúbulos, as primeiras a desaparecerem, seguidas pelo par central, restando apenas os microtúbulos acessórios. Estudos morfológicos desses espermatozóides mostraram caracteres até então desconhecidos das vespas desse gênero, como, a presença de regiões eletrólúcidas no adjunto do centríolo, mostram também a diversidade de estruturas que compõem o sistema reprodutor masculino dos insetos, constituem uma importante ferramenta que serve de fundamento para análises filogenéticas, além de reforçar a necessidade de mais estudos que contribuam com conhecimentos do gênero *Mischocyttarus* e da família Vespidae.

Palavras-chave: Vesícula seminal; Microscopia, Morfologia.

ULTRASTRUCTURE OF SPERMATOZOA IN FOUR SPECIES OF

Mischocyttarus (HYMENOPTERA, VESPIDAE)

Edalton dos Reis Silva

ABSTRACT

Seminal vesicles *Mischocyttarus atramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus*, *M. punctatus*, were processed for transmission electron microscopy. The sperm of four species follow the pattern of sperm are long, thin, linear, measure between 137µm and 108 µm core between 11 µm and 16 µm in length. The acrosome is conical in cross section and is slightly rounded to oval. The *perforatorium* penetrates into a cavity at the end of the core. The core of all species is presented electron dense, with condensed chromatin. In longitudinal sections of the core features electron lucent regions. In the transition region-core flagellum in longitudinal section you can see the axoneme and centriolar adjunct and *M. cerberus* electron lucent regions you can see inside the centriolar adjunct. The axoneme has the 9 +9 +2 microtubule pattern, similar to most other insects. The mitochondrial derivatives of all species in cross-sections are asymmetric to each other, but have a similar shape. In *M. atramentarius*, *M. injucundus* and *M. punctatus*, we observed the presence of material derived from the mitochondrial paracrystalline greater. In all species there electron lucent regions within both products. As the region approaches the end of the flagellum, both derivatives become rounded, and the derivative smallest ever finishes first in all species studied. Toward the posterior region of the flagellum there is a gradual disorganization of the axoneme, with doublets of microtubules, the first to disappear, followed by the central pair microtubules were left with just accessories. Morphological studies of sperm showed hitherto unknown characters of this genus of wasps, such as the presence of regions in electron lucent in centriolar adjunct, also show the diversity of structures that make up the male reproductive system of insects are an important tool that serves as a foundation for phylogenetic analysis, and reinforces the need for more studies to contribute to knowledge of gender and family Vespidae *Mischocyttarus*.

Keywords: Seminal vesicle; Microscopy, Morphology.

1. INTRODUÇÃO

Hymenoptera é uma das maiores ordens de insetos, quando se considera o número total de espécies e seus membros são ecológica e economicamente muito importantes, existindo desde espécies polinizadoras como as abelhas até vespas parasíticas consideradas controle biológico de pragas (Lino-Neto et al., 1999, 2002).

Cada espécie tem espermatozoides com características únicas e dentro do reino animal existem muitas variações na forma, no tamanho e na ultraestrutura, sendo que uma grande diversidade é encontrada nos invertebrados, especialmente nos insetos (Sivinski, 1984; Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999).

Espermatozoides de insetos são células diversificadas e apresentam características morfológicas e ultraestruturais que contribuem para distinguir as espécies e inferir sobre as relações filogenéticas (Justine & Mattei, 1988, Jamieson 1991; Jamieson et al., 1995, Araújo et al., 2009, Zama et al., 2007, Fiorillo et al., 2009).

Vários estudos tem sido feitos em diferentes grupos de insetos, tais como: Symphyta (Quicke et al, 1992); abelhas da família: Apidae (Peng et al., 1992, Lino-Neto et al, 2000a, Fiorillo et al., 2005; vespas das famílias: Sphecidae (Zama et al., 2005b), Vespidae (Mancini, et al., 2006 e 2009, Bushrow et al., 2006); Bethyridae (Oliveira, 2010); vespas parasíticas (Lino-Neto et al., 1999, Newman & Quicke, 2000, Lino-Neto & Dolder, 2001a); e formigas (Lino-Neto & Dolder, 2002).

O gênero *Mischocyttarus* apesar de ser bem representativo dentro da família Vespidae a morfologia do sistema reprodutor bem como a ultraestrutura dos espermatozoides ainda permanecem desconhecidas.

O objetivo deste estudo é descrever a ultraestrutura dos espermatozoides de *M. atramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus* e *M. punctatus*, revelando caracteres que possam ser usados em futuras análises filogenéticas e contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva do gênero.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas neste trabalho quatro espécies do gênero *Mischocyttarus*: *M. atramentarius*, *M. cerberus*, *M. injucundus* e *M. punctatus*, coletadas na Reserva Biológica da Merck, Município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.

Os machos adultos tiveram seus aparelhos reprodutores dissecados, e suas vesículas seminais foram retiradas. Estas foram processadas para microscopia de luz convencional microscopia e eletrônica de transmissão.

Para análises anatômica e histológica, os sistemas reprodutores foram postos em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e fotografadas no microscópio estereoscópio Zeiss (SPEMI 2000C). Em seguida, foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% de 12 a 24 horas à 4°C, lavados em água destilada, desidratados em série etanólica crescente de concentração (50, 70 90 e 100%) e incluídos em historesina. Cortes de 2 µm foram feitos em micrótomo automático com navalha de vidro, corados hematoxilina-eosina e montados com Entelan. As análises e o registro fotográfico foram feitos em um microscópio Olympus BX-50.

Para medição dos espermatozoides, gotas de suspensão desses, extraídos de vesícula seminal, foram espalhadas em lâminas histológicas e

fixadas com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 a temperatura ambiente. As preparações foram lavadas em água corrente. Após secas foram observadas e fotografadas em um fotomicroscópio equipado com contraste de fase. Para medir os núcleos, algumas das lâminas foram coradas por 15 minutos. com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão PBS, lavadas e montadas em solução de sacarose 50%, examinadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência, equipado com filtro BP360-370 nm. Foi utilizado o programa Image Pro Plus para obtenção das medidas dos espermatozoide e núcleos.

Para microscopia eletrônica de transmissão as vesículas seminais foram dissecadas e fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 0,2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por um período de 4-12 horas à 4° C. Os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão, por um período de 2 horas em temperatura ambiente, desidratados em acetona, infiltrados durante 24 horas e incluídos em resina Epon.

Os cortes ultrafinos coletados em telas de cobre e contrastados em soluções de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,1%, foram observados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL EM1011.

3. RESULTADOS

Os espermatozoides encontrados nas vesículas seminais das espécies de *Mischocyttarus* estudadas são longos, finos e medem em média 108µm de comprimento em *M. attramentarius*, 116µm em *M. cerberus*, 130 µm em *M. injucundus* e 137µm *M. punctatus* (Fig.1) e são constituídos por uma cabeça,

formada por um acrossoma e um núcleo, um flagelo formado por dois derivados mitocondriais, um adjunto do centríolo e um axonema.

A região do núcleo varia em média de aproximadamente, 11 μm em *M. punctatus* 13 μm em *M. attramentarius* (Fig. 2) e em *M. cerberus* a 16 μm em *M. injucundus*.

O Complexo acrossomal possui uma vesícula acrossomal que recobre o *perforatorium* em todas as espécies. O acrossoma de todas as espécies é cônico com a extremidade afilada (Fig. 3) e em corte transversal é levemente arredondado a oval em todas as espécies (Fig. 5). O *perforatorium* penetra em uma cavidade na extremidade do núcleo (Fig. 4), fato que é possível observar também em corte transversal (Fig. 6).

O núcleo dos espermatozoides em corte transversal é oval na porção anterior e vai se tornando arredondado em direção à região posterior; apresenta-se arredondado, com a cromatina condensada, (Fig. 7). Em secções longitudinais eles apresentam regiões eletrólúcidas (Fig. 8).

Em corte longitudinal é possível observar na região de transição núcleo-flagelo, o axonema, o adjunto do centríolo (Fig. 9), o derivado mitocondrial maior inserindo-se logo abaixo do núcleo (Fig. 10).

Em corte transversal também é possível observar essas estruturas (Fig. 11). Apenas em *M. attramentarius* foi possível observar em corte transversal uma região que possivelmente corresponde à região centriolar, que está localizada logo abaixo do núcleo ao lado do adjunto do centríolo e do derivado mitocondrial maior (Fig.12).

Em *M. cerberus* é possível observar o núcleo, o axonema, a e o adjunto do centríolo, que é longo, situado ao lado do derivado mitocondrial maior, e apresenta regiões eletrólúcidas, vistas em corte longitudinal (Fig. 13) e em

corte transversal (15). Ao final do adjunto do centríolo é possível observar o início do derivado mitocondrial menor (Fig.14), onde pode-se observar a presença de cristas mitocondriais.

Em uma região mais inferior do flagelo, em corte transversal, o núcleo apresenta-se ligeiramente arredondado e o adjunto do centríolo se projeta entre o núcleo o derivado mitocondrial maior (Fig.16). Em *M. injucundus* não foi possível observar essa região no espermatozoide.

Em corte longitudinal a região do flagelo é longa, onde visualiza-se o mesmo padrão para todas as espécies que consiste nos derivados mitocondriais maior e menor, marcados pela presença de cristas mitocondriais presentes na periferia, opostas ao axonema (Fig. 17)

O axonema apresenta o padrão 9+9+2 microtúbulos, nas quatro espécies, sendo 9 microtúbulos simples acessórios e externos, 9 duplas e um par de microtúbulos centrais (Fig 18).

Os derivados mitocondriais de todas as espécies em cortes transversais são assimétricos entre si, porém apresentam forma de pêra em *M. attramentarius*, *M. cerberus* (Fig. 18) e em *M. injucundus* ou são ligeiramente arredondados em *M. punctatus*. Um derivado mitocondrial é sempre maior, alongado já o outro é sempre menor, alongado a arredondado (Fig. 18). No derivado mitocondrial maior é possível observar na região distal ao axonema, a presença de material paracristalino e na região oposta a presença de uma região eletrólúcida (Fig. 19). No derivado mitocondrial menor há também a presença de uma área eletrólúcida na região distal em relação ao axonema em todas as espécies (Fig. 19 e 20).

Corpos acessórios foram observados em todas as espécies (Fig.19).

À medida que se aproxima a região final do flagelo, ambos os derivados se tornam arredondados, sendo que o derivado menor sempre termina primeiro em todas as espécies estudadas (Fig. 20).

Em corte transversal o axonema pode ser visualizado acompanhado do derivado mitocondrial maior e do adjunto do centríolo em todas as espécies, apresentando uma forma ligeiramente triangular. (Fig. 21)

Em direção à região posterior do flagelo observa-se uma gradual desorganização do axonema, sendo as duplas de microtúbulos as primeiras a desaparecerem, seguidas pelo par central, restando apenas os microtúbulos acessórios (Fig. 22 a 29).

4. DISCUSSÃO

Os espermatozoides das espécies de *Mischocyttarus* são semelhante aos de outros hymenoptera já descritos (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke, 1998, 1999a,b, 2000, Cruz-Landim, 2001; Mancini, 2006, Mancini, 2009 e Zama et al., 2004;), sendo longos, lineares, compostos por um cabeça e um flagelo.

O acrossoma de *Mischocyttarus* apresenta-se cônico com a extremidade ligeiramente afilada em secção longitudinal e arredondado a oval em secção transversal, semelhante ao de *Agelaiia vicina* (Mancini et al., 2006) e de algumas espécies de abelhas Cruz-Höfling al., 1970; Peng et al., 1992, 1993; Báó et al., 2004; Fiorillo et al., 2005; Zama et al., 2005a) mas difere do observado em abelhas sem ferrão (Zama et al., 2001, 2004; Araújo et al., 2005b) e em formigas (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto and Dolder, 2002; Moya et al., 2007) onde ele apresenta-se arredondado na região anterior e triangular

na região posterior. Já em espécies de Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, Lino-Neto et al., 2001b), Ichneumonidae (Quick, et al., 1992), Bethyidae (Quick et al., 1992) o acrossoma é revestido por uma camada extracelular que no caso de *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto et al., 1999) é formada por inúmeros filamentos que irradiam da vesícula.

É comum entre os hymenoptera o *perforatorium* penetrar em uma cavidade na extremidade do núcleo (Lino-Neto & Dolder, 2002, Araújo et al., 2009, Mancini et al., 2006, 2009, Zama, 2004). Em *M. attramentarius* e em *M. injucundus* o *perforatorium* penetra numa cavidade pouco profunda na extremidade do núcleo, diferente de *Agelaia vicina* que penetra numa cavidade bem profunda na extremidade do núcleo (Mancini, 2006). Em *M. cerberus* e *M. punctatus* só foi possível a visualização do *perforatorium* penetrando no núcleo em corte transversal, não sendo possível mensurar o quanto este penetra na cavidade da extremidade nuclear.

O núcleo apresentou-se eletrondenso com a cromatina homogeneamente compactada em todas as espécies de *Mischocytharus* estudadas, como é comum na maioria dos Hymenoptera. Em cortes longitudinais, regiões eletrólucidas circulares dispostas em regiões diferentes do núcleo foram vistas em *M. attramentarius*, *M. injucundus* e *M. punctatus*. Essas lacunas eletrólucidas foram observadas em *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto et al., 1999) e em *Solenopsis invicta* (Lino-Neto & Dolder, 2002). Segundo os autores, apesar de ser uma característica comum entre outros Hymenoptera, em *S. invicta* há uma quantidade grande e incomum dessas áreas eletrólucidas e que essa característica pode servir para distinguir os espermatozoides dessa espécie dos espermatozoides de outras espécies de formigas. Em formigas do gênero *Dolichoderus*, *Ectatoma* e

Pachycondyla foram vistas inclusões eletrólucidas no núcleo (Lino-Neto et al., 2008). Em *Aethalion reticulatum* também foram vistas regiões semelhantes ao longo de toda extensão do núcleo (Araújo et al., 2010). Em *Hypanthidium foveolatum*, Graciele, et al., 2009, observaram um núcleo também eletrólucido, porém com a cromatina heterogeneamente compactada. Em *Melipona marginata* e *Melipona rufiventris*, a cromatina é compactada, disposta em vários agregados, também não existindo uma compactação uniforme (Zama, et al., 2004). *Pseudaugochlora graminea* spp (Fiorillo et al., 2005) e formigas do gênero *Pseudomyrmex* (Moya et al., 2007) apresentam núcleo com filamentos espessos de cromatina não compactada em toda sua extensão. Em *Prorops nasuta* o núcleo apresenta cromatina compacta, apresentando áreas eletrólucidas dispostas na periferia do mesmo, indicando uma descompactação da cromatina na região basal do núcleo (Oliveira et al., 2010).

O núcleo linear de *Mischocyttarus* é comum entre alguns hymenoptera (Zama et al., 2005, Zama, et al., Lino-Neto e Dolder, 2004) diferindo do núcleo helicoidal de algumas espécies de Trichogrammatidae (Lino-Neto et al., 2000) e Eurythomidae (Lino-Neto et al., 1999).

De acordo com a disposição do arranjo microtubular é possível inferir que a região centriolar de *M. attramentarius* foi vista em corte transversal. Em *Plebeia droyana* (Zama et al., 2001), em formigas do gênero *Pseudomyrmex* (Moya et al., 2007) e em *Vespa crabo* (Mancini et al., 2009) essa estrutura e a organização dos microtúbulos acessórios e das duplas de microtúbulos foi mencionada, mas em muitos Hymenoptera é pouco conhecida (Mancini et al., 2009).

Foram observadas regiões eletrólucidas no adjunto do centríolo de *M. cerberus*. Áreas eletrólucidas nesta porção do espermatozóide não são

comuns em Hymenoptera e só foram observadas em *Eulaema nigrita* (*Euglossine*) (Zama et al, 2005).

A forma e o tamanho dos derivados mitocondriais são importantes caracteres nas espécies de Hymenoptera. Os derivados mitocondriais das quatro espécies de *Mischocyttarus* são de tamanhos diferentes e formas semelhantes, iniciam em porções diferentes do flagelo, sendo que o derivado mitocondrial menor, sempre termina primeiro que o derivado maior. Este padrão é comum para algumas espécies de Symphyta (Lino-Neto et al., 2008), de Apidae (Gracielle et al., 2009), mas não é observado em *Agelai vicina* (Mancini, 2006) e em *Vespa crabo* (Mancini, 2009), pois o derivado mitocondrial maior acaba primeiro que o menor. A assimetria dos derivados mitocondriais é uma característica presente em várias espécies (Zama et al., 2001, 2004, 2005a,b, Báó et al., 2004; Fiorillo et al., 2005a).

No derivado mitocondrial maior de *M. attramentarius*, *M. punctatus* e *M. injucundus*, foi observada a presença de material paracristalino, característica comum entre espécies de Vespidae já estudadas (Mancini et al., 2009), de Apidae (Lino-Neto, et al., 2000b), de Meliponini (Zama et al., 2004). Em espécies de Bethyidae o material paracristalino ocorre em ambos os derivados mitocondriais (Oliveira et al., 2010). Em espécies de vespas parasíticas geralmente não há presença de material paracristalino (Lino-Neto et al., 1999, Lino-Neto et al., 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Ambos os derivados mitocondriais de todas as espécies estudadas, apresentaram regiões eletróluscentes. Lino-Netto et al., 2000a descreveram quatro regiões eletrólúcidas distintas no derivado mitocondrial maior e três no derivado menor de *Apis mellífera*, o mesmo foi observado em *Plebeia droyana* (Zama, et al., 2001).

Foram observados os corpos acessórios nos espermatozoides de *Mischocyttarus*, porém não foi possível distinguir sua forma. Essas estruturas apresentam geralmente forma triangular e são comuns na maioria dos Hymenoptera (Quick, et al., 1992; Lino-Neto, et al., 2000b; Zama et al., 2004, Zama et al., 2005) porém em *P. nasuta* (Oliveira et al., 2010) e *Vespa crabo* (Mancini et al., 2009) estão presentes mas possuem formas irregulares.

O axonema tem padrão 9+9+2 microtúbulos. Essa característica também é comum entre os insetos (Quick, et al., 1992, Gonçalves, 2007, Baccetti, 1972, Báó, 1987).

A sequência de término dos microtúbulos pode assumir um caráter diferencial importante nos espermatozoides (Zama et al., 2004). As espécies de *Mischocyttarus* estudadas seguem um padrão onde as duplas de microtúbulos acabam primeiro, seguidas pelo par central e por último os microtúbulos acessórios. Esse padrão onde os microtúbulos acessórios acabam por último é comum em outras espécies como *Plebeia droyana* (Meliponini) (Zama et al., 2001) e em espécies de Apini (*Peng et al., 1993; Lino-Neto et al., 2000a*), em *Porops nasuta* (Bethylidae) (Oliveira et al., 2010). Em Formicidae, os microtúbulos acabam praticamente juntos (Wheeler et al., 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002). Em espécies de Chalcidoidea os microtúbulos acessórios terminam primeiro (Lino-Neto et al., 1999 2000b; Lino- Neto and Dolder, 2001a, Brito et al., 2009).

Mancini et al., 2009, observaram que embora os microtúbulos acessórios acabem sempre por último em *Vespa crabo*, o par central desaparece primeiro, do que as duplas de microtúbulos em, já *Agelaia vicina*, os microtúbulos acabam praticamente ao mesmo tempo (Mancini, 2006), como em Formicidae. Dados divergentes dos aqui observados em *Mischocyttarus* que são

integrantes da mesma família. Segundo *Moreira, et al, 2010*, em *Lyneon dieloceri* e *Pachysomoides* sp., espécies de Ichneumonidae, os microtúbulos centrais desaparecem primeiro, seguidos pelos acessórios e por último as duplas de microtúbulos. Em Culicidae (Diptera) os microtúbulos acessórios são os primeiros a desaparecer, seguido pelo microtúbulo central e por último as duplas de microtúbulos (*Justine e Mattei, 1998*). De acordo com *Zama et al., 2004*, essas características podem ser importantes para diferenciar os Aculeata e outros Apocrita.

Jamieson, et al., 1999 afirmam que a estrutura dos espermatozoides parece ser mais eficiente para o entendimento das análises filogenéticas do que a morfologia externa do animal que está sujeita à maior pressão seletiva.

O uso de caracteres morfológicos de espermatozoides é importante para realização de análises filogenéticas e estabelecimento das relações evolutivas entre os grupos de insetos. (*Zama et al., 2004, Moreira et al., 2010, Lino-Neto, et al., 2000a, Mancini, et al., 2006, Araújo, 2009, Fiorillo et al., 2008*).

Em conclusão, estudos morfológicos desses espermatozoides, mostraram caracteres até então desconhecidos das vespas desse gênero, como, a presença de regiões eletrólucidas no adjunto do centríolo, mostram também a diversidade de estruturas que compõem o sistema reprodutor masculino dos insetos, constituem uma importante ferramenta que serve de fundamento para análises filogenéticas além de reforçar a necessidade de mais estudos que contribuam com conhecimentos do gênero *Mischocyttarus* e da família Vespidae.

5. AGRADECIMENTOS

A Plataforma de Microscopia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo uso do microscópio eletrônico de transmissão, aos técnicos Adalberto José da Silva e Rômulo Custódio de Souza pelo apoio no processamento das amostras e auxílio no manuseio do microscópio, ao Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi, pela identificação das espécies e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

6. BIBLIOGRAFIA

- Araújo, V.A., 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, 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.
- Araújo, V.A., Bão, S. N., Moreira, Neves, C. A., J., Lino-Neto, J., 2010. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). *Micron* 41: 306–311.
- Baccetti, B.1972. Insect sperm cell. *Adv. Insect. Physiol.*, 9: 315-397.
- Bão, S. N., 1987. Estudo ultraestrutural da espermiogênese de no mutante “olho róseo” comparativo a linhagem selvagem de *Ceratitidis capitata* Weidman (díptera, Tephritidae). Tese de Mestrado. Unicamp. SP.

- Báo, S. N., Kitajima, E.W., Callaini, G., Dallai, R., 1996. Virus-like particles and rickettsia-like organisms in male germ and cyst cells of *Bemisia tabaci* (Homoptera; Aleyrodidae). *J. Invert. Pathol.* 67, 309–311.
- Báo, S. N., Gonçalves-Simões, D., Lino-Neto, J., 2004. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis*(*Exomalopsis*)*auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia*(*Lophopedia*) *sp.* Michener & Moures 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 36 (1): 23-28.
- Brito, P., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2009. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. Australia*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue Cell* 41, 113–117.
- Cruz-Hoßling, M.A., Cruz-Landim, C., Kitajima, E.W., 1970. The fine structure of spermatozoa from the honey bee. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42: 69-78.
- Cruz-Landim, C., 2001. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia Sér. Zool.* 183–189.
- Fiorillo, B.S., Coelho, A.A.M., Lino-Neto, J., Báo, S.N., 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 37 (1):75-81.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J., Báo, S.N., 2009. Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Zool.* 89: 00–10.
- Gonçalves, M. P., 2007. Descrição ultraestrutural da espermiogênese com ênfase na espermiogênese de *Trypoxylon* (*Trypargylum*) *lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae). *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa*, 49p.

- Gracielle, I.M.S., Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J., Bao, S.N., 2009. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* 40: 419–425.
- Jamieson, B.G.M., 1987. The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa. *Cambridge University Press, Cambridge*, p. 320.
- Jamieson, B.G.M., 1991. Fish Evolution and Systematics. Evidence from Spermatozoa. *Cambridge University Press, Cambridge*, p. 319.
- Jamieson, B.G.M., Auso, J., Justine, J.L., 1995. Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. *Memoirs du Museum National D'Histoire Naturelle* 166 :564.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny. *Science Publishers, New Hampshire*, p. 554.
- Justine, J-O. and Mattei, X. 1988. Ultrastructure of the spermatozoon of the mosquito *Toxorhynchites* (Diptera, Culicidae). *Zoologica Scripta, Vol. 17*(3). pp. 289-291.
- Lino-Neto, J., Bao, S.N., Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Euritomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28, 253–259.
- Lino-Neto, J., Bao, S.N., Dolder, H., 2000a. 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., Bao, S.N., Dolder, H., 2000b. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatma and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81, 205–211.

- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001a. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolini* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 82, 159–164.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001b. Structural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scrip.* 30, 89–96.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue 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 Cell* 40: 185–193.
- Lino-Neto, J., Zama, U. e Mancini, K. 2008. Morfologia dos espermatozoides de Hymenoptera. In: In: Vilela, E. F., Santos, I. A., Schoereder, J. H., Serrão, J. E., Campos, L. A. e Lino-Neto, J. 2008. Insetos sociais: da biologia á aplicação. Editora UFV. Viçosa-MG. 442p.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insect. Soc.* 53, 333–338.
- Lino-Neto, J., 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., Albano, 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. Hym. 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.
- Oliveira, C.M., Mancini, K., Dolder, H., Lino-Neto, J. 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae). *Tissue and Cell* 42: 242–246
- 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.
- Quicke, D.L.J., Ingram, S.N., Baillie, H.S., Gaitens, P.V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Sci.* 21, 381–402.

- Sivinski, J., 1984. Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.), Sperm Competition and Evolution of Animal Mating Systems. *Academic Press, New York*, pp. 85–115.
- Wheeler, D.E., Crichton, E.G., Krutzsch, P.H., 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.* 206:343–350.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droyana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hymenoptera Res.* 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, 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. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37: 313–321.
- Zama, U., Moreira, J., Bao, S.N., Campos, L.A.O., 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. Struct. Dev.* 36: 304–316.

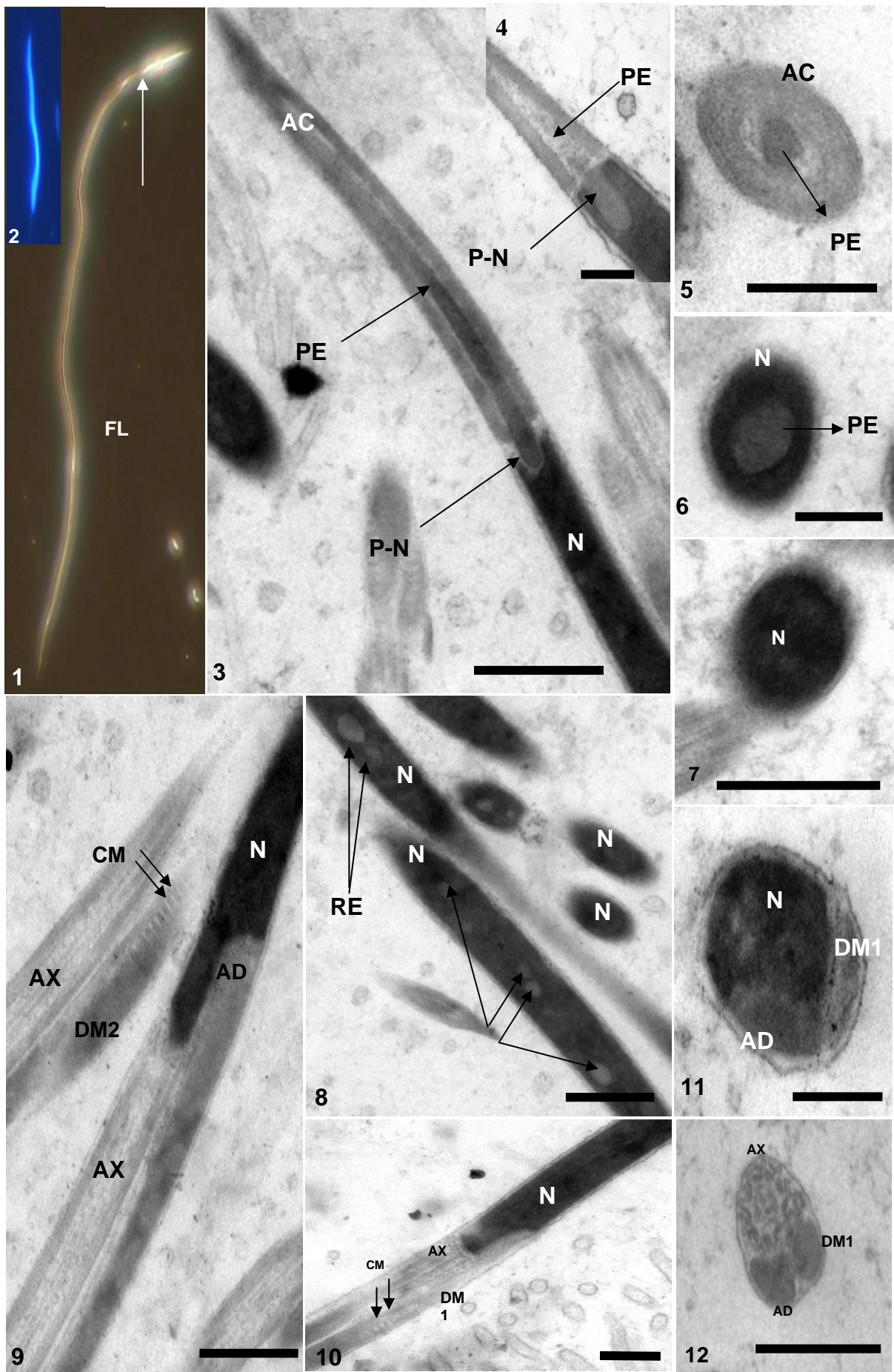


Fig. 1.: Fotomicrografia de luz (contraste de fase) do espermatozoide de *M. punctatus*. Cabeça (CA) e o flagelo (FL). Fig. 2. Núcleo (N) corado com DAPI. Seta indica a região de transição núcleo-flagelo. Fig. 3. Complexo acrosomal (AC) e perforatorium (PE). Fig. 4. Detalhe da inserção no perforatorium (P-N) no núcleo (N) de *M. attramentarius*. Fig. 5.. Secção transversal do acrossoma (AC) e do perforatório (PE) de *M. attramentarius*, Fig. 6. Inserção do perforatorium (PF) na extremidade do núcleo (N) em secção transversal de *M. injucundus*. Fig. 7. Núcleo (N) de *M. cerberus* em secção transversal. Fig. 8. Secção longitudinal do núcleo (N) de *M. attramentarius*, Regiões eletrólúcidas (RE). Fig. 9-11 Região de transição núcleo-flagelo de *M. attramentarius*. Fig. 9. Em secção longitudinal. Adjunto do centríolo (AD), o axonema (AX), derivado mitocondrial maior (DM1) e as cristas mitocondriais (CM). Fig. 10. Em secção longitudinal. Derivado mitocondrial maior (DM1). Fig. 11. Em secção transversal. Adjunto do centríolo (AD), derivado mitocondrial maior (DM1) e núcleo (N). Fig. 12. Secção transversal da região centriolar, evidenciando o arranjo microtubular inicial do axonema (AX), o derivado mitocondrial maior (DM1) e o adjunto do centríolo (AD). Escalas das barras: Fig. 1 e a; Fig. 3 (0,5 µm); Fig. 4 (0,2 µm); Fig. 5 (0,2 µm); Fig. 6. (0,2 µm); Fig. 7 (0,5 µm); Fig. 8 (0,5 µm); Fig. 9 (0,5 µm); Fig. 10 (0,5 µm); Fig. 11 (0,2 µm); Fig. 12 (0,5 µm).

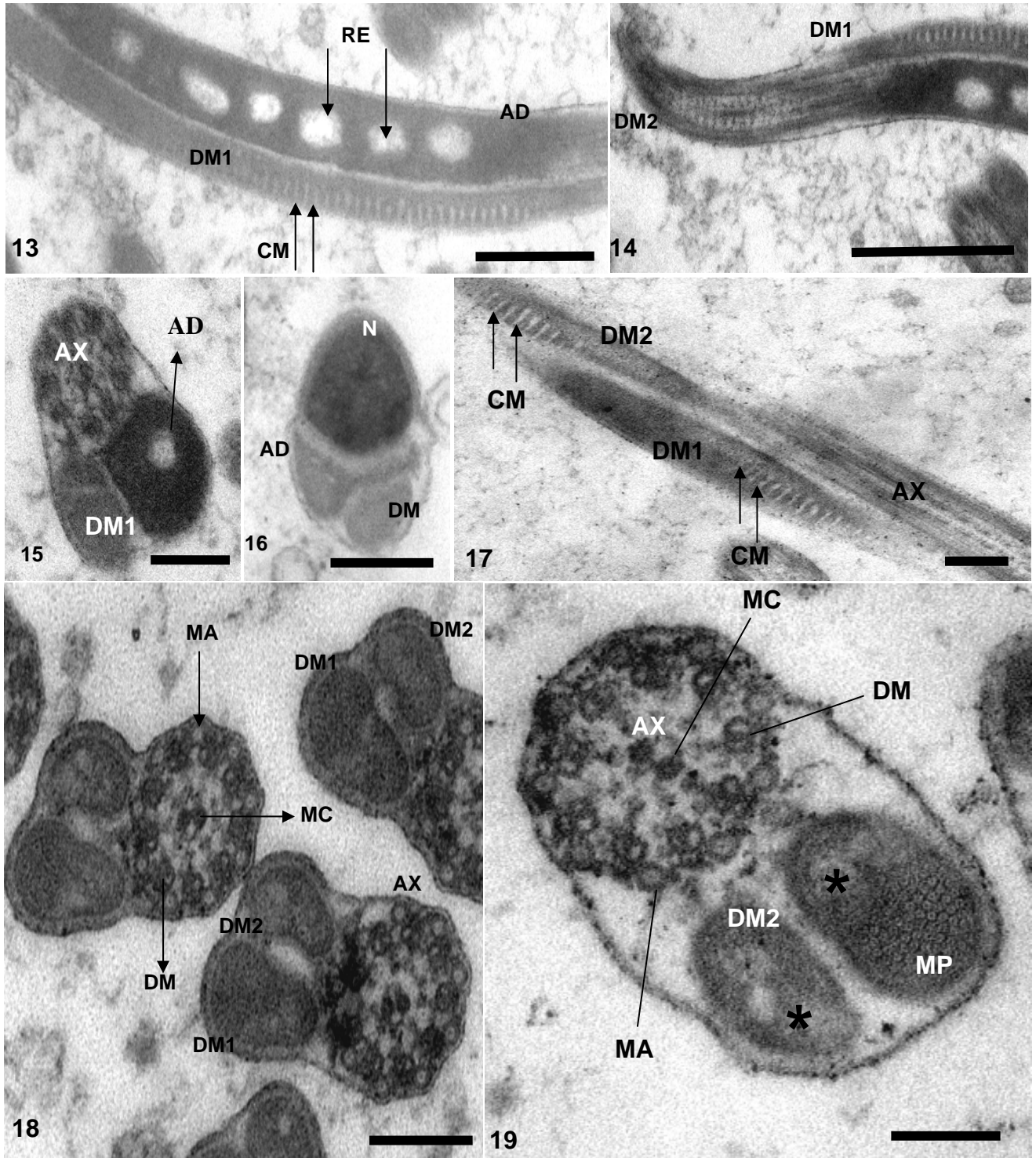


Fig. 13, 14 e 15. Secções longitudinal e transversal do flagelo de *M. cerberus* evidenciando as regiões eletrólúcidas (RE) no adjunto do centríolo (AD), (AX) axonema, derivado mitocondrial maior (DM1), derivado mitocondrial menor (DM2) e cristas mitocondriais (CM). Fig. 16. Região de transição núcleo-flagelo em secção transversal. Adjunto do centríolo (AD), derivado mitocondrial maior (DM1) e núcleo (N). Fig. 17. Secção longitudinal do axonema (AX). Derivado mitocondrial maior (DM1), derivado mitocondrial menor (DM2), cristas mitocondriais. Fig. 18. Detalhe do flagelo em secção transversal mostrando o axonema (AX), derivados mitocondriais maior (DM1) e menor (DM2), os microtúbulos acessórios (MA), as duplas de microtúbulos (DM) e o par de microtúbulos centrais (MC). Fig. 19. Detalhe do flagelo de *M. attramentarius* em secção transversal mostrando os microtúbulos acessórios (MA), as duplas de microtúbulos (DM) e o par de microtúbulos centrais (MC), regiões eletrólúcidas (*) nos derivados mitocondriais e o material paracristalino (MP) no derivado mitocondrial maior (DM1). Escalas das barras: Fig. 13 (0,5 μ m); Fig. 14 (0,5 μ m); Fig. 15 (0,2 μ m); Fig. 16 (0,2 μ m); Fig. 17 (0,2 μ m); Fig. 18 (0,2 μ m); Fig. 19 (100 nm).

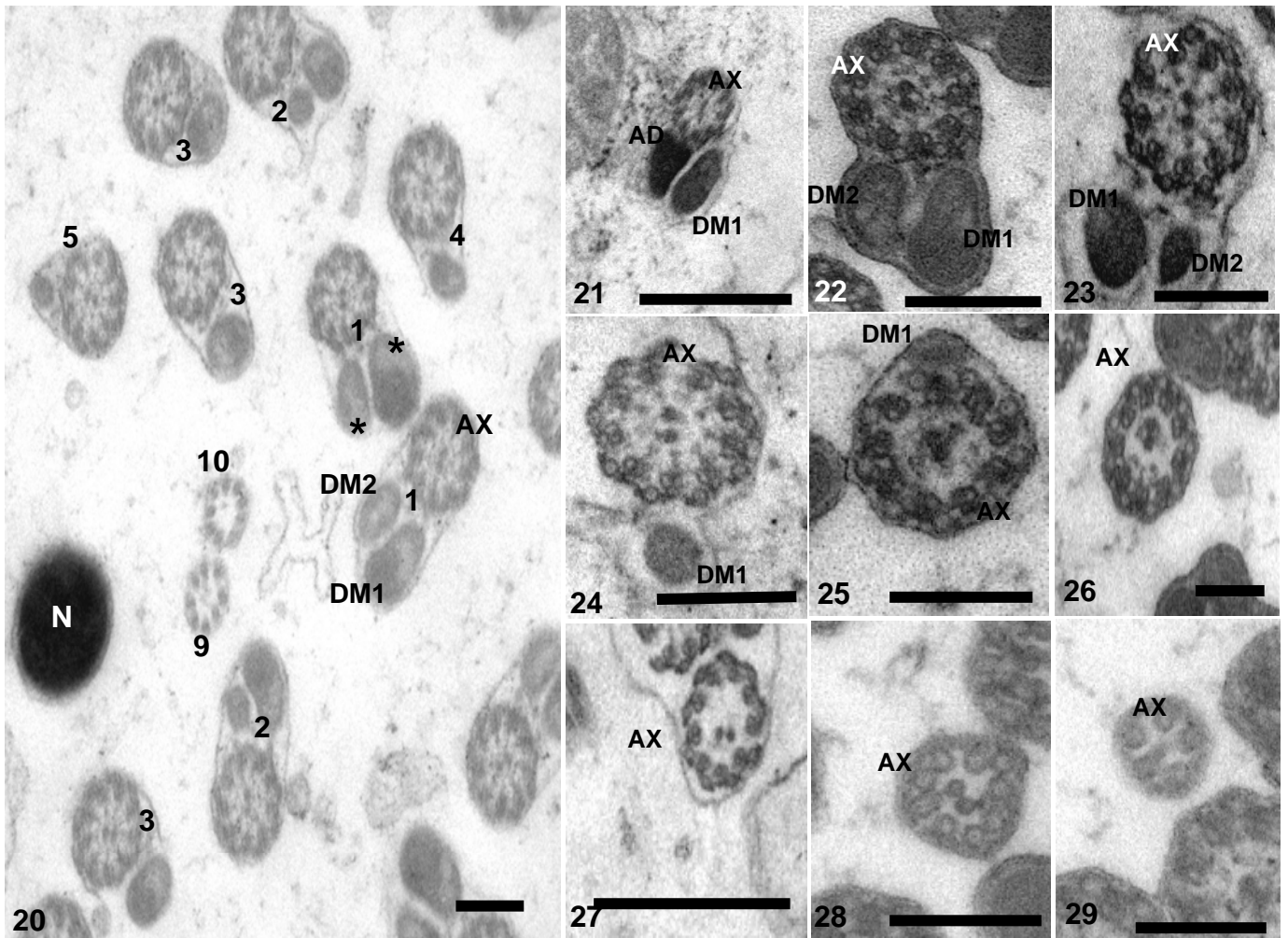


Fig. 20. Secções transversais em níveis diferentes de flagelos de *M. attramentarius*. Axonema (AX), derivado mitocondrial maior (DM1), derivado mitocondrial menor (DM2). Fig. 21 a 29. Secções transversais dos flagelos de *M. cerberus*. 21. Secção transversal da região inicial do flagelo. Axonema (AX), adjunto do centríolo (AD) e derivado mitocondrial maior (DM1). 22 a 27. Secções transversais em níveis diferentes do flagelo. 28 e 29. Secções transversais da região terminal do flagelo mostrando a sequência de desorganização e término dos microtúbulos do axonema (AX). Escalas das barras: Fig. 20 (0,2 μ m); Fig. 21 (0,5 μ m); Fig. 22 (0,2 μ m); Fig. 23 (0,2 μ m); Fig. 24 (0,2 μ m); Fig. 25 (0,2 μ m); Fig. 26 (0,2 μ m); Fig. 27 (0,5 μ m); Fig. 28 (0,2 μ m); Fig. 29 (0,2 μ m).

4. BIBLIOGRAFIA GERAL

- Araújo, V. A., Freitas, F. V., Moreira, J., Neves, C. A., Lino-Neto, J. 2010. Morphology of Male Reproductive System of Two Solitary Bee Species (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology* 39(4):595-600 .
- Bairati A, 1968. Structure and ultrastructure of the male reproductive system of *Drosophila melanogaster* Meig. 2. The genital duct and accessory glands. *Monit. Zool. Ital.* 2:105-182.
- Báo, S. N., Gonçalves-Simões ,D., Lino-Neto, J. 2004. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis* (*Exomalopsis*) *auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia* (*Lophppedia*) sp. Michener & Moures 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J. Submicr. Cytol. Pathol.* 36: 23-28.
- Blum, M. S. and Hilker, M. 2002. Chemical protection of insect eggs, in: Hilker M and Meiners T (Eds.), *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*, Blackwell, Berlin, pp. 61–90.
- Carpenter, J. M. 1991. Phylogenetic relationship and the origin of social behavior in the Vespidae. In: Ross, K. G., Matthews, R. W. (Eds.) *The social Biology, of wasps*. Ithaca: Cornell Univ. Press. P. 7-32.
- Carpenter, J. M. 1993. Biogeografic patterns in the Vespidae (Hymenoptera). Two views of Africa and South America. In: Goldblatt (editor), *Biological relationship between Africa and South America*, pp, 139-155. New Haven, CT: Yale University Press, ix+630p.
- Chapman, R. F. 1998. *Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Chen, O. S. 1984. The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Ann. Ver. Entomol.* 29: 233-255.

- Cooper, M. 1996a. The subgenus *Monogynoecus* Richards of *Mischocyttarus* de Saussure (Hym., Vespidae, Polistinae) with descriptions of two new species. *Entomologist's Monthly Magazine* 132: 23-28.
- Cooper, M. 1996b. The *mendax* group of *Mischocyttarus* (Hym., Vespidae, Polistinae) with descriptions of new species. *Entomologist's Monthly Magazine* 132: 273-280.
- Cruz-Landim, C. 2001. Organization of the cysts in bees (Hymenoptera, Apidae) testis: Number of spermatozoa per cyst. *Iheringia, Sér. Zool.* 91: 183-189.
- Dallai, R. and Afzelius, B. A. 1995. Phylogeny significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: Jamieson B. G. M. (eds) *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Mem. Mus. Natn. Hist. Nat.* 16: 291-296.
- Dapples, C. C., Foster, W. A. and Lea, A. O. 1974. Ultrastructure of the accessory gland of the male mosquito, *Aedes Aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* :3 (2),279-291.
- Davey, K. G. 1985. The male reproductive tract. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. I. Pergamon Press, Oxford, pp. 1–14.
- Eberhard, W. G. 1996. *Female control, Sexual Selection by Cryptic Female Choice*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Eisner, T., Rossini, C., González, A., Iyengar, V. K, Siegler, M. V. S and Smedley, S. R. 2002. Paternal investment in egg defense, in: Hilker M and Meiners T (Eds.), *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*, Blackwell, Berlin, pp. 91–116.

- Ferreira, A., Abdalla, F. C., Kerr, W. E. and Cruz-Landim, C. 2004. Comparative study of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotomol* 33: 569-578.
- Forbes, J. and Do-Van-Quy, D. 1965. The anatomy and histology of the male reproductive system of the legionary ant, *Neivamyrmex harrisi* (Haldeman) (Hymenoptera, Formicidae). *New York Entomol Society* 73: 95-111.
- Freitas, S. P.C, Gonçalves, T. C. M., Serrão, J. E., Santos-Mallet, J. R. 2007. Fine structure of the male accessory glands of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Triatominae). *Microsc Res Tech* 70: 355-360.
- Friedel, T. and Gillott, C. 1977. Contribution of male produced proteins to vitellogenesis in *Melanoplus sanguinipes*. *J Insect Physiol* 22:145-151.
- Gaston, K. J. 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology* , 5, 283–296.
- Gauld, I. D. and Hanson, P. E. 1995. The evolution, classification and identification of the Hymenoptera. In: The Hymenoptera of Costa Rica. Eds. Hanson, P.E. & Gauld, I.D. Oxford University Press, pp. 138-156.
- Giannotti, E. and Silva, C. V. 1993. *Mischocyttarus cassununga*(Hymenoptera, Vespidae): external morphology of the brood during the post-embryonic development. *Revista Brasileira de Entomologia* 37: 309–312.
- Gillott, C. 1998. Arthropoda - Insecta. In: *Reproductive Biology of Invertebrates* (Adiyodi KG and Adiyodi RG, eds.). Vol. 3. Wiley, New York, pp. 319-371.
- Gillott, C. 1996. Arthropoda–insecta. In: Adiyody, K.G., Adiyody, R.G. (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates, Accessory Sex Glands*, vol. III. Wiley, Chichester, pp. 319–471.
- Gillott, C. 2003. Male accessory gland secretion: modulation of female reproductive physiology and behavior. *Annu Rev Entomol* 48: 163-218.

- Hanson, P. E. and Gauld, I. D. 1995. *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford Science Publication, London. pp 893.
- Jamieson, B. G. M. 1987. *The ultrastructure und phylogeny of insect* . University Press, Cambridge.
- Jamieson, B. G. M., Dallai, R. and Afzelius, B. A. 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Scientific Publishers, Enfield, N.H.
- Jeanne, R. L. 1970. Chemical defense of brood by a social wasp. *Science* 168: 1465–1466.
- Jeanne, R. L. 1972. Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology of Harvard University* 144: 63–150.
- Jeanne, R. L. 1980. Evolution of social behavior in the Vespidae. *Annual Review of Entomology* 25: 371-396.
- Leopold, R. 1976. The role of male accessory glands in insect reproduction. *Annual Review of Entomology* 21:199–221.
- Lemos, W. P., Serrão, J. E., Ramalho, F. S., Zanuncio, J. C. and Lacerda, M. C. 2005. Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Feteroptera, Pentatomidae). *Braz J Biol* 65: 91-96.
- Lino-Neto, J., Bão, S. N. and 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., Bão, S. N. and Dolder. H. 2000a. 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., Bao, S. N. and 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. and Dolder, H. 2001a. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*, 30:(2)89–96.
- Lino-Neto, J. and Dolder, H.: 2001b. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 82: 159-164.
- Lino-Neto, J. and Dolder, H. 2002. Sperm structure and of ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell.* 34: 124-128.
- Louis, D. and Kumar, R. 1973. Morphology of the alimentary and reproductive organs in reduviidae (Hemiptera, Heteroptera) with comments on interrelationships within the family. *An Entomol Society of América* 66: 635-639.
- Matsuda, R., 1976. Morphology and Evolution of the Insect Abdomen. Pergamon Press, Oxford, pp. 335–363.
- Mikheyev, A. S. 2004. Male accessory gland size and the evolutionary transition from single to multiple mating in the fungus-gardening ants. *J Insect Sci.* 4: 37.
- Nascimento, F. S., Tannure-Nascimento, I. C., Mateus, S. 2008. Vespas sociais neotropicais: padrões comportamentais, regulação social e arquitetura de

- ninhos. In: Vilela, E. F., Santos, I. A., Schoereder, J. H., Serrão, J. E., Campos, L. A. e Lino-Neto, J. 2008. Insetos sociais: da biologia á aplicação. Editora UFV. Viçosa-MG. 442p.
- Newman, T. M. and Quicke, D. L. J. 1999. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.* 8: 197-203.
- Newman, T. M. and Quicke, D. L. J. 2000. Sperm and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *J. Hym. Res.*, 9: 62-70.
- O' Toole, C. 1993. Diversity of native bees and agroecosystems. In: La Salle, J. & I. D. Gauld (eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*, CBA Internatinal, Wallingford. pp. 160-196.
- Quicke, D. L. J., Ingram, S. N., Baillie, H. S. and Gaitens, P. V. 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 2: 381-402.
- Ramalingam, S. and Craig Jr, G. B. 1977. Fine structure of the male accessory gland in *Aedes triseriatus*. *J Insect Physiol* 24: 251-259.
- Raabe, M. 1989. *Recent Developments in Insect Neurohormones*. New York: Plenum. 503 pp.
- Richards, O. W. 1978. *The social wasps of the Americas excluding the Vespinae*. London, British Museum (Natural History), 580 p.
- Ross, K. G., and Matthews, R. W. (Ed.) 1991. *The social biology of wasps*. Cornell University Press. 1ª Ed. 678 pp.
- Sharkey, M. J. 2007. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. *Zootaxa* 1668: 521–548.

- Shirk, P. D., Bhaskaran, G. and Roller, H. 1980. The transfer of juvenile hormone from male to female during mating in the *Cecropia* silkworm. *Experientia* 36, 682–683.
- Silva, M. N. 1988. Análises morfométricas em adultos de *Mischocyttarus (Kappa) atramentarius* Zikán, 1949 (Hymenoptera – Vespidae). *Boletim do Instituto de Ciências Biológicas e Geociências, Juiz de Fora* 41: 29–38.
- Silveira, O. T. 2002. *Mischocyttarus acunai* Alaio: A Caribbean member of the subgenus *Mischocyttarus* s. str. de Saussure (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae). *Natural History Bulletin of Ibaraki University* 6: 7-10.
- Silveira, O. T. 2008. Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 52(4): 510-549.
- Snodgrass, R. E., 1935. Principles of Insect Morphology. McGraw-Hill Book Company, New York and London.
- Stork, N. E. 1991. The composition of the arthropod fauna of Bornean lowland rainforest trees. *Journal of Tropical Ecology*,7, 161–180.
- Viscuso, R., Narcisi, L., Sottile, L. and Brundo, M. V. 2001. Role of male accessory glands in spermatodesm reorganization in Orthoptera Tettigonioidea. *Tissue and Cell* 33, 33–39.
- West-Eberhard, M. J. 1969. The social biology of Polistine wasps. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology of the University of Michigan*, v. 140, p. 1-110.
- Wheeler, D. E, Crichton, E. G. and Krutzsch, P. H. 1990. Comparative Ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.*206: 343–350

- Wheeler, D. E. and Krutzsch, P. H. 1992. Internal reproductive system in adult males of the genus *Camponotus* (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae). *Journal of Morphology* 211: 307-317.
- Wilson, E. O. 1971. *The insect societies*. Cambridge, Belknap Press, x+548p.
- Zama, U., Lino-Neto, J. and Dolder, H. 2004. Structural and Ultrastructural of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue Cell*. 1: 29-41.
- Zama U, Lino-Neto J, Melo SM and Dolder H 2005a. Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insect. Soc.* 52: 122-131.
- Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L. A. O., Dolder, H., and Bao, S. N. 2005b. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol Pathol.* 37: 313-321.