

MAX PEREIRA GONÇALVES

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Campoletis flavicineta*
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) E DE *Megastigmus transvaalensis*
(HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: TORYMIDAE)**

Tese apresentada á 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
2012**

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

T

G635m
2012

Gonçalves, Max Pereira, 1972-
Morfologia dos espermatozoides de *Campoletis flavicineta*
(Hymenoptera: Ichneumonidae) e de
Megastigmus transvaalensis (Hymenoptera: Chalcidoidea:
Torymidae) / Max Pereira Gonçalves. – Viçosa, MG, 2012.
xi, 49f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês

Orientador: José Lino Neto

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Inseto – Espermatozoides. 2. Vespa. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.7

MAX PEREIRA GONÇALVES

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Campoletis flavicineta*
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) E DE *Megastigmus transvaalensis*
(HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: TORYMIDAE)**

Tese apresentada á 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: 23 de novembro de 2012

Jane Carla Soares Moreira

Karina Carvalho Mancini

Uyrá dos Santos Zama

Vinícius Albano Araújo

**José Lino Neto
(Orientador)**

Dedico

Àquelas que mais me incentivaram, apoiaram e lutaram por mim,

À minha Mãe, Célia de Brito Pereira (*in memoriam*) e

À Minha Avó, Maria Bárbara Pereira (*in memoriam*)

Àqueles que me deram uma nova razão para lutar e iluminaram minha vida

À minha filha, Bárbara Célia Alves Pereira,

meus filhos, Max Pereira Gonçalves Filho e Arthur Freitas Pereira.

À minha esposa amada e querida, Érika de Freitas Silva Pereira

*“Sonho que se sonha só, é só um sonho
que se sonha só. Sonho que se sonha junto
é realidade”.*

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Meus Sinceros Agradecimentos:

À Universidade Federal de Viçosa, pela ótima estrutura e pelo ensino de excelência oferecido.

Ao Professor Doutor José Lino Neto, pela convivência amigável, pela orientação presente, pela amizade, pela confiança, tolerância, ensinamentos, enfim, por tudo que aprendi com ele, e não foi pouco.

Ao Professor Doutor Ivan Cruz, pela Co-orientação, pela paciência e pelo incentivo.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pela estrutura e ensinamentos, Karla, Gilmar e Patrícia.

A todos os professores do Departamento de Biologia Geral (U.F.V.) e em especial aqueles que foram meus mestres: Sérgio da Matta, Izabel, Cláudio, Clóvis, Everaldo, Mara, Elza e Serrão.

Aos Funcionários do Departamento de Biologia Geral (U.F.V.) e do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural (U.F.V.): Alex, Diana e Beth.

Aos membros da Banca Examinadora da Tese: Professor Doutor José Lino Neto, Doutora Jane Carla Soares Moreira, Professora Doutora Karina Carvalho Mancini, Professora Doutora Uyrá dos Santos Zama e Professor Doutor Vinícius Albano Araújo, pela disponibilidade, análises e sugestões.

À Universidade Vale do Rio Doce pela oportunidade profissional.

Aos meus colegas professores: Waleska Bretas, Sabrina, Nízia, Lourimar, Enara, Érika, João Batista, Denise, Lúcia Alves, Ivana, Mônica, entre outros, por antes de serem colegas de profissão terem me ensinado a ser um profissional, e em especial ao Nelson Saunders pelo exemplo profissional e amizade.

À minha família, Érika Freitas Silva Pereira, pelo companheirismo, amizade, apoio e amor, aos meus filhos, Bárbara Célia, Max Filho e Arthur que deram um novo sentido a minha vida, á minha Mãe, Célia, minha Vó Maria Bárbara e minha tia Alexandrina, por tudo que me ensinaram, pela dedicação, confiança, criação e incentivo nos momentos mais difíceis, meus Irmãos, Marcos Pereira Gonçalves e Riva Angelis Pereira da Silva, pela amizade, cumplicidade, incentivo e apoio constante, enfim a toda minha família materna e paterna, em especial à tia Cacilda.

Aos meus amigos de infância que são irmãos de coração: Bidico (Marcos Paulo Meireles) e Kiko (Jairo Henrique Pereira Filho), pelo incentivo e amizade fraterna.

Aos colegas que se tornaram amigos, irmãos por opção, pela amizade e companheirismo, em especial os amigos: Cláudia, Wagner, Kenner, Fernando e Marcos, por terem me ouvido nas horas de tédio. Ao casal que não deixou que eu desanimasse jamais, meus grandes amigos Edmilson e Luciane.

A segunda família que tenho em Valadares, Patrick e Vanessa, Juninho e Jane, Altamiro e Júlia, Bernadete e Agostinho, Sr. Nilson e todos os agregados e minha sogra Ruth, pelo apoio.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste projeto, que se tornaram parte da minha história, o meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

Max Pereira Gonçalves, filho de José Gonçalves Neto e Célia de Brito Pereira, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, Brasil, em 05 de outubro de 1972 e viveu até os 18 anos em Bom Jesus do Galho, Minas Gerais, Brasil.

Em dezembro de 1999, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), Governador Valadares – MG, Brasil. Durante o período de graduação, de 1996 a 1999, foi monitor da disciplina de Citologia e Histologia.

Em fevereiro de 2000 fui contratado para ministrar aulas de Citologia e Histologia pela UNIVALE, tornando-se professor de dedicação integral dois anos depois.

Em 2005, iniciei o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, Brasil, defendendo tese em fevereiro de 2007. Neste mesmo mês foi aprovado no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural da UFV e em novembro de 2012 defendeu tese de Doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO	Viii
ABSTRACT	Ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1 Ordem Hymenoptera.....	01
1.1.1 Subordem Apocrita.....	02
1.1.2 Superfamília Ichneumonidae.....	03
1.1.3 Superfamília Chalcidoidea.....	04
1.2 Espermatozoide dos Hymenoptera.....	05
2. OBJETIVOS	08
3. RESULTADOS	09
3.1 SPERMATOOA ULTRASTRUCTURE OF <i>Campoletis flavicincta</i> (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE).....	10
3.2 MORFOLOGIA DOS ESPERMATOOZOIDES DE <i>Megastigmus</i> <i>transvaalensis</i> (HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: TORYMIDAE).....	24
4. CONCLUSÃO GERAL	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

GONÇALVES, Max Pereira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2012. **MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Campoletis flavicincta* (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) E DE *Megastigmus transvaalensis* (HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: TORYMIDAE)**. Orientador: José Lino-Neto.

Neste trabalho descrevemos a morfologia dos espermatozoides de *Campoletis flavicincta* e *Megastigmus transvaalensis*. Há diferenças ultra-estruturais entre os espermatozoides e poucos trabalhos sobre a morfologia desta célula nas famílias estudadas. Na família Torymidae, este é o primeiro trabalho descrevendo a ultra-estrutura de espermatozoides e na família Ichneumonidae há poucos trabalhos sobre esta célula. Os espermatozoides de *C. flavicincta* são células finas e longas, medem aproximadamente 80 µm de comprimento e estão dentro da média observada em Ichneumonidae. Eles são formados por uma região de cabeça e uma de cauda. A região de cabeça é formada pelo acrossomo e o núcleo e uma camada extracelular que envolve todo acrossomo e parte do núcleo. O flagelo do espermatozoide é formado, em quase toda sua extensão, pelo axonema (9+9+2), dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios localizados entre o axonema e os derivados mitocondriais. Os espermatozoides de *M. transvaalensis* apresentam morfologia básica semelhante àquela de outros Chalcidoidea. São espiralados e formados pelas regiões de cabeça e de flagelo. A cabeça é formada pelos acrossomo e núcleo. O flagelo é formado por dois derivados mitocondriais iguais e um axonema de padrão 9 + 9 + 2. O estudo da ultra-estrutura dos espermatozoides dos Hymenoptera tem demonstrado a diversidade de informações que essas estruturas reprodutivas podem fornecer, as quais podem ser usadas em estudos de taxonomia e filogenia desse grupo de insetos logo, este trabalho tem como objetivo descrever a ultra-estrutura dos espermatozoides de *C. flavicincta* e *M. transvaalensis*.

ABSTRACT

GONÇALVES, Max Pereira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, november of 2012. **MORPHOLOGY OF SPERMATOOA OF *Campoletis flavicincta* (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE) AND *Megastigmus transvaalensis* (HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: TORYMIDAE)**. Adviser: José Lino-Neto.

In this work, the morphology of spermatozoa of *Campoletis flavicincta* and *Megastigmus transvaalensis*. In the families Ichneumonidae and Torymidae, ultrastructural differences are found between spermatozoa, but small quantity of works about your morphology. In the family Torymidae, this is the first work about the ultrastructure of spermatozoa and in the family Ichneumonidae, one of the first. The spermatozoa of *C. flavicincta* are long thin cells, measuring approximately 80 µm in length, within the range observed in Ichneumonidae. The spermatozoa have a head and a tail. The head is formed by the acrosome and nucleus and an extracellular layer surrounds totally the acrosome and partially the nucleus. The flagellum of spermatozoa are formed, almost its entire length, by axoneme (9+9+2), two mitochondrial derivatives and two bodies accessories located between the axoneme and mitochondrial derivatives. The spermatozoa of *M. transvaalensis* shows similar morphological characteristics to the others Chalcidoidea. They are spiral-like and are consisted of a head and a flagellum. The head is consisted of an acrosome and nucleus. The flagellum is formed for two mitochondrial derivatives and an axoneme with 9+9+2 microtubular arrangement. The ultrastructure of spermatozoa of Hymenoptera has demonstrated the diversity of information that these reproductive structure can provide, which can be used in phylogenetic and taxonomic studies of these groups of insects, so this work aims to describe the ultrastructure of spermatozoa of *C. flavicincta* and *M. transvaalensis*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Ordem Hymenoptera

Os Hymenoptera são o grupo de insetos com mais espécies benéficas para o homem, é uma ordem muito importante ecologicamente e economicamente, apesar das formigas cortadeiras, pertencentes a esta ordem, causarem enormes prejuízos na agricultura das regiões Neotropicais (Hanson, 1995). Um dos benefícios desta ordem, é que várias espécies pertencentes a ela são utilizados no controle biológico de pragas, já que concentra a maioria das espécies de insetos parasitóides e muitas espécies de predadores (Hanson, 1995).

A ordem Hymenoptera possui uma ampla distribuição, com mais de 145 mil espécies descritas (Huber, 2009) e mais de 100 famílias divididas no grupo 'symphyta' e na subordem Apocrita (Triplehorn & Johnson, 2005), porém, estimativas indicam que o número real pode ser entre 600.000 a 1.200.000 espécies (Gaston, 1991; Grissel, 1999; Austin & Downton, 2000). Os Hymenoptera são uma das quatro maiores ordens de insetos (Gallo et al., 2002), com grande diversidade biológica e número de espécies de importância econômica (Gaston, 1991). Os representantes desta ordem podem ser fitófagos, predadores, parasíticos ou uma combinação destas características (Hanson, 1995).

Hymenoptera parasitóides são bioindicadores originais porque são representativos da biodiversidade e sensíveis às perturbações ecológicas, especialmente pesticidas, o que possibilita perceber flutuações nas populações de parasitóides bem antes das demais populações (LaSalle & Gauld, 1992).

Os parasitóides, ao contrário dos parasitas, matam seus hospedeiros durante seu ciclo de vida, alimentando-se dos tecidos do seu hospedeiro, e causam, portanto, grande impacto na população destas espécies.

Diante da complexidade ambiental do local ocupado pelos parasitóides, encontrar um hospedeiro adequado pode ser uma tarefa complexa. Os parasitóides localizam seus hospedeiros, por meio de sinais, sejam eles, químicos, físicos e ou visuais (Jones, 1986). Quando se tem uma experiência bem sucedida, as respostas às substâncias voláteis relacionados com a localização e reconhecimento do hospedeiro modificam-se, levando a um comportamento voltado às características do hospedeiro específico (Vinson, 1976), este comportamento é comum entre os parasitóides e é denominado de aprendizagem associativa (Lewis & Tumlinson, 1988; Turlings et al., 1993).

O grupo “symphyta”, pertencente a ordem Hymenoptera, é um grupo parafilético, ou seja, artificial, contem o ancestral comum em que estão incluídos vários descendentes desse ancestral, porém não todos os descendentes, é um grupo que reúne os Hymenoptera mais basais (Gauld & Bolton, 1988; Naumann, 1991; Smith, 1993) sendo formado por quatro superfamílias (Gauld & Hanson, 1995).

1.1.1 Subordem Apocrita: Parasítica

A subordem Apocrita é derivada de “symphyta” e é considerada monofilética, ou seja, natural, é um clado que inclui todas as espécies derivadas de um ancestral comum, incluindo esse mesmo ancestral (Gauld & Hanson, 1995) e, é dividida em Aculeata e Parasítica.

Os Aculeata compreendem as abelhas, formigas e vespas, possui 19 famílias distribuídas em três superfamílias, Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea. As fêmeas dos Aculeata possuem um ferrão originado de modificações do ovopositor. As espécies deste grupo, podem ser predadora, no caso das vespas, ou alimentar-se de pólen, como ocorre nas abelhas e, nas espécies mais basais, é comum o parasitismo (LaSalle & Gauld, 1992).

O grupo Parasítica é formado por todos os Apocrita nos quais o ovopositor não foi modificado em ferrão e é considerado um grupo parafilético em relação a Aculeata (Gauld & Hanson, 1995). Este é o maior grupo dentre os Hymenoptera, sendo classificado em 48 famílias distribuídas em 11 superfamílias. A grande maioria das

espécies são parasitóides, existindo também espécies fitófagas e predadoras (Gaston, 1991).

As espécies do grupo Parasitica podem ser classificadas em três subgrupos: Evaniomorpha, Proctotrupomorpha e Ichneumonoidea. Este último foi sugerido como sendo o grupo irmão de Aculeata e, Evaniomorpha e Proctotrupomorpha juntos formam os Microhymenoptera (Rasnitsyn, 1988). Posteriormente, a proximidade entre Ichneumonoidea e Aculeata foi sustentada por análises filogenéticas (Ronquist et al., 1999) e moleculares (Dowton & Austin, 1994) porém, em um outro estudo é sugerido que Ichneumonoidea é grupo irmão de um Apocrita atual (Zessin, 1985). As subfamílias desta superfamília têm sido identificadas como monofilética (Gauld 1985; Wahl & Sharkey 1993; Wahl & Gauld 1998), mas suas relações não estão muito claras (Sharkey & Wahl 1992; Quicke, 1997; Ronquist, 1999).

As relações filogenéticas entre os principais grupos de Parasitica são mais confusas do que as relações no grupo “symphyta” e na subordem Aculeata mas, algumas superfamílias do grupo Parasítica possuem um monofiletismo bem estabelecido, como por exemplo, Ichneumonoidea e Chalcidoidea (Ronquist, 1999).

1.1.2 Superfamília Ichneumonoidea: Ichneumonidae

Ichneumonoidea é a maior superfamília dos Hymenoptera, são estimadas 100.000 espécies em todo o mundo (Gauld & Hanson 1995) em 48 famílias pertencentes a 10 superfamílias (LaSalle & Gauld, 1992). Os parasitóides dessa superfamília atacam preferencialmente os imaturos de Lepidoptera (Gauld & Bolton 1988; Wahl & Sharkey 1993).

Entre os representantes da superfamília Ichneumonoidea encontramos a família Ichneumonidae, que é a maior família dos Hymenoptera, as estimativas apontam para 60.000 espécies aproximadamente (LaSalle & Gauld, 1993), tem a maior diversidade entre as famílias desta ordem (Triplehorn & Johnson, 2005). A maioria dos Ichneumonidae, assim como ocorre com a superfamília, são parasitóides e atacam preferencialmente lagartas de Lepidoptera (Gauld & Bolton, 1988).

A espécie *Campoletis flavicincta*, objeto de estudo no presente trabalho, pertence à família Ichneumonidae. Os machos possuem aproximadamente 15 mm de envergadura e as fêmeas realizam a postura, preferencialmente, no interior de lagartas de instares iniciais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e por isso, esta

espécie tem se mostrada promissora como agente de controle biológico da lagarta-do-cartucho (Cruz et al., 1997). Durante o desenvolvimento larval de *C. flavicineta*, o parasitóide alimenta-se dos tecidos internos do hospedeiro, ao final do último instar, a larva rompe a cutícula da lagarta e logo após tece seu casulo no ambiente externo, onde ocorrerá a fase de pupa. Após a metamorfose surge uma vespa adulta (Cruz, 1995).

1.1.3 Superfamília Chalcidoidea: Torymidae

A segunda maior superfamília dos Hymenoptera é Chalcidoidea (Boucek, 1988; Grissell & Schauff, 1997), com aproximadamente 19.000 espécies descritas e uma distribuição cosmopolita (Noyes, 1990). Possui uma grande diversidade de hábitos alimentares, uma vez que as larvas de suas espécies podem variar desde herbívoras até carnívoras (Hanson & LaSalle, 1995). Como muitos representantes dos Chalcidoidea têm a capacidade de regular as populações de outros insetos, os mesmos são usados com sucesso no controle biológico e integrado de pragas agrícola (Rouault et al., 2004). Os Chalcidoidea podem apresentar colorações verde ou azul metálico, mas também são observadas espécies em tons de marrom e amarelo (Hanson & LaSalle, 1995).

A classificação dos Chalcidoidea em famílias apresenta controvérsias, o número de famílias variou desde as primeiras classificações de 21 (Boucek, 1988) a 20 famílias (Gibson et al., 1997; Grissell & Schauff, 1997), entre os representantes das famílias de Chalcidoidea encontramos a família Torymidae.

A família Torymidae possui 65 gêneros (Grissell, 1995) e 960 espécies descritas (Noyes, 2008). Estes calcidoideos podem ser parasitóides de ovos de Mantodea, Lepidoptera, Heteroptera, Homoptera e Coleoptera ou fitófagos (Grissell, 1995). O hábito fitófago representa, aproximadamente, 20% das espécies de insetos descritos (LaSalle & Gauld, 1991), este hábito ocorre, por exemplo, na espécie *Megastigmus transvaalensis*, também objeto de estudo deste trabalho, sendo este o primeiro trabalho que descreve o espermatozoide de uma representante da família Torymidae.

Os indivíduos machos da espécie *M. transvaalensis* medem de 2,3 a 2,9 mm, sendo a fêmea maior devido ao ovopositor. Algumas fases do ciclo de vida ocorrem, preferencialmente, no interior da semente da aroeira do campo e a eclosão ocorre de quatro a cinco dias após a ovoposição e o adulto emerge da semente após alguns meses (Milliron, 1949).

1.2 Espermatozoides dos Hymenoptera

Há várias dúvidas a respeito da filogenia dos Hymenoptera e o uso da análise de dados: morfológicos externos, moleculares e morfológicos internos, cujas características sofrem menos pressão do meio, como por exemplo, os espermatozoides, podem ajudar a elucidar estas dúvidas.

Os espermatozoides são considerados células conservativas, pois não sofrem pressão direta de mudanças ambientais, o material genético e a sua morfologia são espécie-específico e acompanham a evolução da espécie. Portanto, estas células podem fornecer informações importantes para ajudarem na interpretação de relações filogenéticas entre os táxons, sendo cada vez mais exploradas (Carcupino et al., 1995; Dallai e Afzelius, 1995; Jamieson et al., 1999).

O primeiro estudo comparativo da morfologia dos espermatozoides em Hymenoptera é de Quicke et al. (1992), neste trabalho o autor, faz uma matriz com 13 caracteres relacionados à estrutura dos espermatozoides, em 14 famílias de “symphyta”, Aculeata e Parasítica mas, nenhuma consideração filogenética utilizando esses caracteres foi proposta. Porém, Pereira et al. (2008), conseguiram identificar e agrupar machos e fêmeas de vespas pertencentes ao gênero *Idarnes*, utilizando caracteres morfológicos dos espermatozoides das espécies estudadas.

Os espermatozoides descritos dos Hymenoptera são semelhantes (Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999). Eles são finos e longos, medindo entre 8 μm (Quicke et al., 1992) a 1500 μm de comprimento (Zama et al., 2005), constituídos por regiões de cabeça e cauda (ou flagelo). A cabeça inclui o acrossomo, na porção anterior, e o núcleo e, na região de transição entre a cabeça e o flagelo observa-se o adjunto do centríolo. O flagelo é formado pelos axonema, derivados mitocondriais e corpos acessórios (Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999).

Em muitos Hymenoptera, o acrossomo é formado por duas estruturas: vesícula acrossomal e o perforatorium (Wheeler et al., 1990; Jamieson et al., 1999; Newman & Quicke, 1999a). Entretanto, em Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010), Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b;), Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b) e Bethyloidea (Quicke et al., 1992), assim como ocorre na maioria das vespas parasíticas, os espermatozoides estudados de

Ichneumonidae e Chalcidoidea apresentam uma camada extracelular, que recobre a região anterior da cabeça, ou seja, complexo acrossomal e parte do núcleo.

Os espermatozoides podem ser lineares, como ocorre em Ichneumonidae (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010) e em outros Hymenoptera do grupo Aculeata (Zama et al., 2001, 2004, 2005; Lino-Neto & Dolder 2002; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005 a, b; Mancini et al., 2006;). Diferente da maioria dos Hymenoptera, os espermatozoides descritos de Chalcidoidea apresentam núcleo, axonema e derivados mitocondriais espiralados (Wilkes & Lee, 1965; Hogge & King, 1975; Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder 2001a; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009).

A região de transição cabeça-flagelo é formada pelo adjunto do centríolo associado anteriormente ao núcleo e posteriormente ao axonema (Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto & Dolder, 2002) ou formada ainda pelas estruturas citadas mais um dos derivados mitocondriais (Fiorillo et al., 2008; Moreira et al., 2010; Oliveira et al., 2010).

O flagelo é composto por dois derivados mitocondriais e um axonema. Os derivados mitocondriais podem iniciar juntos (Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto & Dolder, 2002) ou um antes do outro (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). O flagelo pode possuir também dois corpos acessórios, estes são pequenos em diâmetro e longos no comprimento, possuem morfologia triangular, quando observados em corte transversal e, (Quicke et al., 1992; Mancini et al., 2006) situam-se entre os derivados mitocondriais e o axonema quando presente.

O axonema, ao longo do flagelo, é formado por nove microtúbulos acessórios simples, nove pares de microtúbulos periféricos e um par central (9+9+2), já na região final do flagelo, a sequência de término e desorganização do axonema varia, os nove microtúbulos acessórios podem estar presente (Zama et al., 2001, 2004, 2005) ou não, por terminarem antes da desorganização do axonema (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto & Dolder 2001b; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010), ou o par de microtúbulos central podem ser os primeiros a terminarem e depois os nove microtúbulos acessórios (Fiorillo et al., 2008) ou podem terminar somente os microtúbulos acessórios (Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Brito, et al., 2009).

Os espermatozoides dos Hymenoptera apresentam um padrão básico, mas é importante observar que há uma grande variação morfológica em torno desse padrão, o que justifica estudos sobre sua estrutura, composição bioquímica e fisiologia. Esses

estudos podem contribuir, de maneira significativa, para um melhor entendimento da biologia reprodutiva dos Hymenoptera e fornecerem caracteres que podem ser utilizados, juntamente com dados morfológicos tradicionais e moleculares, em análises filogenéticas, fazendo-se necessário o estudo da morfologia destas células, haja visto que, diante da grande diversidade desta ordem, os trabalhos existentes são pouco representativos nessa ordem, o que justifica mais estudos, para auxiliarem na compreensão da evolução e da biologia reprodutiva da ordem Hymenoptera.

2. OBJETIVOS

Os espermatozoides dos Hymenoptera apresentam uma variedade de caracteres morfológicos que podem ser utilizados como uma importante ferramenta em estudos de filogenia e sistemática de insetos. Considerando que há poucos trabalhos sobre os espermatozoides das superfamílias Ichneumonoidea e Chalcidoidea, este trabalho tem como objetivos:

- Descrever a ultra-estrutura dos espermatozoides de *Campoletis flavicineta* (Hymenoptera: Ichneumonoidea: Ichneumonidae).
- Descrever a ultra-estrutura dos espermatozoides de *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae) e fazer algumas considerações filogenéticas.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse trabalho originaram dois manuscritos.

3.1 - O primeiro manuscrito, intitulado “Spermatozoa Ultrastructure of *Campoletis flavicineta* (Hymenoptera: Ichneumonidae)”, descreve a morfologia dos espermatozoides da espécie citada, apresentando poucas variações em relação aos caracteres morfológicos dos espermatozoides dos Ichneumonidae já estudados. Este manuscrito foi submetido para publicação no periódico científico “Journal of Insect Science”.

3.2 - O segundo manuscrito, intitulado “Morfologia dos Espermatozoides de *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae)”, descreve a morfologia dos espermatozoides da espécie citada, apresentando características comuns aos Chalcidoidea estudados. Este manuscrito está em fase final de preparação para submissão.

3.1

SPERMATOOA ULTRASTRUCTURE OF *Campoletis flavicineta*
(HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)

Max Pereira Gonçalves^{1,2}, Claudia Miranda de Oliveira¹, Ivan Cruz³, José Lino-Neto¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ²Universidade Vale do Rio Doce, Faculdade de Ciências da Saúde, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. ³EMBRAPA, Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

Manuscrito submetido ao periódico científico “Journal of Insect Science”.

Abstract

Spermatozoa of *Campoletis flavicineta* are long and thin cells, approximately 80 μm in length, which is about average among Ichneumonidae. They consist of head and flagellum regions. The head region is formed by the acrosome, nucleus and an extracellular layer surrounding the entire acrosome and part of the nucleus. The acrosome is formed by the acrosomal vesicle and the perforatorium, where the perforatorium fits into a lateral cavity on the nucleus, a characteristic that differs from other Ichneumonidae. The flagellum consists of, in almost its entire extension, the axoneme (9+9+2), two mitochondrial derivatives and two accessory bodies located between the axoneme and mitochondrial derivatives. In the nucleus-flagellum transition region is observed the centriole adjunct. The end region of the flagellum is formed only by the axoneme (9+2), without the presence of accessory microtubules since they are the first to terminate. The spermatozoa studied present similarities to the spermatozoa of other Ichneumonidae, but with some characteristics unique to *C. flavicineta*, including the linkage of the perforatorium to the nucleus and one accessory body in the nucleus-flagellum transition region.

Keywords: Sperm, parasitoid, Ichneumonidae.

Introduction

The order Hymenoptera has more than 145,000 described species and more than 100 families distributed in the group 'sawfly' and suborder Apocrita (Huber, 2009). Apocrita is divided into Aculeata and Parasitic, which represents about half of the parasitic species described for Hymenoptera. Many species of this group have parasitoid behavior, but phytophagous, galling and predator species also exist, most of which belong to the superfamilies Ichneumonoidea and Chalcidoidea (La Salle and Gauld, 1992). Among Ichneumonoidea, the family Ichneumonidae is one of the largest and most diverse within Hymenoptera (Triplehorn and Johnson, 2005). Most of Ichneumonidae consists of parasitoids of other insects that prefer to attack the immature stages of Lepidoptera (Gauld and Bolton, 1988). The species *Campoletis flavicineta* belongs to the family Ichneumonidae. The males have a wingspan of about 15 mm and the females are larger (when including the ovipositor) and preferably oviposit within the early instars larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Immediately prior to pupation, the larva leaves the body of the caterpillar to build its cocoon in the external environment (Matos Neto, 2003).

Phylogenetic analysis using morphological characteristics of the spermatozoa is an important tool in insect systematics (Dallai and Afzelius, 1995; Jamieson et al., 1999). Few studies exist on Ichneumonidae spermatozoa morphology (Chauvin et al. 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al. 2010). Additional studies are necessary since the characters (generated from the description ultra structural of the spermatozoa) have shown promise in insect systematics and could unravel the evolutionary relationships among groups. Therefore, this work aims to describe the ultrastructure of *C. flavicineta* spermatozoa and compare them to spermatozoa of other Ichneumonidae.

Materials and Methods

Animals

This experiment used 40 sexually mature males of *Campoletis flavicincta*, with an average age of two days, obtained from the insect rearing facility of EMBRAPA corn and sorghum in Sete Lagoas, Minas Gerais State, Brazil.

Light microscopy

The vas deferens of ten individuals were dissected and opened on histological slides to scatter the spermatozoa. These were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for about 15 min. After washing with distilled water and drying at room temperature, slides were observed and photographed under a light microscope (Olympus BX60) equipped with a dark field.

Transmission Electron Microscopy

Twenty individuals had their vases deferens fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid, 3% sucrose and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for approximately 24 h. The material was post-fixed in a 1% osmium tetroxide solution for 2 h, dehydrated with an ethanol series, and then infiltrated and embedded in Epon 812 resin.

Ten individuals had their vas deferens removed and fixed in 2.5% glutaraldehyde and 1% tannic acid in 0.1 M sodium phosphate buffer, supplemented with 1.5% sucrose and 5 mM CaCl₂ for 5 days at 4°C (Dallai and Afzelius, 1990). After washing in this buffer, the vasa deferentia were contrasted in an aqueous solution of 1% uranyl acetate for 2 h at room temperature. Finally, they were dehydrated in an increasing ethanol series, infiltrated and included in Epon 812 resin.

Ultrathin sections were observed and photographed under a transmission electron microscope (Zeiss EM 109), at the Center for Microscopy and Microanalysis of the Federal University of Viçosa (Universidade Federal de Viçosa-UFV), Viçosa, Minas Gerais State, Brazil.

Results

Spermatozoa of *Campoletis flavicincta* are long and thin, measuring 80 μm on average and formed by the head and flagellum regions (Fig. 1A). An extracellular layer surrounds the entire acrosome and anterior region of the nucleus (Fig. 1B-G) and has filamentous structures extruding outward. The acrosome is formed by the acrosome vesicle and perforatorium (Fig. C, E and F). In the anterior region of the acrosome the acrosomal vesicle is ellipsoidal and the perforatorium is circular as viewed in cross-section (Fig. 1F), however the posterior region is beveled and complementary to the anterior extremity of the nucleus (Fig. 1E). The acrosome vesicle surrounds the perforatorium until the anterior end of the nucleus (Fig. 1C, E and F).

The nucleus is long and electron dense; the anterior extremity is asymmetric and protrudes laterally to the posterior end of the perforatorium. Its anterior region is surrounded by the extracellular layer (Fig. 1E and G). Near the acrosome, the nucleus presents a C-shape (Fig. 1D), becoming oval along its length (Fig. 1G and H) when viewed from a cross-section.

The head-flagellum transition region is formed by the centriole adjunct, two accessory bodies and the axoneme. The base of the nucleus is located at the beginning of the transition region and the anterior extremity of the major mitochondrial derivative is at the end of this region (Fig. 1I and J). From a cross-section the centriole adjunct is oval-shaped and more electron-dense along its border when using tannic acid and glutaraldehyde (Fig. 1J), and totally electro-dense and triangular when using only glutaraldehyde (Fig. 1I).

The flagellum is formed almost exclusively along its length by two mitochondrial derivatives, two accessory bodies and the axoneme (Fig. 2A). The end region it is formed only by the axoneme. Mitochondrial derivatives are equal in shape and diameter, exhibiting an oval morphology in cross-section (Fig. 2A). These mitochondrial derivatives start at different heights, one at the base of the nucleus (Fig. 1J) and the other at the base of the centriole adjunct, however one is longer than the other. They terminate nearly together, close to the final region of the flagellum (Fig. 2A). Along the flagellum it is possible to observe changes in the diameter of the mitochondrial derivatives, which start with a smaller diameter that increases along their length before becoming smaller in the final region of the flagellum (Fig. 2A).

The accessory bodies are small, electron-dense, triangular structures. One accessory body was observed in the nucleus-flagellum transition region between the axoneme and mitochondrial derivative and centriole adjunct (Fig. 1J). In the flagellum the accessory bodies are located between the axoneme and mitochondrial derivatives (Fig. 2A).

The axoneme is formed from nine accessory microtubules, nine pairs of peripheral microtubules and a pair of central microtubules (9+9+2) (Fig. 1J and 2A). It starts in the nucleus-flagellum transition region (Fig. 1J) and is the last structure to terminate in the flagellum (Fig. 2B). The 9+9+2 organization is undone in the final region of the flagellum, where the nine accessory microtubules terminate first. One microtubule is also attached to the flagellum by a plasma membrane (Fig. 2B).

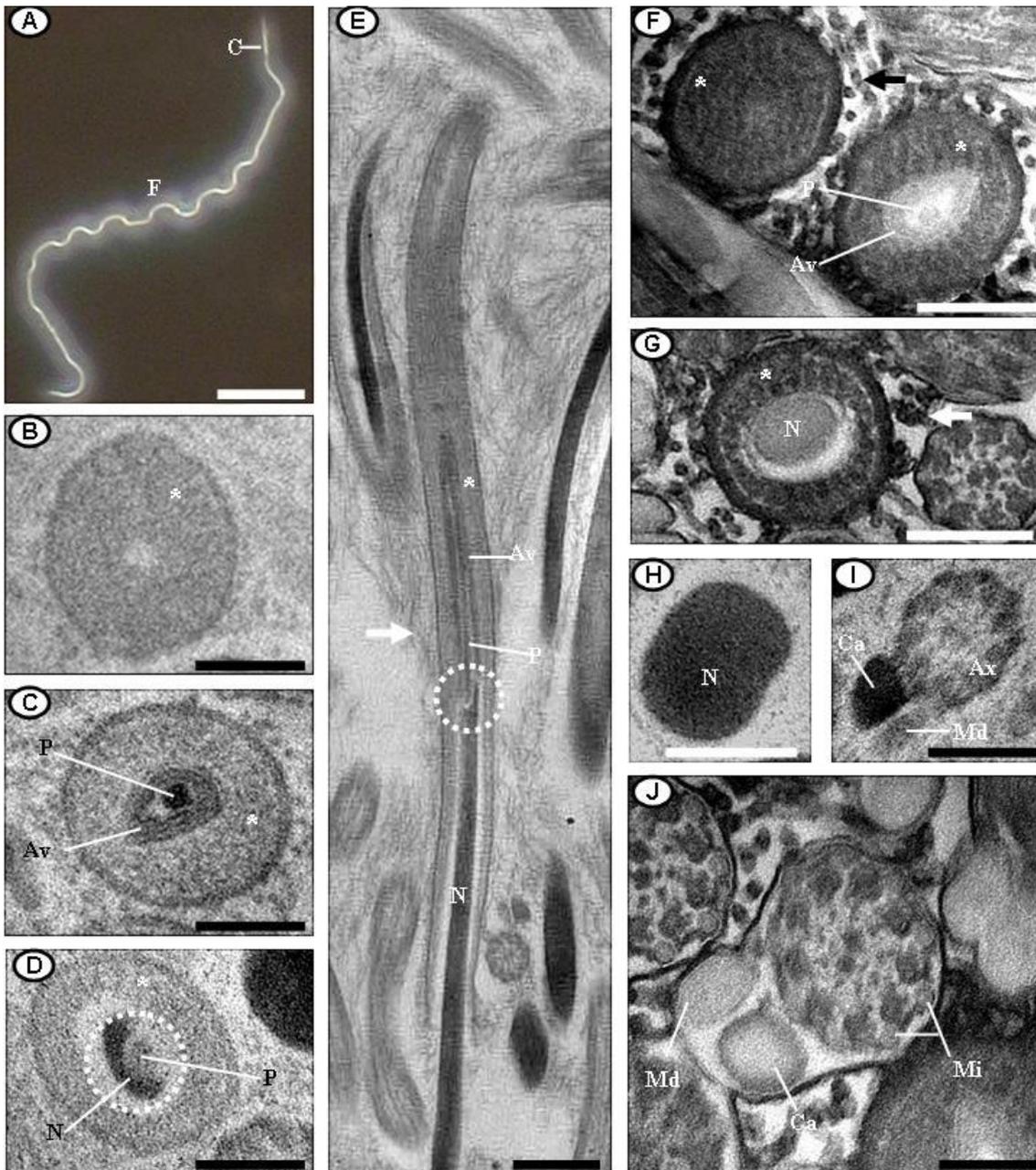


Figure 1. Photomicrographs of light (A) and transmission electron microscopy (B-I) of spermatozoa of *C. flavicincta*.

A. Microscope equipped with a dark field, indicating the head (c) and flagellum (F). Bar = 10 μ m.

B-D and F-H. Cross-sections of the head, from the anterior to posterior regions. Extracellular layer (*) from which filamentous structures irradiate (arrow), perforatorium (P), acrosomal vesicle (Av), lateral insertion of the perforatorium in the nucleus (circle) and nucleus (N). Bars: 0,17 μ m (B), 0,13 μ m (C), 0,12 μ m (D), 0,30 μ m (F), 0,20 μ m (G) and 0,10 μ m (H). F-G glutaraldehyde and tannic acid.

E. Longitudinal section of the anterior region of the head. It is possible to observe the perforatorium (P), acrosomal vesicle (Av), extracellular layer (*), filamentous structure (arrow), nucleus (N) and lateral insertion of the perforatorium in the nucleus (circle). Bar = 0,40 μ m.

I and J. Cross-sections of the nucleus-flagellum region with one mitochondrial derivative (Md), centriole adjunct (Ca), axoneme (Ax), accessory microtubules (Mi) and accessory bodies (Ab). Bars: 0,20 μ m (I) and 0,10 μ m (J). F, G and J glutaraldehyde and tannic acid.

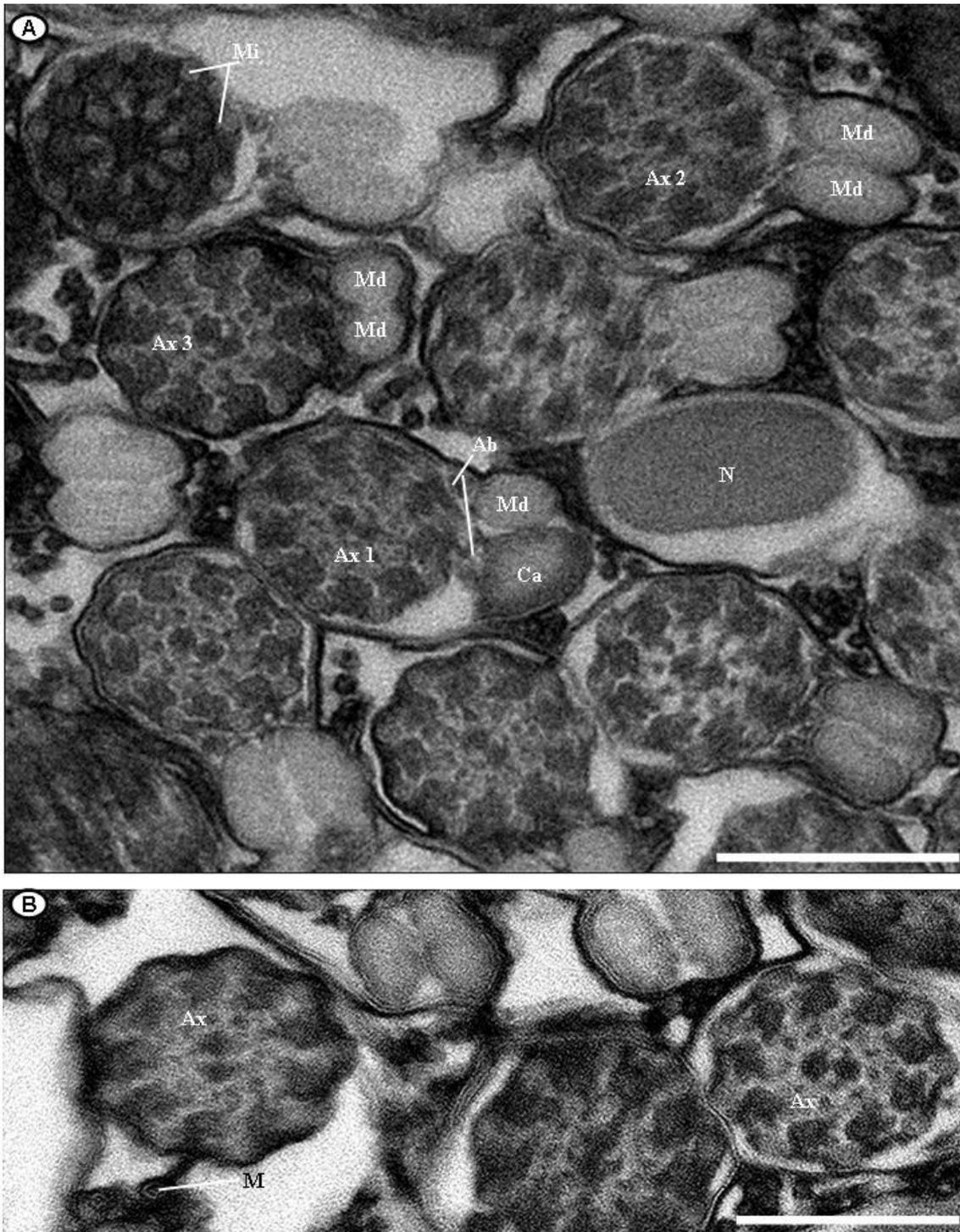


Figure 2. Transmission electron photomicrographs of flagella of the spermatozoa of *C. flavicineta*. glutaraldehyde and tannic acid.

A. Cross-sections of the flagella. Initial region of the flagellum (Ax 1), intermediate region (Ax 2) and region near the end of the flagellum (Ax 3). Observe the mitochondrial derivatives (Md), axoneme (Ax 1-3), accessory microtubules (Mi), centriole adjunct (Ca), nucleus (N), and accessory bodies (Ab). Bar = 0,25 μm .

B. Cross-section of the final region of the flagellum. Observe the axoneme (Ax) and microtubules (M) in the final region of the flagellum. Bar = 0,20 μm . A e B glutaraldehyde and tannic acid.

Discussion

Spermatozoa of *Campoletis flavicincta*, measuring 80 μm in length, are within the average observed for the family Ichneumonidae, which range from 55 to 140 μm (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). Another feature of the spermatozoa of *C. flavicincta* that occurs in other Ichneumonidae is their linearity (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). This last characteristic is present in other Hymenoptera of the Aculeata group (Zama et al., 2001, 2004, 2005; Lino-Neto and Dolder 2002; Araújo et al., 2005; Fiorillo et al., 2005 a, b; Mancini et al., 2006), but that is different from the parasitic wasps *Trichogramma dendrolimi* (Lino-Neto and Dolder, 2001b) and *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto et al., 1999) which possess coiled spermatozoa.

The extracellular layer surrounding the acrosome and initial region of the nucleus, observed in the spermatozoa of *C. flavicincta*, was also observed in other Ichneumonidae (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010), some Cynipoidea (Quicke et al., 1992; Newman and Quicke 1999) and in Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto and Dolder 2001a;), all of which belong to the group of parasitic wasps. The spermatozoa of *C. flavicincta* contain filamentous structures that radiate from the extracellular layer, as found in other parasitic Ichneumonidae (Moreira et al., 2010) and in Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000).

The acrosome of *C. flavicincta*, as in other Ichneumonidae, is formed by the acrosome vesicle and perforatorium (Chauvin et al., 1988; Moreira et al., 2010). The acrosomal vesicle has an ellipsoidal shape in cross-section. It is long and surrounds the perforatorium until the region anterior to the nucleus, with the same being observed in other Ichneumonidae (Chauvin et al., 1988; Moreira et al., 2010). The perforatorium of *C. flavicincta* is an electron-dense structure, similar to other Ichneumonidae (Chauvin et al., 1988; Moreira et al., 2010), but in the Chalcidoidea *Melittobia hawaiiensis*, *Melittobia australica* (Brito et al., 2009), *T. dendrolimi* (Lino-Neto and Dolder, 2001b), *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) the perforatorium is not observed. The perforatorium fits into a lateral cavity on the anterior extremity of the nucleus of *C. flavicincta*, while in other Ichneumonidae the perforatorium fits into a cavity located at the anterior extremity in the middle of the nucleus (Chauvin et al., 1988; Moreira et al., 2010).

The nucleus of the spermatozoa of *C. flavicineta* is compact, with homogeneous chromatin and electron-dense along its entire length, as found in other Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). However, in the Ichneumonidae *Diadromus pulchellus*, electron-lucid regions were found in the anterior region of the center of the nucleus (Chauvin et al., 1988). Variations in chromatin compaction are observed in Hymenoptera, where some species may exhibit compact chromatin but with electron-lucid regions (Lino-Neto and Dolder, 2002; Fiorillo et al., 2005a), others loose chromatin throughout the nucleus (Zama et al., 2004; Gracielle et al., 2009) or loose chromatin only in the nuclear base and peripheral regions (Oliveira et al., 2010).

The centriole adjunct of spermatozoa of *C. flavicineta* is an elongated structure that starts at the base of the nucleus along with one of the two mitochondrial derivatives and terminates above the minor mitochondrial derivative, as observed in other Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010), however in the Chalcidoidea *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999), *T. pretiosum* and *T. atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) the centriole adjunct starts in the region posterior and lateral to the nucleus and ends above the anterior extremity of the two mitochondrial derivatives.

Flagella of *C. flavicineta* consist of two mitochondrial derivatives, two accessory bodies and the axoneme. Mitochondrial derivatives start at different heights; the major mitochondrial derivative begins at the base of the nucleus and the minor derivative at the base of the centriole, as observed in other Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). However, in Formicidae (Lino-Neto and Dolder, 2002) and Eurytomidae (Lino-Neto et al., 1999) the mitochondrial derivatives start together. The mitochondrial derivatives of *C. flavicineta* are symmetrical in diameter as observed in other Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010), and Formicidae (Lino-Neto and Dolder, 2002). In the Ichneumonidae *Pachysomoides* sp, mitochondrial derivatives are asymmetric (Moreira et al., 2010). Mitochondrial derivatives of *C. flavicineta* terminate together, as in other Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). However in the Formicidae *Solenopsis invicta* (Lino-Neto and Dolder, 2002) and the Chalcidoidea *M. hawaiiensis* and *M. australica* (Brito et al., 2009), one mitochondrial derivative terminates before the other.

Spermatozoa of *C. flavicineta* present accessory bodies with a small diameter and long, irregular morphology. One accessory body was observed in the nucleus-flagellum transition region between the axoneme and mitochondrial derivative and centriole adjunct. The spermatozoa differ from the Ichneumonidae *Lyneon dieloceri*

and *Pachysomoides* sp. (Moreira et al., 2010) that do not have accessory bodies in the nucleus-flagellum transition region, and from the Bethyilidae *Prorops nasuta*, which presents one accessory body between the axoneme and mitochondrial derivative in this region (Oliveira et al., 2010). In the flagellum, the accessory bodies are located between the axoneme and mitochondrial derivatives, as occurs in other Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010).

The axoneme of the spermatozoa of *C. flavicincta* has nine accessory microtubules, nine pairs of peripheral microtubules and one central pair, characteristic of most insects (Jamieson et al., 1999) as well as Hymenoptera in general (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto and Dolder, 2001b; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010). In *C. flavicincta* the accessory microtubules terminate first, as occurs in other parasitic wasps, e.g. the Ichneumonidae *Digelasinus diversipes* and *Pachysomoides* sp. (Moreira et al., 2010) and the Chalcidoidea *M. hawaiiensis*, *M. australica* (Brito et al., 2009), *T. dendrolimi* (Lino-Neto and Dolder, 2001b), *T. pretiosum*, *T. atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) and *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999). In Acuelata, however, the accessory microtubules are the last to terminate (Zama et al., 2001, 2004, 2005).

Most structures found in *C. flavicincta* are observed in other Hymenoptera. Some features, such as a third layer extending to the nuclear region, are observed in parasitic wasps and Crysidoidea (Oliveira et al., 2012, unpublished data). The thin nucleus with a lateral cavity for the perforatorium was observed only in *C. flavicincta*. In other Ichneumonidae and in Hymenoptera in general, the perforatorium fits into a cavity at the anterior and middle region of the nucleus. One accessory body was observed in the nucleus-flagellum transition region, which was not the case in other Ichneumonidae studied. Studies of the structure and ultrastructure of spermatozoa of Hymenoptera demonstrate the wide morphological diversity of this cell and indicate that they remain conserved within the taxa, as observed in the Ichneumonidae studied. Therefore, it may be used as a tool in systematics and phylogeny.

Acknowledgments

The authors are grateful to Núcleo de Microscopia e Microanálise of the UFV. This research was supported by the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References

- Araújo VA, Zama U, Dolder H, Lino-Neto J. 2005. Morphology and Itrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphology Sciences* 22 (3): 137-141.
- Brito P, Lino-Neto J, Dolder H. 2009. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue & Cell* 41: 113-117.
- Chauvin G, El Agoze M, Hamon C, Huignard J. 1988. Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 17: 359-366.
- Dallai R, Afzelius BA. 1995. Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. *Me´moires du Museum National d’Histoire Naturelle* 166: 301–310.
- Dallai R, Afzelius BA. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *Journal Struct Biol* 103: 164-179.
- Fiorillo BS, Coelho AAM, Lino-Neto J, Bao SN. 2005a. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology* 37: 75-81.
- Fiorillo BS, Lino-Neto J, Bao SN. 2005b. Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22 (Suppl.): 60-61.
- Gauld ID, Bolton B. 1988. The Hymenoptera. *Oxford: Oxford University*.
- Gracielle IMS, Fiorillo BS, Lino-Neto J, Bao SN. 2009. Morphologia of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). *Micron* 1337: 1-7.
- Huber, J.T., 2009. Biodiversity of Hymenoptera. Pp. 303e323. In: Foottit, R., Adler, P. (Eds.), Insect Biodiversity. *Blackwell, Oxford, UK*
- Jamieson BGM, Dallai R, Afzelius BA. 1999. Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny. *Scientific Publishers, Enfield, New Hampshire, USA*.

- La Salle J, Gauld ID. 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: J. LaSalle & I. D. Gauld (eds) Hymenoptera and Biodiversity. *CAB International* UK p. 1-26.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001a. Ultrastructural characteristics of the permatzoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto J, Dolder H. 2001b. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica Stockholm* 82: 159-164.
- Lino-Neto J, Dolder H. 2002. Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue and Cell* 34: 124.
- Lino-Neto J, Báo SN, Dolder H. 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica* 81: 205-211.
- Lino-Neto J, Báo SN, Dolder H. 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 28: 253-259.
- Mancini K, Lino-Neto J, Campos LAO, Dolder H. 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 53: 333-338.
- Matos Neto FC. 2003. Estudos sobre *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae), parasitóide de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho (*Zea mays*). 93p. *Tese(Doutorado)* - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Moreira J, Araújo VA, Báo SN, Lino-Neto J. 2010. Structural and ultrastructural characteristics of male reproductive tract and spermatozoa in two Cryptinae species (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Micron* 41: 187-192.
- Newman TM, Quicke DLJ. 1999. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 35-47.
- Oliveira CM, Mancini K, Dolder H, Lino-Neto J. 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethylidae). *Tissue and Cell* 42: 242-246.
- Quicke DLJ, Ingram SN, Baillie HS, Gaitens PV. 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta* 21: 381-402.

- Triplehorn CA, Johnson NF. 2005. Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. Belmont, *Thomson- Brooks/Cole* p. 864.
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research* 10: 261-270.
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H. 2004. Structural and Ultrastructural of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue & Cell* 1: 29-41.
- Zama U, Lino-Neto J, Melo SM, Campos LAO, Dolder H. 2005. Ultrastructural characterization of spermatozoa in *Euglossini bees* (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux* 52 (2): 122-131.

3.2

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES DE *Megastigmus transvaalensis*
(HYMENOPTERA: CHALCIDOIDEA: TORYMIDAE)**

Max Pereira Gonçalves^{1,2}, José Lino Neto¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ²Universidade Vale do Rio Doce, Faculdade de Ciências da Saúde, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

Manuscrito em fase final para ser submetido em periódico científico.

Resumo

Os espermatozoides do Torymidae *Megastigmus transvaalensis* são os primeiros espermatozoides descritos da família citada, apresentam morfologia básica semelhante àquela de outros Chalcidoidea. São células espiraladas e formadas pelas regiões de cabeça e de flagelo. A cabeça é formada pelos acrossomo e núcleo. No acrossomo tem-se a vesícula acrossomal e o perforatorium. Este último tem sua base encaixada em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo. O acrossomo e parte do núcleo são revestidos por uma camada extracelular. O núcleo possui uma cromatina homogênea e compacta. A região de transição cabeça-flagelo é formada na maior parte de sua extensão pela base nuclear e adjunto do centríolo, e próximo ao flagelo observa-se ainda axonema e um dos dois derivados mitocondriais. O flagelo é formado por dois derivados mitocondriais iguais e um axonema de padrão $9 + 9 + 2$ (nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e um par central). Na região final do flagelo, o axonema é de padrão $9 + 2$ (nove microtúbulos periféricos e um par central) e logo em seguida o axonema encontra-se sem o par de microtúbulos central, sendo formado apenas pelos nove pares de microtúbulos periférico. As características do espermatozoide da espécie estudada, como células espiraladas, camada extracelular e a ordem de desorganização do axonema podem ser utilizados em comparações filogenéticas das superfamílias da subordem Apocrita, enquanto que a região de transição cabeça-flagelo, devido a sua variedade de combinações nestas células, pode ser utilizada em considerações filogenéticas das famílias desta subordem.

Palavras-Chave: Parasitóide, filogenia, aroeira.

Introdução

A ordem Hymenoptera possui uma distribuição cosmopolita e possui 145 mil espécies descritas (Huber, 2009) e mais de 100 famílias divididas no grupo 'symphyta' e na subordem Apocrita (Triplehorn & Johnson, 2005), tem grande diversidade biológica e possui o maior número de espécies de importância econômica (Gaston, 1991).

A subordem Apocrita é dividida em Aculeata e Parasitica. O grupo Parasitica representa aproximadamente metade das espécies descritas para Hymenoptera e a maioria delas possui comportamento parasitóide, mas há também espécies fitófagas, galhadoras e predadoras (LaSalle & Gauld, 1992). Os Chalcidoidea são a segunda maior família dos Hymenoptera, estão distribuídos em 21 famílias (Boucek, 1988; Grissel & Schauff, 1990) e possuem uma grande diversidade de hábitos alimentares, uma vez que as larvas de suas espécies podem variar desde herbívoras até carnívoras, sendo usadas no controle biológico de pragas (Rouault et al., 2004).

O gênero *Megastigmus* pertence à família Torymidae (Chalcidoidea) e apresenta uma ampla distribuição mundial (Rouault et al., 2004). Os indivíduos da espécie *Megastigmus transvaalensis*, objeto de estudo deste trabalho, apresentam um padrão que alternam as cores amarelo e marrom. O macho mede de 2,3 a 2,9 mm, sendo a fêmea maior devido ao ovopositor. A fêmea deposita ovos, preferencialmente, na semente da aroeira do campo (*Schinus terebinthifolius* Raddi - Anacardiaceae), de onde emerge um indivíduo maduro. *M. transvaalensis* pode ser utilizado em controle biológico desta planta em locais onde a mesma é considerada exótica (Milliron, 1949).

Há poucos trabalhos relacionados à ultra-estrutura dos espermatozoides de Chalcidoidea (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a, Fiorillo et al., 2008) e nenhum sobre a família Torymidae. Os estudos existentes na superfamília apontam que estas células apresentam uma variedade de caracteres ultra-estruturais que podem ser utilizados em trabalhos para ajudar a resolver problemas de classificações filogenéticas.

Os espermatozoides dos Hymenoptera descritos são células finas e longas, medem de 8 µm em *Meteorus* sp. (Braconidae) (Quicke et al., 1992) a 1.500 µm em *Euglossa mandibularis* (Apidae) (Zama et al., 2005), sendo constituídos por uma região de cabeça e pelo flagelo. A cabeça é formada, na região anterior, pelo acrossomo, este por sua vez é formado pela vesícula acrossomal e perforatorium e, na região posterior é

formada pelo núcleo (Wheeler et al., 1990; Jamieson et al., 1999; Newman & Quicke 1999a; Zama et al., 2001; Lino-Neto & Dolder 2002). Na maioria das vespas parasíticas, como por exemplo, os Chalcidoidea, a cabeça apresenta uma camada extracelular que reveste o acrosso e a região inicial do núcleo (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009).

A região de transição cabeça-flagelo apresenta uma grande diversidade de caracteres, pode ser formada pelo núcleo e adjunto do centríolo (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Brito et al., 2009) ou sem a presença do núcleo (Fiorillo et al., 2008). O flagelo é formado por dois derivados mitocondriais, dois corpos acessórios e axonema (Newman & Quicke, 1999a; Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto & Dolder 2001b; Zama et al., 2001).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo descrever a ultra-estrutura do espermatozoide de *M. transvaalensis*, fazer algumas considerações filogenéticas e fornecer caracteres para serem utilizados nestas classificações.

Material e Métodos

Materiais

Foram Utilizados 10 machos sexualmente maduros de *Megastigmus transvaalensis*, coletados em sementes de aroeira (*Schinus terebinthifolius*), no município de Campinas, S.P., Brasil.

Métodos

Os indivíduos tiveram suas vesículas seminais dissecadas e posteriormente fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl_2 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por cerca de 24 horas. O material foi então pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratado em série crescente de etanol, infiltrado, e finalmente, incluído em resina Epoxi (Epon 812).

Os cortes ultrafinos foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

Resultados

Os espermatozoides de *Megastigmus transvaalensis* são espiralados, finos e longos, formados por cabeça e flagelo. A cabeça é formada, na região anterior, pelo acrossomo e a região inicial do núcleo, ambos revestidos por uma camada extracelular (Fig. 1A e B) e, a região posterior, é formada apenas pelo núcleo (Fig. 1A, B e C).

O acrossomo é formado pela vesícula acrossomal e pelo perforatorium. A vesícula acrossomal reveste o perforatorium até a região anterior ao núcleo, sendo o encaixe do perforatorium no núcleo em uma cavidade localizada na região anterior e mediana do núcleo (Fig. 1A e B).

O núcleo é longo, fino e eletrondenso (Fig. 1B e C) e, em corte transversal, apresenta-se circular (Fig. 1C). Na região de transição cabeça-flagelo o mesmo é helicoidal juntamente com o adjunto do centríolo (Fig. 1E). O núcleo, na região de transição cabeça-flagelo, diminui de diâmetro à medida que se aproxima do flagelo, até terminar junto à região inicial do axonema (Fig. 1D, E, F, G e H).

A região de transição cabeça-flagelo é formada, inicialmente, pelo adjunto do centríolo e pelo núcleo (Fig. 1F). O adjunto do centríolo inicia-se em diâmetro menor e, quando se aproxima do flagelo, o diâmetro aumenta (Fig. 1D, F, G e H). Após o término do núcleo, observa-se o adjunto do centríolo lateral ao axonema (Fig. 1I) e logo em seguida inicia-se um derivado mitocondrial, fazendo parte desta região (Fig. 1J).

O flagelo é formado, em quase toda sua extensão, por dois derivados mitocondriais e o axonema (Fig. 2A e B), e na região final ele é formado apenas pelo axonema (Fig. 2D e E). Os derivados mitocondriais são similares, com diâmetro circular quando observados em corte transversal (Fig. 2B). Em corte longitudinal os mesmos são observados em espiral em torno do axonema (Fig. 2A). Os derivados mitocondriais iniciam em alturas diferentes, um inicia-se logo abaixo da base do núcleo, junto ao adjunto do centríolo (Fig. 1E e J) e o outro se inicia no começo do flagelo, abaixo da base do adjunto do centríolo (Fig. 2A). Eles terminam separados, antes do axonema perder sua organização inicial (Fig. 2C).

O axonema é formado por nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulos centrais (9+9+2) (Fig. 2B). Ele inicia-se junto à base do núcleo (Fig. 1E, I e 2A) e é a última estrutura a terminar no flagelo (Fig. 2D e E). A organização 9+9+2 se desfaz próximo a região final do flagelo,

os nove microtúbulos acessórios terminam primeiro (Fig. 2D), em seguida o par de microtúbulos centrais (Fig. 2E).

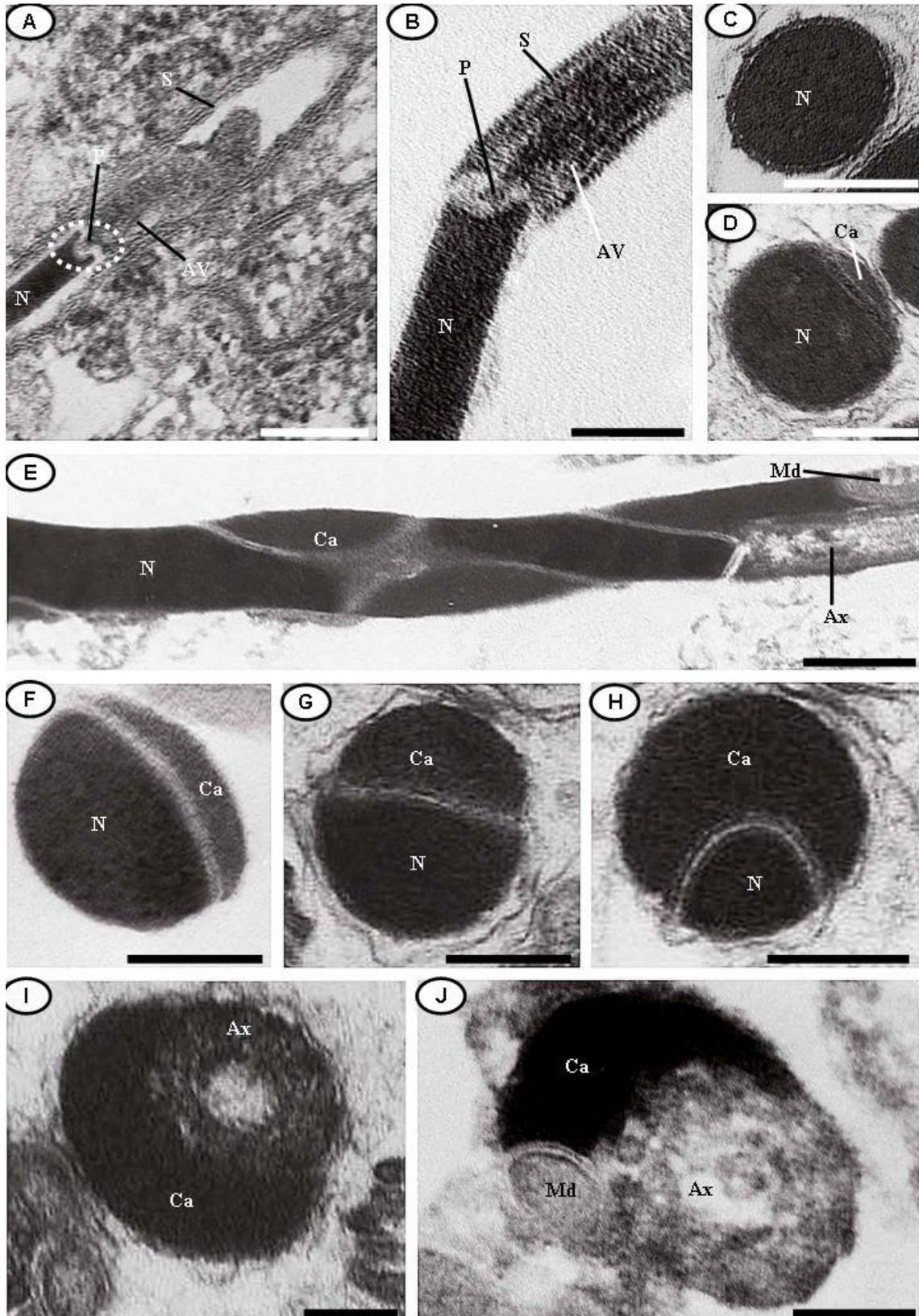


Figura 1. Fotomicrografias eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. transvaalensis*.

A e B. Corte longitudinal da região inicial da cabeça. Núcleo (N), perforatorium (P), vesícula acrossomal (Av), local de encaixe do perforatorium no núcleo (círculo) e camada extracelular (S).

C. Corte transversal do núcleo. Núcleo (N).

D, F, G, H, I e J. Cortes transversais da região de transição cabeça-flagelo. Núcleo (N), adjunto do centríolo (Ca), axonema (Ax) e derivado mitocondrial (Md).

F. Região de transição cabeça-flagelo, em corte longitudinal. Núcleo (N), adjunto do centríolo (Ca), axonema (Ax) e derivado mitocondrial (Md).

Barras: A, C, D, F, G e H = 0,20 μm ; B e E = 0,30 μm ; I e J = 0,10 μm .

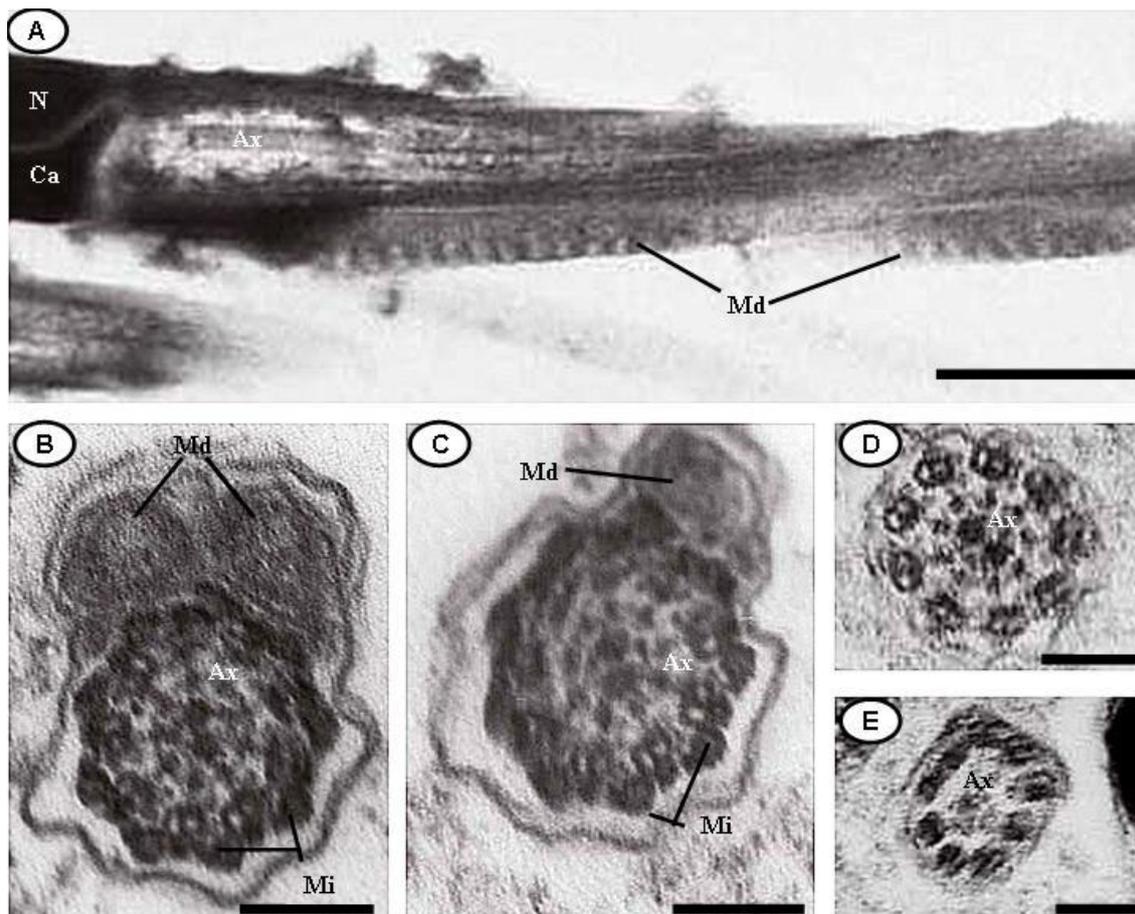


Figura 2. Fotomicrografias eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. transvaalensis*.

A. Corte longitudinal da região inicial do flagelo. Núcleo (N), adjunto do centríolo (Ca), axonema (Ax) e derivados mitocondriais (Md).

B, C, D e E. Sequência do flagelo, da região inicial para a final do mesmo, em cortes transversais. Axonema (Ax), derivados mitocondriais (Md) e microtúbulos acessórios (Mi).

Barras: A = 0,20 μm ; B, C, D e E = 0,10 μm .

Discussão

Os espermatozoides de *Megastigmus transvaalensis* assemelham-se aos espermatozoides descritos de Chalcidoidea e Platygastroidea, ambos superfamílias de Parasítica (Wilkes & Lee, 1965; Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a, b), são células finas, longas e com pelo menos algumas estruturas espiraladas, diferente das vespas parasíticas pertencentes à superfamília Ichneumonoidea, que são lineares (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010). Como estruturas espiraladas podem ocorrer em todo espermatozoide (Lino-Neto et al., 1999, 2000, Lino-Neto & Dolder, 2001a, b) ou apenas o núcleo, como ocorre em Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b) ou apenas na região anterior da cabeça, como é visto em Pemphredoninae (Zama et al., 2007), pode-se deduzir que estruturas espiraladas em espermatozoides dos Apocrita, podem ter aparecido mais de uma vez durante a evolução, haja visto que tais estruturas espiraladas são observadas em grupos às vezes distantes um do outro.

A região anterior dos espermatozoides de *M. transvaalensis* é formada pelo acrossomo, este por sua vez é formado pela vesícula acrossomal e pelo perforatorium. Esta região apresenta variações nos Chalcidoidea estudados, apenas a espécie *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto et al., 1999) e *Pegoscapus* sp. (Fiorillo et al., 2008) apresentam a mesma organização. Entretanto, outras duas espécies de *Pegoscapus* sp. (Fiorillo et al., 2008) e nas espécies *Melittobia hawaiiensis* e *Melittobia australica* (Brito et al., 2009) não é possível observar o perforatorium no acrossomo. Nas espécies *Trichogramma pretiosum* e *Trichogramma atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) e *Trichogramma dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001b) não é possível identificar a constituição do acrossomo.

A camada extracelular, presente em *M. transvaalensis*, reveste o acrossomo e a região inicial do núcleo, esta estrutura é descrita em vespas parasíticas, como por exemplo, Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder 2001b), alguns Cynipoidea (Quicke et al., 1992; Newman & Quicke 1999b), Ichneumonidae (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010) e Crysidoidea (Oliveira et al., 2012. dados ainda não publicados). A presença de uma camada extracelular no ápice dos espermatozoides parece ser comum aos Proctotrupomorpha, subgrupo de Parasítica, mas que foi perdida durante a evolução pelos representantes da superfamília Platygastroidea.

O núcleo do espermatozoide de *M. transvaalensis* apresentou-se compacto, com cromatina homogênea e eletrondensa em toda sua extensão, assim como ocorre em outros Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009), porém, em *B. pomorum* (Hymenoptera: Eurytomidae) o núcleo, na região posterior, apresenta áreas de cromatina menos eletrondensa (Lino-Neto et al., 1999). O núcleo em *M. transvaalensis* apresenta-se helicoidal, característica esta observada em outros Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009), mas, difere das vespas parasíticas da família Ichneumonidae que possuem núcleo linear (Chauvin et al., 1988; Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010).

A região de transição cabeça-flagelo, em *M. transvaalensis*, é formada anteriormente, pelo núcleo e adjunto do centríolo, o mesmo é observado em outros Chalcidoidea, como por exemplo, *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009), *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999), *T. pretiosum* e *T. atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) e *T. dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001b), já em três Chalcidoidea *Pegoscapus* sp. ela é formada sem a presença do núcleo (Fiorillo et al., 2008).

O final da região de transição cabeça-flagelo, nos Chalcidoidea, apresenta um maior número de combinações, do que o início desta região. Em *M. transvaalensis*, ela é formada pelo adjunto do centríolo associado ao axonema e um derivado mitocondrial, o mesmo ocorre em *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009). Em três espécies de *Pegoscapus* sp., pertencentes à família Agaonidae (Fiorillo et al., 2008), ela é formada pelo adjunto do centríolo associado ao axonema e os dois derivados mitocondriais e em *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999), *T. pretiosum* e *T. atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) e *T. dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001b), esta região é formada apenas pelo adjunto do centríolo associado ao axonema.

A região de transição cabeça-flagelo é um bom exemplo de uma região que apresenta grande diversidade de caracteres, entre as famílias dos Apocrita consideradas próximas, podendo ser utilizada como mais uma ferramenta para ajudar a elucidar problemas de classificação filogenética de famílias próximas em Apocrita.

A presença de corpos acessórios localizados entre axonema e derivados mitocondriais, é comum nos Hymenoptera (Newman & Quicke, 1999a,b; Zama et al., 2001, 2005, 2007; Lino-Neto et al., 2008; Araújo et al., 2009; Gracielle et al., 2009; Mancini et al., 2009) porém, esta estrutura não ficou evidenciada em *M. transvaalensis* e em outros representantes dos Chalcidoidea pertencentes às famílias

Trichogrammatidae (Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a), Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001b), Agaonidae (Fiorillo et al., 2008) e Eulophidae (Brito et al., 2009).

O flagelo de *M. transvaalensis* é formado por dois derivados mitocondriais e o axonema. Os derivados mitocondriais iniciam-se separados, um derivado mitocondrial inicia-se abaixo da base do núcleo, junto ao adjunto do centríolo, enquanto o outro derivado mitocondrial inicia no começo do flagelo, logo abaixo da base do adjunto do centríolo, o mesmo é observado em *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009), já em *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999), *T. pretiosum* e *T. atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) e *T. dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001b) os derivados mitocondriais iniciam-se juntos no flagelo e, em três espécies de *Pegoscapus* sp. (Fiorillo et al., 2008) eles iniciam-se juntos na região de transição cabeça-flagelo.

Em *M. transvaalensis*, os derivados mitocondriais são iguais em forma e diâmetro, o mesmo ocorre na maioria dos Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999; Lino-Neto et al., 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008), enquanto que em *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009) os derivados mitocondrias são diferentes em forma e diâmetro.

Próximo à região final do flagelo um derivado mitocondrial, em *M. transvaalensis*, termina antes do outro, e o término do segundo acontece antes do axonema mudar sua organização típica (9+9+2), o mesmo é observado em outros Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009). Entretanto, em outras vespas parasíticas da família Ichneumonidae, os derivados mitocondriais terminam, aparentemente, juntos (Quicke et al., 1992; Moreira et al., 2010).

O axonema do espermatozoide de *M. transvaalensis* apresenta uma organização com nove microtúbulos acessórios, nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, assim como ocorre em outros Hymenoptera (Quicke et al., 1992; Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b; Fiorillo et al., 2008; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010). O padrão do axonema (9+9+2) é conservado nos Hymenoptera, mas a região final do flagelo apresenta diferenças na sequência de terminação dos microtúbulos que formam o axonema, diferenciando os grandes grupos. Em *M. transvaalensis* os microtúbulos acessórios terminam primeiro e depois o par de microtúbulos central, o mesmo é observado em *B. pomorum* (Lino-Neto et al., 1999). Já em três *Pegoscapus* sp. (Fiorillo et al., 2008) termina primeiro o par de microtúbulos

central e depois os microtúbulos acessórios. Em *T. dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001b), *T. pretiosum* e *T. atopovirilia* (Lino-Neto et al., 2000) e *M. hawaiiensis* e *M. australica* (Brito et al., 2009) terminam apenas os microtúbulos acessórios, ficando o axonema com nove pares de microtúbulos periféricos e um par central.

A sequência de terminação do axonema, também parece ter significado filogenético, na maioria das espécies de Chalcidoidea os microtúbulos acessórios terminam primeiro (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Brito et al., 2009), diferente de Aculeata, onde os microtúbulos acessórios terminam por último (Wheeler et al., 1990; Zama et al., 2005; Oliveira et al., 2010). Mais estudos são necessários, pois esta característica observada na maioria dos Chalcidoidea não é comum em todas as espécies estudadas, em três espécies da família Agaonidae, *Pegoscapus* sp. (Fiorillo et al., 2008), os microtúbulos acessórios desorganizam depois da desorganização do par de microtúbulo central.

Como a sequência de desorganização do axonema não é igual em todos os Chalcidoidea estudados, mas a desorganização dos microtúbulos acessórios é predominante, é preciso mais estudos de representantes dos Chalcidoidea para determinar se a desorganização dos microtúbulos acessórios é comum à maioria dos Chalcidoidea e se na família Agaonidae ocorreu uma diferenciação que resultou em uma desorganização diferente do axonema em relação às outras famílias de Chalcidoidea (Fiorillo et al., 2008). No grupo Aculeata, os estudos são suficientemente abrangentes para se deduzir que os microtúbulos acessórios se desorganizando por último é uma característica amplamente compartilhada no grupo.

Algumas características ultra-estruturais dos espermatozoides, como células espiraladas, camada extracelular e a ordem de desorganização do axonema na região final do flagelo, parecem ter significado filogenético e podem fornecer informações para serem utilizadas na comparação entre superfamílias do grupo Apocrita, enquanto que a região de transição cabeça-flagelo, por ser menos constante, pode ser utilizada para estabelecer relações filogenéticas entre grupos menores dos Apocrita, ou seja, as famílias.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia Celular da UNICAMP, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências Bibliográficas

- 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.
- Bouček, Z., 1988. Australasian Chalcidoidea (Hymenoptera). A biosystematic revision of genera of fourteen families, with a reclassification of species. *C.A.B. International* pp. 832.
- Brito, P; Lino-Neto, J; Dolder, H., 2009. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue & Cell* 41: 113-117.
- Chauvin G, El Agoze M, Hamon C, Huignard J. 1988. Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 17: 359-366.
- Fiorillo, B.S.; Lino-Neto J.; Bão S.N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron* 39: 1271-1280.
- Gaston, K.J., 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology* 5: 283-296.
- Grissel, E. E. & Schauff, M. E., 1990. A handbook of the families of nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). *The Entomological Society of Washington* pp. 85.
- Huber, J.T., 2009. Biodiversity of Hymenoptera. Pp. 303 e 323. In: Footitt, R., Adler, P. (Eds.), *Insect Biodiversity*. Blackwell, Oxford, UK.
- Jamieson, B.G.M.; Dallai, R.; Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*. Scientific Publishers, Enfield, New Hampshire USA.
- LaSalle, J & Gauld, I.D., 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: J. La Salle & I. D. Gauld (eds) *Hymenoptera and Biodiversity*. *C.A.B. International* p. 1-26.
- Lino-Neto, J.; Bão, S.N.; Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 28: 253-259.

- Lino-Neto, J.; Bao, S.N.; Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica* 81: 205-211.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001a. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of *Scelionidae* (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001b. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool Stockholm* 82: 159-164.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2002. Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell* 34: 124.
- Lino-Neto, J., Araujo, V.A., Dolder, H., 2008. Inviability of the spermatids with little cytoplasm in bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* 51, 163-172.
- Mancini, K., Lino-Neto, J., Dolder, H., Dallai, R., 2009. Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). *Arthropod Structure & Development* 38, 54-59.
- Milliron, H. E., 1949. Taxonomic and biological investigations in the genus *Megastigmus* with particular reference to the taxonomy of the Nearctic species (Hymenoptera: Chalcidoidea: Callimomidae). *The American Midland Naturalist Journal* 41: 257-420.
- Moreira, J.; Araujo, V. A.; Bao, 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.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J., 1999a. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of *Sawflies* (Hymenoptera: Symphyta). *Journal Hymenoptera Research* 8: 35-47.
- Newman, T.M. & Quicke, D.L.J. 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucolidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 197-203.
- Oliveira, C.M., Mancini, K., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae). *Tissue & Cell* 42: 242-246.

- Quicke, D. L. J.; Ingram, S. N.; Baillie, H. S.; Gaitens, P. V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta* 21: 381-402.
- Rouault, G.; Turgeon, J.; Candau, J-N.; Roques, A.; Von Aderkas, P.; 2004. Oviposition strategies of conifer seed chalcids in relation to host phenology. *Naturwissenschaften* 91: 472-480.
- Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F., 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. *Belmont, Thomson- Brooks/Cole* p. 864.
- Wheeler, D.E.; Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H., 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology* 206: 343-350.
- Wilkes, A. & Lee, P. E., 1965. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in the hymenopteron *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). *Canadian Journal Genetics Cytology* 7, 609-619.
- Zama, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal Hymenoptera Research* 10: 261-270.
- Zama, U.; Lino-Neto, J.; Melo, S.M.; Campos, L.A.O.; Dolder, H., 2005. Ultrastructural characterization of spermatozoa in *Euglossini* bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux* 52 (2): 122-131.
- 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. nigrophtalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure & Development*, 36: 304-316.

4. CONCLUSÃO GERAL

A ultraestrutura dos espermatozoides de Hymenoptera se mostra capaz de fornecer dados que podem ajudar a elucidar classificações filogenéticas. Algumas características como: Espermatozoide espiralados ou lineares; Camada extracelular na cabeça dos espermatozoides; Ordem de desorganização dos microtúbulos do axonema na região final do flagelo, parece que fornecem caracteres sobre as relações entre os grandes grupos de Hymenoptera, enquanto que a organização e constituição do adjunto do centríolo podem fornecer caracteres na comparação de grupos menores desta ordem.

Os Hymenoptera estudados neste trabalho podem ser facilmente separados entre si pela morfologia de seus espermatozoides e apresentam morfologia similar com suas respectivas superfamílias, demonstrando que a ultraestrutura pode auxiliar na filogenia dos indivíduos estudados

A maioria dos caracteres dos espermatozoides de *Campoletis flavicineta* apresenta características sinapomórficas com a família Ichneumonidae porém, o encaixe do perforatorium no núcleo, derivados mitocondriais simétricos e presença de corpos acessórios na região de transição cabeça-flagelo são características que não são compartilhadas com os outros Ichneumonidae estudados.

Análises ultraestruturais dos espermatozoides de *Megastigmus transvaalensis* possibilitam concluir que, apesar deles apresentarem características sinapomórficas com outros Chalcidoidea, como por exemplo, espermatozoide espiralado, camada extracelular e corpos acessórios não identificados, algumas estruturas são peculiares à espécie em questão, não sendo compartilhadas com outros Chalcidoidea, como por exemplo, as composições do acrossomo e da região de

transição cabeça-flagelo e a sequência de desorganização do axonema na região final do flagelo.

As diferenças observadas tanto em nível específico quanto em nível de família e ou superfamília, podem fornecer dados que poderão ser utilizados para elucidar dúvidas de filogenia das famílias estudadas. Porém, gostaríamos de reforçar que esses dados só poderão ser submetidos a uma análise filogenética mais criteriosa a partir do momento em que se aumente a abrangência das espécies estudadas nas várias famílias de Hymenoptera.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, V.A.; Zama, U; Dolder, H; Lino-Neto, J., 2005. Morphology and structure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22 (3): 137-141.
- Austin, A.D. & Downton, M., 2000. The Hymenoptera: An introduction. In: Austin AD; Downton M. (Eds.) Hymenoptera: Evolution, biodiversity and biological control. *CSIRO; Collingwood, Australia*, xi + 468 pp.
- Boucek, Z., 1988. Australasian Chalcidoidea (Hymenoptera). A biosystematic revision of genera of fourteen families, with a reclassification of species. *C.A.B. International* pp. 832.
- Brito, P; Lino-Neto, J; Dolder, H., 2009. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). *Tissue & Cell* 41: 113-117.
- Carcupino, M.; Profili, G.; Kathirithamby, J.; Mazzini, M., 1995. Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 166: 291-296.
- Chauvin, G.; El Agoze, M.; Hamon, C.; Huignard, J., 1988. Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 17: 359-366.
- Cruz, I. 1995. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, EMBRAPA - CNPMS, Circ. Téc. 21, 45p.

- Cruz, I., Figueiredo, M.L. C.; Gonçalves, E. P.; Lima, D.A.N.; Diniz, E. E., 1997. Efeito da idade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no desempenho do parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e consumo foliar por lagartas parasitadas e não parasitadas. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* v. 26, p. 229-234.
- Dallai, R. & Afzelius, B.A., 1995. Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 166: 301-310.
- Dowton, M. & Austin, A. D. 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 9911-9915.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto J.; Bão S.N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Mícron* 39: 1271-1280.
- Fiorillo, B.S.; Coelho, A.A.M.; Lino-Neto, J.; Bão, S.N., 2005a. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology* 37: 75-81. 22.
- Fiorillo, B.S.; Lino-Neto, J; Bão, S.N., 2005b. Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22 (Suppl.): 60-61.
- Gallo, D. et al, 2002. Entomologia Agrícola. *Piracicaba: FEALQ*. 920 p.
- Gaston, K.J., 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology* 5: 283-296.
- Gauld, I. D., 1985. Introduction. p. 1-4. In: Hanson PE & Gauld ID (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. *New York, Oxford University Press*. 893 pp.
- Gauld, I. D. & Bolton, B. 1988. The Hymenoptera. *Oxford University Press and British Museum (Natural History)*, pp. 332.
- Gauld, I. D. & Hanson, P. E. 1995. The evolution, classification and identification of the Hymenoptera. Em: The Hymenoptera of Costa Rica. Eds. Hanson, P. E. & Gauld, I. D. *Oxford University Press*, pp. 138-156.
- Gibson, G.; Huber, J.T.; Woolley, J.B. (eds), 1997. Annotated keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). *Ottawa: NRC Research Press*. 794p..

- Grissell, E. E., 1995. Toryminae (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae): a redefinition, generic classification, and annotated world catalog of species. *Memoirs of Entomology, International*. 2: 1-470.
- Grissell E. E., 1999. Hymenopteran biodiversity: some alien notions. *American Entomologist*. 45: 235-244.
- Grissell, E.E. & Schauff, M., 1997. A handbook of the families of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera): Second Edition, revised. Washington: *The Entomological Society of Washington*. 87p.
- Hanson, P. E. & LaSalle, J., 1995. The chalcidoid families. Em: The Hymenoptera of Costa Rica. Eds. Hanson, P. E. & Gauld, I. D. *Oxford University Press*. 266-273.
- Hanson, P. E., 1995. The Biology of Hymenoptera. Phytophagy in larval Hymenoptera. p. 32-36. In: Hanson PE; Gauld ID (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. *New York, Oxford University Press*. 893 p.
- Hogge, MAF; King, PE (1975) The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*. 7: 81-96.
- Huber, J.T., 2009. Biodiversity of Hymenoptera. Pp. 303 e 323. In: Footitt, R., Adler, P. (Eds.), *Insect Biodiversity*. *Blackwell, Oxford, UK*.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny. *Scientific Publishers, Enfield, New Hampshire, USA*.
- Jones, R. L., 1986. Orientation by insects parasitoids. In: Payne, T. L.; Kennedy, C.E. (Ed.). *Mechanisms in insect olfaction*. *Oxford: Clarendon Press*. cap. 16, p.149-156.
- LaSalle J. & Gauld I. D., 1991. Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. Insect parasitoids, 4th European workshop. *Redia*. 74, 3315–3334.
- LaSalle, J. & Gauld, I.D., 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In *Hymenoptera and Biodiversity*, (Eds. J. LaSalle and I.D. Gauld) *.CAB International, UK*. pp. 1-26.
- LaSalle J. & Gauld I.D., 1993. Hymenoptera and biodiversity. *CABI Publishing, allingford, UK*, xi + 348 pp.
- Lewis, W.J. & Tumlinson J.H., 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature*. v. 331 p.257-259.
- Lino-Neto, J.; Báo, S.N.; Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 28: 253-259.

- Lino-Neto, J.; Bao, S.N.; Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica* 81: 205-211.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001a. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001b. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica Stockholm* 82: 159-164.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2002. Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell* 34: 124.
- Mancini, K.; Lino-Neto, J.; Campos, L.A.O.; Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 53: 333–338.
- Milliron, H. E., 1949. Taxonomic and biological investigations in the genus *Megastigmus* with particular reference to the taxonomy of the Nearctic species (Hymenoptera: Chalcidoidea: Callimomidae). *American Midland Naturalist* 41: 257-420.
- Moreira, J.; Araujo, V. A.; Bao, 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.
- Naumann, I. D. 1991. Hymenoptera (Wasps, Bees, Ants, Sawflies). Em: The Insects of Australia, Volume II, *Melbourne University Press*, pp. 1137.
- Newman, T. M. & Quicke, D. L. J., 1999a. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *Journal Hymenoptera Research* 8: 35-47.
- Newman, T. M.; Quicke, D. L. J., 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *Journal Hymenoptera Research* 8: 197-203.
- Noyes, J. S., 1990. The number of described chalcidoid taxa in the world that are currently regarded as valid. *Chalcid Forum* 13: 9-10.
- Noyes, J. S., 2008. Universal Chalcidoidea Database. Database accessible at <http://www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/> Captured on 30 August 2008.

- Oliveira, C.M., Mancini, K., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2010. Sperm morphology of the *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyilidae). *Tissue & Cell* 42: 242-246.
- Pereira, R. A. S.; Lino-Neto, J.; Prado, A. P., 2008. Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. *Symbiosis*, v. 45, p. 143-147.
- Quicke, D. L. J., 1997. Parasitic wasps. *Chapman & Hall. London.* 470 pp.
- Quicke, D. L. J.; Ingram, S. N.; Baillie, H. S.; Gaitens, P. V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta* 21: 381-402.
- Rasnitsyn, A. P., 1988. An outline of evolution of the hymenopterous insects. *Oriental Insects*. 22: 115-145.
- Ronquist, F., 1999. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): The state of the art. *Zoologica Scripta*. 28, 3-11.
- Ronquist, F., Rasnitsyn, A. P., Roy, A., Eriksson, K. & Lindgren, M. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988). *Zoologica Scripta*. 28: 13-50.
- Rouault, G.; Turgeon, J.; Candau, J-N.; Roques, A.; Von Aderkas, P.; 2004. Oviposition strategies of conifer seed chalcids in relation to host phenology. *Naturwissenschaften*. 91: 472-480.
- Sharkey, M.J. & Wahl, D.B., 1992. Cladistics of the Ichneumonoidea (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*. 1: 15-24.
- Smith, D. R. 1993. Systematic, life history and distribution of sawflies. Em: Sawfly life history adaptations to woody plants. Eds. Wagner, M. R. & Raffa, K. F. *Academic Press*. pp. 3-32.
- Triplehorn, C.A.; Johnson, N.F., 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. *Belmont, Thomson- Brooks/Cole* p. 864.
- Turlings, T. C. J.; Wackers, F. L.; Vet, L. E. M.; Lewis, W. J.; Tumlinson, J. H., 1993 Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: PAPAJ, D.R.; Lewis, A.C. (Ed.). Insect learning: ecological and evolutionary perspectives. *New York: Chapman & Hall*. p. 51-78.
- Vinson, S. B., 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*. v. 21, p. 109-133.
- Wahl, D.B. & Gauld, I. D., 1998. The cladistics and higher classification of the Pimpliformes. *Systematic Entomology*. 23: 265-298.

- Wahl, D. B. & Sharkey, M. J., 1993. Superfamily Ichneumonoidea. *In*: Goulet, H., Huber, J. T. (Ed.). Hymenoptera of the world: An identification guide to families. Ottawa: Research Branch. *Agriculture Canada Publication*. cap. 10, p. 395-442.
- Wheeler, D.E.; Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H., 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology* 206: 343-350.
- Wilkes, A. & Lee, P. E., 1965. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in the hymenopteron *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). *Canadian Journal Genetics Cytology* 7, 609-619.
- Zama, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebéia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *Journal Hymenoptera Research* 10: 261-270.
- Zama, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2004. Structural and Ultrastructural of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue & Cell* 1: 29-41.
- Zama, U.; Lino-Neto, J.; Melo, S.M.; Campos, L.A.O.; Dolder, H., 2005. Ultrastructural characterization of spermatozoa in *Euglossini bees* (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux* 52 (2): 122-131.
- Zessin, W., 1985. Neue oberliassische Apocrita und die Phylogeny der Hymenoptera (Insecta:Hymenoptera). *Deutsche Entomologische Zeitung N.S.* 32:129-142.