

**FELIPE BERTHOLDI FRAGA**

**ESPERMATOZÓIDES DE *Evania appendigaster* (LINNAEUS, 1758) COM  
CONSIDERAÇÕES FILOGENÉTICAS PARA EVANIIDAE (HYMENOPTERA)**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**FELIPE BERTHOLDI FRAGA**

**ESPERMATOZÓIDES DE *Evania appendigaster* (LINNAEUS, 1758) COM  
CONSIDERAÇÕES FILOGENÉTICAS PARA EVANIIDAE (HYMENOPTERA)**

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

APROVADA: 25 de março de 2010.

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-Orientador)

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Mariana Machado Neves

---

Prof<sup>a</sup>. Uyrá dos Santos Zama

---

Prof. José Lino Neto  
(Orientador)

## Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor que sempre me deram e por me apoiarem incondicionalmente, mesmo não sabendo onde tudo iria acabar.

À minha companheira Isabel pelo carinho, ajuda e incentivo nos momentos que precisei.

A toda minha família e família Alencar por sempre proporcionarem momentos felizes e agradáveis quando voltava para casa.

Ao meu orientador José Lino Neto pela orientação, paciência e tranquilidade durante o período de mestrado.

À Dra. Suzete Bressan Nascimento do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ) por disponibilizar os espécimes utilizados nesse estudo e por sempre fazê-lo de bom grado e cordialmente mesmo sob condições adversas.

À Claudinha pela amizade e por me ajudar com tudo referente à metodologia da dissertação.

Ao Fernandinho por me dar conselhos importantes nas semanas anteriores a dissertação e também por me emprestar seu lar na reta final.

À Jane e Vinícius pelas críticas e conselhos nos momentos finais do meu mestrado.

Aos professores Clóvis Andrade Neves e José Eduardo Serrão pela co-orientação.

Ao professor Lucio Antonio de O. Campos pela ajuda com a B.O.D. e facilidades no laboratório.

Aos meus amigos de República pela distração nem sempre querida, mas sempre proveitosa no balanço geral.

Aos meus amigos da GaleraZig por sempre serem meus amigos.

Às minhas amigas estrangeiras por facilitarem minha estadia nessa pequena cidade de clima agradável.

À Dra. Cláudia Vanetti e Carla pela paciência e instruções durante o manuseio dos equipamentos do Núcleo de Microscopia Eletrônica de Transmissão da UFV.

Ao núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Mestrando Alex do laboratório de Biologia Estrutural pela ajuda com os reagentes e momentos de descontração.

Ao programa de pós-graduação em Entomologia e à Universidade Federal de Viçosa pela estrutura oferecida durante todo o mestrado.

Às secretarias de pós-graduação em Entomologia, Dona Paula e Mirian, pelo profissionalismo.

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

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## Biografia

Felipe Bertholdi Fraga, filho de Afílio Fraga e Ivanete Elvira Bertholdi Fraga, nasceu em Vitória, Espírito Santo, em 29 de maio de 1982.

Em janeiro de 2007, graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES. Durante o período de graduação, de 2001 a 2005, foi estagiário do Laboratório de Biodiversidade de Insetos do Departamento de Ciências Biológicas da UFES trabalhando com sistemática, taxonomia e ecologia de himenópteros parasitóides. Em 2006 apresentou monografia de conclusão de curso, com o título: Novas espécies do subgênero *Pseudobrachymeria* (Hymenoptera, Chalcidade, *Brachymeria*) da região Neotropical.

Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a tese em março de 2010.

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Materiais .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2.1. Microscopia de luz .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>8</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>12</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>16</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>17</b>

## Resumo

FRAGA, Felipe Bertoldi, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Espermatozóides de *Evania appendigaster* (Linnaeus, 1758) com considerações filogenéticas para Evaniidae (Hymenoptera).** Orientador José Lino Neto. Co-Orientadores: Clovis Andrade Neves e José Eduardo Serrão.

A filogenia de Hymenoptera ainda permanece incipiente, havendo muitas dúvidas sobre as relações de diversas famílias dentro da ordem, sendo que o registro de novos caracteres pode auxiliar a elucidar algumas dessas relações. Atualmente, o conhecimento da ultra-estrutura dos espermatozóides tem contribuído para o estudo filogenético de diversos grupos de animais, incluindo os insetos. Este estudo caracterizou os espermatozóides de *Evania appendigaster* (Hymenoptera: Evaniidae). Nesta espécie, os espermatozóides estão organizados em feixes (espermatodesmata) nas vesículas seminais, sendo o primeiro registro deste arranjo em Hymenoptera não pertencente a “Symphyta” ou Aculeata. Os espermatozóides de *E. appendigaster* são delgados e têm comprimento aproximado de 100  $\mu\text{m}$ , dos quais 35  $\mu\text{m}$  corresponde ao núcleo. Eles são caracterizados ultra-estruturalmente por apresentarem: (1) acrossomo, formado pela vesícula acrossomal e o *perforatorium* inserido em uma cavidade do ápice do núcleo; (2) núcleo com formato bacilar e cromatina compactada; (3) adjunto do centríolo assimétrico; (4) dois derivados mitocondriais assimétricos; (5) corpos acessórios entre o axonema e os derivados mitocondriais; (6) axonema com padrão de 9 + 9 + 2 microtúbulos; (7) extremidade posterior do axonema com microtúbulos acessórios terminando por último, antecidos pelo desaparecimento dos centrais e duplas periférica, respectivamente. A retenção do estado agregado dos espermatozóides de Evaniidae, uma família de “Parasítica”, reforça a hipótese de que Apocrita (“Parasítica” + Aculeata) possui um ancestral comum a “Symphyta” e a perda desse estado agregado seja mais recente. A semelhança entre a ultra-estrutura dos espermatozóides de *E. appendigaster* e membros de Aculeata, sugere que no futuro, estudos cladísticos possam demonstrar essa proximidade entre Evaniidae e Aculeata.

## Abstract

FRAGA, Felipe Bertoldi, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2010. **Sperm of *Evania appendigaster* (Linnaeus, 1758), with phylogenetic considerations for Evaniidae (Hymenoptera).** Advisor: José Lino Neto. Co-advisors: Clovis Andrade Neves and José Eduardo Serrão.

The phylogeny of Hymenoptera is still at the beginning, with many open questions about the relationships of several families within the order. Use of new characters may be useful for the understanding of phylogenetic relationships. Current knowledge of the ultrastructure of sperm has contributed to the phylogenetic analysis of several animals, including insects. This study characterized the spermatozoa of *Evania appendigaster* (Hymenoptera: Evaniidae). The spermatozoa of this species are arranged in bundles (spermatodesmata) in the seminal vesicles, this being the first record of spermatodesmata in Hymenoptera other than "Symphyta" or Aculeata. Spermatozoa of *E. appendigaster* are slender and have a length of approximately 100  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$  of which corresponds to the nucleus. They are characterized ultrastructurally by presenting: (1) acrosome, formed by the acrosomal vesicle and *perforatorium* inserted into a cavity of the apex of the nucleus; (2) nucleus with bacillary-shaped and chromatin compacted; (3) centriolar adjunct asymmetric; (4) two mitochondrial derivatives asymmetric; (5) bodies accessories between axoneme and mitochondrial derivatives; (6) axoneme with standard 9 + 9 + 2 microtubules; (7) the end of the axoneme with accessory microtubules finishing last, preceded by the end of central and peripheral pairs, respectively. The retention of sperm in the aggregate state of Evaniidae, a family of "Parasitica", reinforces the hypothesis that Apocrita ("Parasitica" + Aculeata) has a recent common ancestor to "Symphyta" and that the loss of aggregate state is more recent. The similarity between the ultrastructure of spermatozoa of *E. appendigaster* and members of Aculeata, suggests that future cladistic studies can demonstrate that proximity between Evaniidae and Aculeata.



## 1. Introdução

Os insetos da ordem Hymenoptera são uma das formas dominantes sobre a terra, tanto em número de espécies quanto em diversidade de estilos de vida dentro do grupo (Austin & Dowton, 2000). São conhecidas de 115.000 (Triplehorn & Johnson, 2005) a 199.000 (Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla, 1999) espécies de himenópteros, e algumas estimativas podem aumentar esse número de 600.000 a 1.200.000 (Grimaldi & Engel, 2005) de espécies existentes. Os himenópteros contêm a vasta maioria dos insetos sociais e parasitóides, tais como a grande variedade de predadores e herbívoros especialista. Eles têm aparecido como o grupo mais especioso em muitos estudos sobre biodiversidade terrestre e possuem grande importância como agentes de controle biológico de insetos praga (Austin & Dowton, 2000).

Para uma melhor compreensão do grupo, tradicionalmente os Hymenoptera foram divididos nas subordens, “Symphyta” e Apocrita (Fernández & Sharkey, 2006). A compilação de dados feita por Sharkey (2007) deixa claro que os “Symphyta” são parafiléticos e menos derivado em Hymenoptera. Mesmo assim, o nome ainda é usado para representar todos os himenópteros que não possuem constrição (“cintura”) entre o primeiro e o segundo segmento abdominal. Os Apocrita são, ainda, divididos em dois agrupamentos, “Parasitica” e Aculeata. Os Aculeata incluem todos os himenópteros pertencentes às superfamílias Chrysidoidea, Apoidea (abelhas) e Vespoidea (vespas e formigas). O ovipositor das fêmeas de Aculeata se modificou em um órgão especializado que pode tanto inocular veneno (ferrão) quanto ovipositar. O agrupamento “Parasitica”, assim como “Symphyta”, é parafilético e é reconhecido por ser o mais rico em espécies da ordem e com a maioria das espécies de inseto com hábito parasitóide. Ao grupo pertencem 47 famílias distribuídas em 12 superfamílias: Megalyroidea, Trigonalioidea, Stephanoidea, Cynipoidea, Proctotrupeoidea, Diaprioidea, Evanioidea, Chalcidoidea, Mymarommatoidea, Platygastróidea, Ichneumonoidea e Ceraphronoidea (Sharkey, 2007).

Dentre estes “Parasitica”, os Evaniidae (Evanioidea) são conhecidos como vespa-bandeira ou vespa-machadinha. Até o início da década de 90, existiam poucos estudos sobre essa família, mas, a partir desta década, estudos taxonômicos (Deans, 2005; Deans & Huben, 2003; Deans *et al.*, 2006),

fósseis (Engel, 2006; Deans *et al.*, 2004; Basibuyuk *et al.*, 2000a; 2000b; 2002), de criação (Fox & Bressan-Nascimento, 2006; Hwang & Chen, 2004), busca por hospedeiro (Yeh & Mu, 1994; Yeh *et al.*, 2000) e revisão de espécies (Kawada & Azevedo, 2007) atualizaram o conhecimento sobre a família. Evaniidae possui 20 gêneros e cerca de 450 espécies descritas (Fernandez & Sharkey, 2006). As larvas de Evaniidae são predadoras de ootecas de barata (Roth & Willis, 1960; Cameron, 1957), que dessa forma atuam como controladoras naturais de populações de baratas. Os estudos visando o controle biológico são realizados com a espécie *Evania appendigaster*, que ataca a espécie *Periplaneta americana* (Dictoptera, Blatária), barata com distribuição associada à presença humana.

Em Hymenoptera, as células germinativas masculinas se desenvolvem (espermatogênese) em grupos, revestidos por células não germinativas, denominados cistos foliculares. No final da espermiogênese, os cistos se rompem, e os espermatozóides que formavam cada cisto são transferidos em grupos, agora denominados feixes ou espermatodesmatas, para as vesículas seminais. Na vesícula seminal, os espermatozóides podem se manter em feixe até serem transferidos para as fêmeas ou se individualizarem durante a maturação sexual (Lino-Neto *et al.*, 2008b).

Segundo Cholodkovsky (1913), a agregação de espermatozóides para formar feixes é uma estratégia comum na reprodução dos insetos. A agregação de espermatozóides foi observada pela primeira vez em 1843 por Dr. von Siebold em gafanhotos (Ballowitz, 1916) e exemplos são abundantes em Odonata, Lepidoptera, Megaloptera, Orthoptera, Coleoptera e Hymenoptera. Acredita-se que a agregação dos espermatozóides em feixes esteja relacionada com a competição espermática, onde espermatozóides em pares ou em grupos cooperam, combinando suas forças propulsivas, a fim de aumentar sua mobilidade dentro do trato reprodutivo da fêmea (Simmons, 2001).

Ainda são poucos os estudos que descrevem a morfologia dos feixes de espermatozóides em Hymenoptera, mas em "Symphyta" (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999a; Lino-Neto *et al.*, 2008a) e Aculeta (Moreira *et al.*, 2004; Zama *et al.*, 2001) foi observado que os espermatozóides são mantidos no feixe pela porção anterior da cabeça que fica inserida em uma matriz extracelular.

Há cerca de 30 anos, a morfologia dos espermatozóides de insetos é descrita como uma importante ferramenta taxonômica que permite a caracterização de famílias, gêneros e, até mesmo, espécies (Baccetti, 1970; Phillips, 1970; Dallai, 1974; Jamieson, 1987; Dallai & Afzelius, 1993; Jamieson *et al.*, 1999; Lino-Neto *et al.*, 2008a). Em Hymenoptera o primeiro estudo comparando morfologia de espermatozóides foi realizado por Quicke *et al.* (1992). Desde então, podemos encontrar estudos para os grupos: “Symphyta” (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999a, Lino-Neto *et al.*, 2008a); “Parasítica”: Megalyridae (Newman & Quicke, 2000), Eucoilidae (Newman & Quicke, 1999b), Agaonidae (Fiorillo *et al.*, 2008), Eulophidae (Brito *et al.*, 2009; Wilkes & Lee, 1965), Eurytomidae (Lino-Neto *et al.*, 1999), Trichogrammatidae (Lino-Neto *et al.*, 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001b), Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a), Braconidae (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998) e Ichneumonidae (Chauvin *et al.*, 1988; Quicke *et al.*, 1992); Aculeata: Apidae (Rothschild, 1955; Hoage & Kessel, 1968; Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Peng *et al.*, 1992 e 1993; Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001; 2004 e 2005a; Báó *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Conte *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005b), Halictidae (Fiorillo *et al.*, 2005a), Formicidae (Thompson & Blum, 1967; Caetano, 1980; Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007), Vespidae (Mancini *et al.*, 2006 e 2009) e Sphecidae (Zama *et al.*, 2005b e 2007). Entretanto, muitas famílias de Hymenoptera permanecem sem se conhecer absolutamente nada da morfologia dos espermatozóides.

Lino-Neto *et al.* (2008b) descreveram que os espermatozóides de Hymenoptera apresentam, de maneira geral, morfologia semelhante àquela considerada típica para os Pterigotos (Baccetti, 1970; Jamieson *et al.*, 1999), a saber: o **acrossomo**, localizado na extremidade anterior, é composto por uma vesícula acrossomal e um *perforatorium*. A vesícula acrossomal, responsável pelo armazenamento das enzimas hidrolíticas, é formada durante o início da espermiogênese pelo complexo de Golgi. Ela se assemelha a um cilindro, que reveste totalmente o *perforatorium*, com a extremidade anterior fechada e a base justaposta à extremidade anterior nuclear. O *perforatorium* é um bastão eletrondenso, às vezes, paracristalino, que tem sua base inserida em uma cavidade na extremidade anterior do núcleo. O **núcleo** é, geralmente, bem longo e apresenta cromatina homoganeamente compactada e eletrondensa na maioria das espécies. O processo de alongamento e compactação nuclear tem

início já nos primeiros estágios da espermiogênese. A transição núcleo-flagelo é uma região relativamente complexa, com a conexão entre o núcleo e os elementos do flagelo feita pelo **adjunto do centríolo**. Na maioria dos Hymenoptera, essa estrutura é eletrondensa, aproximadamente cilíndrica e compacta, podendo variar de comprimento entre as espécies. Geralmente, ela se localiza paralelamente a porção anterior do axonema, entre a base do núcleo e a extremidade anterior de um (assimétrico) ou de ambos (simétrico) os derivados mitocondriais. O flagelo, formado pelo **axonema**, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios, tem a organização mais conservada do que as regiões descritas acima. O axonema apresenta arranjo microtubular do tipo  $9 + 9 + 2$ : sendo 9 microtúbulos acessórios simples externos, 9 duplas periféricas e 2 túbulos centrais simples. Ele inicia abaixo da base nuclear, a partir do centríolo, e é a última estrutura a se desorganizar nas porções finais do flagelo. Os **derivados mitocondriais** são estruturas altamente modificadas, como na grande maioria dos insetos. Eles começam a se formar no início da espermiogênese pela fusão das mitocôndrias e posteriores alterações morfológicas, que resultam em duas estruturas longas que se estendem paralelamente ao lado do axonema por praticamente todo o flagelo. O comprimento e o diâmetro dos dois derivados são bastante variáveis entre eles, por isso são freqüentemente referidos como derivado mitocondrial maior e menor. Ambos apresentam cristas mitocondriais restritas à periferia e, em pelo menos um deles, ocorre uma região de material paracristalino. Nas porções finais do flagelo, os derivados mitocondriais sempre terminam antes do axonema e em alturas diferentes. Os **corpos acessórios** são estruturas longas, situadas entre os derivados mitocondriais e o axonema e, em corte transversal, apresentam formato mais ou menos triangular. Nas porções finais do flagelo, eles terminam imediatamente após os derivados mitocondriais.

## **2. Objetivo**

### **2.1. Objetivo geral**

Contribuir para o conhecimento sistemático de Hymenoptera.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Descrever e analisar a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de *Evania appendigaster*;
- Contextualizar filogeneticamente Evaniidae dentro de Hymenoptera, com base nas estruturas analisadas.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

Os machos de *Evania appendigaster* usados nesse trabalho foram cedidos pela Dra. Suzete Bressan Nascimento do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), onde os foram criados em ootecas de *Periplaneta americana*.

#### **3.2. Métodos**

Os machos adultos tiveram seus sistemas reprodutores dissecados em tampão fosfato de sódio e cacodilato de sódio e processados para as diferentes técnicas de microscopia de luz e eletrônica.

##### **3.2.1. Microscopia de luz**

As vesículas seminais foram removidas dos sistemas reprodutores e abertas sobre lâminas histológicas. Em seguida foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio, pH 7.2 por 10 minutos e lavadas em água destilada. A seguir, amostras foram observadas e fotografadas em microscópio de luz de campo escuro para as medidas do comprimento total dos espermatozoides. Outras amostras de espermatozoides foram submetidas à coloração por DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol) 0.2 µg/ml por 15 minutos no escuro, seguindo-se lavagem com água destilada. A seguir as amostras montadas em lâminas histológicas foram cobertas com lamínula e sacarose 50%, analisadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação a 360-370 nm, para medidas dos núcleos dos espermatozoides.

Todas as medidas foram realizadas com auxílio do programa de computador Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Ltd.).

##### **3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Vesículas seminais dissecadas foram abertas sobre lamínulas circulares e fixadas em solução de glutaraldeído 2.5%, ácido pícrico 0.2% em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7.2 por 24 horas à 4 °C. A seguir, foram pós-fixadas

em tetróxido de ósmio a 1% no tampão fosfato de sódio por 2 h, lavadas em água destilada e desidratadas em série crescente de etanol (30%-100%), finalizando com a substituição do álcool pela acetona. As amostras foram submetidas ao secador de ponto crítico, utilizando-se CO<sub>2</sub>, metalizadas com ouro (20 nm) e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### **3.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Vesículas seminais foram fixadas em duas soluções: (1) solução de glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0.2% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, por 24 h à 4°C; e (2) solução de ácido tânico a 1%, glutaraldeído 2.5%, sacarose 2% em tampão fosfato de sódio 0.1 M e pH 7.2, por 24 h à 4°C. Para a solução (1), as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no tampão cacodilato de sódio, por um período de 2 h em temperatura ambiente. Para a solução (2), as amostras foram tratadas em solução de acetato de uranila aquoso a 1% por 1 h e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% no tampão fosfato de sódio por 1 h a temperatura ambiente. A desidratação foi feita em série crescente de acetona de 30-100%, depois infiltrados durante 3 dias em resina Epon-812 e incluídos na mesma resina.

Cortes ultrafinos feitos com navalha de diamante foram coletados com telas de cobre, contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo a 1% e, finalmente, fotodocumentados nos microscópios eletrônicos de transmissão do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas (Zeiss LEO 906) e do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (Zeiss EM 109).

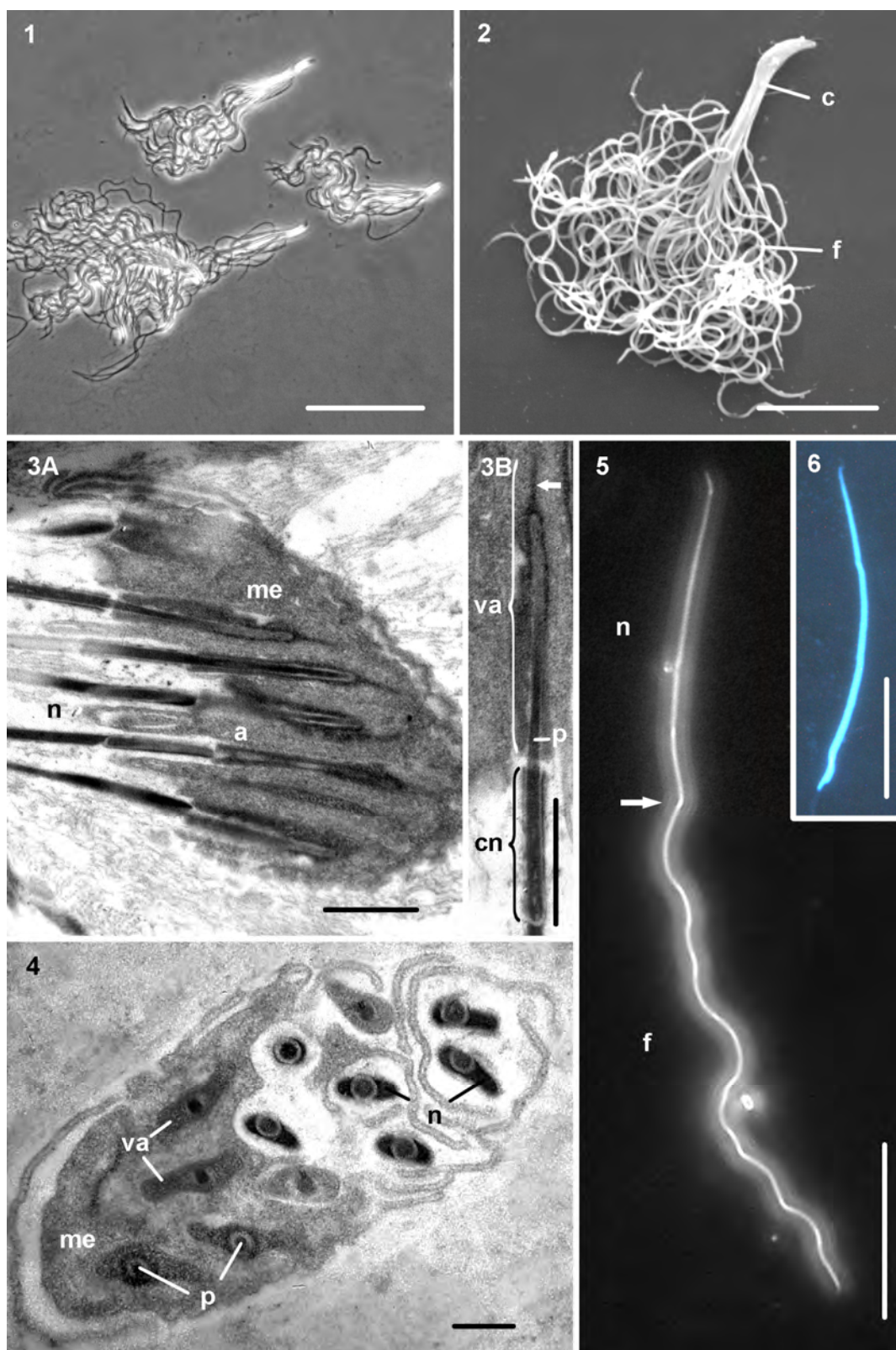
## 4. Resultados

Os espermatozoides de Evaniidae estão, em sua maioria na vesícula seminal, agregados em feixes, chamados espermatodesmatas (Fig. 1 e 2). A organização em feixe dos espermatozoides é mantida por uma matriz extracelular, na qual a porção anterior dos espermatozoides, todo o acrossomo e parte do núcleo, está inserida (Fig. 3A e 3B). A inserção dos espermatozoides nessa matriz é caracterizada por formar uma ponta na extremidade anterior do feixe, uma vez que, em corte transversal, os espermatozoides de uma extremidade se encontram em níveis diferentes em relação aos da outra extremidade (Fig. 3A e 4).

Os espermatozoides de *E. appendigaster* (Fig. 5) são delgados, possuem uma porção ondulada e outra retilínea, e um comprimento total de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . A porção retilínea representa o núcleo (Fig. 5 e 6), o qual apresenta o ápice que afila gradativamente e comprimento de aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . A porção ondulada representa o flagelo, que possui espessura constante e extremidade que afila bruscamente (Fig. 5).

O acrossomo, formado pela vesícula acrossomal e o *perforatorium*, mede aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 3A e 3B) e, em corte transversal a vesícula acrossomal varia de alongada e estreita no ápice a arredondada e larga próximo ao núcleo, enquanto que o *perforatorium* possui forma circular por toda sua extensão (Fig. 4). No ápice da vesícula acrossomal, em corte longitudinal, é possível observar uma fina projeção mais eletrondensa que o resto da vesícula acrossomal (Fig. 3B). O *perforatorium* mede aproximadamente 1.4  $\mu\text{m}$  e se encaixa em uma cavidade no ápice do núcleo de aproximadamente 0.6  $\mu\text{m}$  (Fig. 3A e 3B).





Figuras 1-6: Micrografias de luz de espermatodesmatas (1), espermatozoides (5 e 6) e eletrônicas de varredura (2) e transmissão (3A, 3B e 4) de espermatodesmatas de *E. appendigaster*. 1. Feixes de espermatozoides (espermatodesmatas). 2. Espermatodesmata com indicação de cabeça (c) e flagelo (f). 3A. Corte longitudinal de feixe mostrando núcleos (n) e acrossomos (a) embebidos em uma matriz extracelular (me). 3B. Detalhe de 3A mostrando no acrossomo, o *perforatorium* (p) inserido na cavidade do núcleo (cn), vesícula acrossomal (va) com fina projeção (seta). 4. Corte transversal de feixe mostrando núcleos (n) e acrossomos (a). 5. Espermatozoides em luz de varredura com núcleo (n) e flagelo (f). 6. Espermatozoides em luz de transmissão com núcleo (n) e flagelo (f).

acrossomos, formado pelo *perforatorium* (p) e vesícula acrossomal (va), embebidos em uma matriz extracelular (me). 5. Espermatozóide com seta indicando limite entre o núcleo(n) e flagelo (f). 6. Núcleo corado com DAPI. Barras: 1: 50  $\mu\text{m}$ ; 2: 20  $\mu\text{m}$ ; 3A-3B: 0.5  $\mu\text{m}$ ; 4: 0.2  $\mu\text{m}$ ; 5: 20  $\mu\text{m}$ ; 6: 10  $\mu\text{m}$

O núcleo possui cromatina compactada por toda extensão. Em cortes transversais do núcleo (Fig. 7, 8 e 10), abaixo da porção de encaixe com o *perforatorium*, o maior eixo do núcleo pode chegar a 7x o comprimento do menor eixo do núcleo (Fig. 7), dando ao núcleo de *E. appendigaster* a forma peculiar de “bacilo” (Fig. 7).

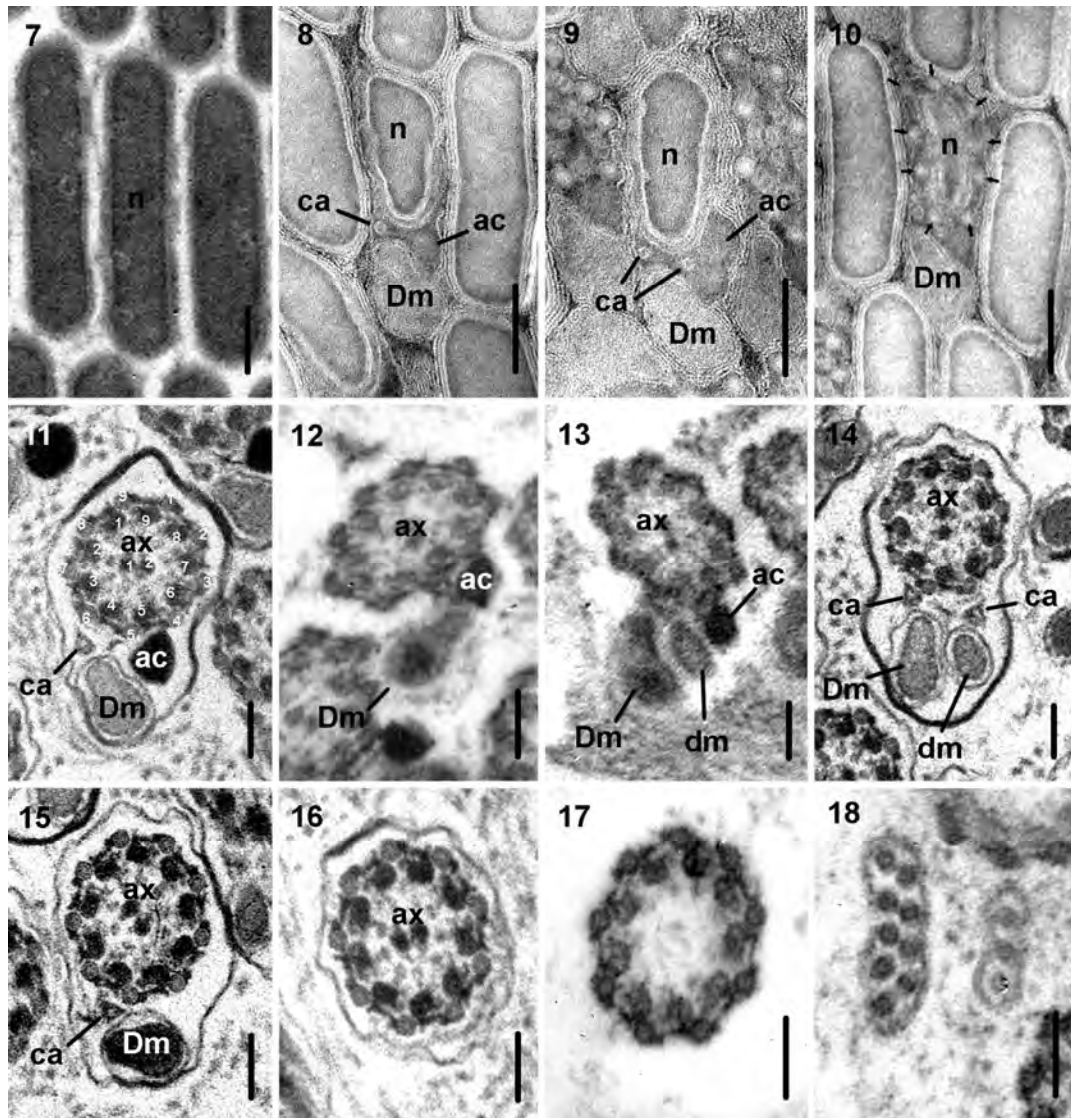
A conexão do núcleo aos elementos do flagelo é mantida pelo adjunto do centríolo que se mostra eletrondenso e em cortes transversais possui forma circular, iniciando-se ao lado da base do núcleo e um dos derivados mitocondriais (Fig. 8 e 9) e estendendo-se paralelamente aos elementos do flagelo até o início do outro derivado mitocondrial (Fig. 11-13).

Entre a base do núcleo e o início de um dos derivados mitocondriais, foram observados corpos acessórios com estrutura tubular, iniciando-se em alturas diferentes (Fig. 8 e 9). Estruturas de formato semelhante, reconhecidas como sendo corpos acessórios, são observadas no resto do espermatozóide entre os derivados mitocondriais e o axonema (Fig. 11, 14 e 15).

Os derivados mitocondriais têm diâmetros desiguais e começam em alturas diferentes. O derivado que começa ao lado da base do núcleo (Fig. 8-10) possui forma de pêra em corte transversal (Fig. 8-15), e é maior em diâmetro e comprimento que o outro derivado mitocondrial, pois o derivado piriforme também é o último derivado a terminar no flagelo (Fig. 15). O derivado piriforme possui duas regiões distintas, uma eletrondensa central envolta por outra elétron-lúcida (Fig. 12 e 13). O segundo derivado mitocondrial começa antes de terminar o adjunto do centríolo (Fig. 13) e possui forma elíptica, em corte transversal (Fig. 13 e 14).

O axonema apresenta o padrão de 9 + 9 + 2 microtúbulos: sendo 9 microtúbulos acessórios simples externos, 9 duplas periféricas e 2 centrais (Fig. 11). Os microtúbulos acessórios surgem primeiro, ao redor do núcleo (Fig. 10), enquanto que os demais microtúbulos surgem posteriormente ao núcleo. O axonema se estende por todo o flagelo, paralelamente e além dos derivados mitocondriais (Fig. 11-16). Os microtúbulos que chegam ao final do axonema são os acessórios já desorganizados e, antes deles, terminam os microtúbulos

centrais e as duplas periféricas, respectivamente (Fig. 17 e 18).



Figuras 7-18: Micrografias eletrônicas de transmissão em cortes transversais seqüenciais de espermatozoides de *E. appendigaster*. 7-10. Região de núcleo (n) e transição de núcleo-flagelo, mostrando o surgimento dos corpos acessórios (ca), derivado mitocondrial piriforme (Dm), adjunto do centríolo (ac) e 9 microtúbulos acessórios (setas) ao redor do núcleo. 11-13. Região anterior do flagelo, mostrando axonema (ax) com 9 microtúbulos acessórios (números em sentido horário), 9 duplas (números em sentido anti-horário) e 2 centrais (1-2), derivado mitocondrial piriforme com uma região eletrondensa envolta por outra eletrólúcida e adjunto do centríolo alcançando o outro derivado mitocondrial (dm). 14. Região mediana do flagelo mostrando axonema, derivados mitocôndrias e corpos acessórios. 15-18. Região posterior do flagelo mostrando o derivado piriforme e a perda progressiva dos microtúbulos, primeiro dos microtúbulos centrais, depois as duplas e finalmente os acessórios. Barras: 7-18: 0.1µm.

## 5. Discussão

Esse é o primeiro estudo a se observar espermatozóides da família Evaniidae e o segundo a observar espermatozóides de membros da superfamília Evanioidea. Para essa superfamília eram conhecidas somente algumas características dos espermatozóides de *Gasteruption* sp. (Gasteruptionidae), vistas provavelmente em microscopia de luz (Quicke *et al.*, 1992). Estes autores, apesar de não deixarem explícito de que parte do sistema reprodutor retiraram os espermatozóides de *Gasteruption* sp, o caráter “A” da tabela II desse mesmo trabalho, deixa claro que nos vasos deferentes de *Gasteruption* sp. não foram observados espermatodesmata.

Nas vesículas seminais, tanto de *E. appendigaster* quanto de espécimes dos gêneros *Evaniella*, *Hyptia* e *Semaeomyia* (observação pessoal), foram observados espermatodesmatas, ao contrário do que é observado em “Parasítica”. A presença desse estado agregado dos espermatozóides em Evaniidae é o primeiro registro para himenópteros não pertencentes aos “Symphyta” e Aculeata, sugerindo que, dentro de Hymenoptera, muitos Apocrita tenham perdido o estado, ao invés da hipótese de Apocrita ter perdido o estado e somente Aculeata teve o estado revertido (homologia) ou surgido de novo (homoplasia) (Moreira *et al.*, 2004).

O padrão de inserção dos espermatozóides na matriz em *E. appendigaster* (Fig.19A) é semelhante às formas encontradas em Aculeata (Moreira *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005), pois nas regiões de transição de estruturas foram observados níveis diferentes entre os lados da seção, diferente de “Symphyta” (Newman & Quicke, 1999a; Lino-Neto *et al.*, 2008a), onde níveis diferentes estão entre o centro e a periferia (Fig. 19B) e em forma de “espiral” (Quicke *et al.*, 1992), o que reflete em uma maneira diferente de inserção dos espermatozóides na matriz extracelular, sugerindo estados diferentes de um mesmo caráter. A forma de inserção em “espiral” (Quicke *et al.*, 1992) não é representada por uma imagem clara, o que torna difícil a caracterização esquemática dessa estrutura.

A semelhança na maneira de inserção dos espermatozóides na matriz extracelular, entre os membros de Aculeata e Evaniidae, reforça a hipótese de que Aculeata ser grupo irmão do um grupo de “Parasítica” ao qual pertence Evaniidae (Sharkey, 2007).

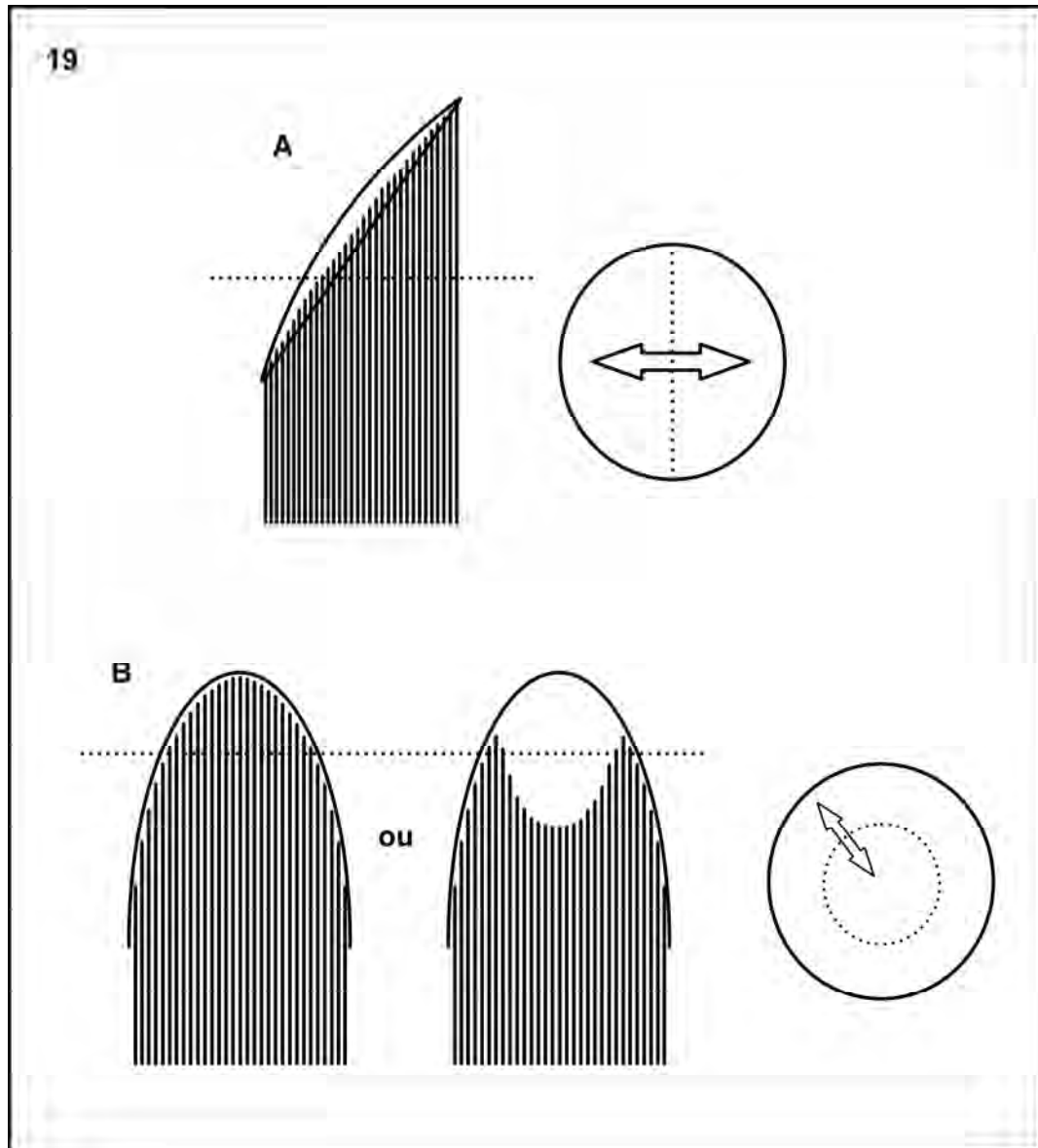


Figura 19A e B: Esquema de cortes transversais e longitudinais de feixes de Hymenoptera. A. Feixes em *E. appendigaster* e Aculeata. B. Feixes em “Symphyta”.

Por Evaniidae, que se encontra dentro do agrupamento “Parasitica”, apresentar espermatozoides em feixes como “Symphyta” e alguns Aculeata, pode-se entender que a não agregação dos espermatozoides em feixe seja uma derivação mais recente do que o proposto por Lino-Neto *et al.* (2008a).

Dentre os “Parasitica” que apresentam espermatozoides não organizados em feixe, há aqueles que possuem a terceira camada revestindo todo complexo acrossomal e a extremidade anterior do núcleo, Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b) e Chalcidoidea (Lee & Wilkes, 1965; Hogge & King, 1975; Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999; Lino-Neto *et al.*, 2000a;

Lino-Neto & Dolder, 2001b), e os que não possuem, Scelionidae (Lino-Neto *et al.*, 2001a), Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000) e Braconidae (Newman & Quicke, 1998). No entanto não existe evidência que a terceira camada seja uma estrutura homóloga à matriz extracelular, que agrega os espermatozóides em “Symphyta”, Evaniidae e alguns Aculeata (Lino-Neto *et al.*, 2008b) e que a ausência da terceira camada seja um estado derivado.

Os espermatozóides de *E. appendigaster* são lineares e seguem o padrão morfológico de Hymenoptera (Lino-Neto *et al.*, 2008b). O comprimento total dos espermatozóides de 100  $\mu\text{m}$  em *E. appendigaster* está dentro da grande amplitude observada para Hymenoptera, que pode variar de 8  $\mu\text{m}$  (Quicke *et al.*, 1992) a 1500  $\mu\text{m}$  (Zama *et al.*, 2005a). Esse comprimento total em *E. appendigaster* é semelhante à *Gasteruption* sp. que possui 120  $\mu\text{m}$  de comprimento total (Quicke *et al.*, 1992).

O adjunto do centríolo de *E. appendigaster*, assim como muitos “Symphyta” (Newman & Quicke, 1999a; Quicke *et al.*, 1992), Apidae (Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979; Peng *et al.*, 1992, 1993; Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001), Ichneumonoidea (Chauvin *et al.*, 1988; Newman & Quicke, 1998) e Megalyroidea (Newman & Quicke, 2000) é assimétrico, diferente dos outros himenópteros que são simétricos ou que perderam o adjunto do centríolo (ver Zama *et al.*, 2004).

A assimetria dos derivados mitocondriais em *E. appendigaster* é caracterizada pela diferença de comprimento, diâmetro, formato e composição dos derivados mitocondriais. A área do derivado piriforme com maior eletrondensidade provavelmente é de material paracristalino, devido sua localização e conhecimento de que, em muitos Hymenoptera, pelo menos um derivado apresenta material paracristalino (Lino-Neto *et al.*, 2008b) como visto em *E. appendigaster*.

O fato do axonema de *E. appendigaster* ter início ao lado da base nuclear é característico dos Aculeata, *Apis mellifera* (Lino-Neto *et al.*, 2000b), *Xylocopa frontalis* (Fiorillo *et al.*, 2009) e *Vespa crabro* (Mancini *et al.*, 2009). Da mesma forma, o fim do axonema segue o padrão encontrado apenas em Aculeata (Lino-Neto *et al.*, 2008b), reforçando a hipótese defendida por Sharkey (2007).

Os espermatozóides em feixe de Evaniidae e a ultra-estrutura dos

mesmos em *E. appendigaster*, associados com os dados existentes na literatura sobre espermatozoides de Hymenoptera, apresentam semelhanças entre os espermatozoides de Evaniidae e aqueles de “Symphyta” e de Aculeata, que podem ser homólogas. Essas semelhanças corroboram a hipótese de origem dos himenópteros com ferrão, a partir de um grupo de “Parasitica” e Apocrita (“Parasitica”+Aculeta) a partir de um grupo de “Symphyta” (Sharkey, 2007), nesse caso, Evaniidae representaria um grupo que retém algumas características de “Symphyta” e compartilha outras com Aculeata. Essa maior semelhança entre as ultra-estruturas dos espermatozoides de *E. appendigaster* e Aculeata sugere que no futuro, estudos cladísticos possam demonstrar essa proximidade entre Evaniidae e Aculeata.

## 6. Conclusões

Após o estudo morfológico dos espermatozóides de *E. appendigaster*, e observações dos espermatozóides de outros gêneros de Evaniidae, concluímos que:

- os espermatozóides de *E. appendigaster* possuem morfologia padrão de Hymenoptera;
- em Apocrita a não agregação dos espermatozóides em feixe provavelmente é um estado mais recente do que o proposto;
- a presença de feixe em Evaniidae, entre outros caracteres, indica que o grupo de "Parasítica" ao qual Evaniidae pertence, possa ser grupo irmão de Aculeata.



## 7. Referências Bibliográficas

- Araújo, VA; Zama, U; Dolder, H & Lino-Neto, J (2005) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 22 (3): 137-141.
- Austin, AD & Downton M (2000) The Hymenoptera - an introduction. p. 3-7. In Austin AD & Downton M (Eds.). **The Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control**. Melbourne, CSIRO Publishing, 468 pp.
- Baccetti, B (1970) The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: Baccetti, B. **Comparative spermatology**. New York, Academic Press, pp. 169-182.
- Ballowitz, E. (1916) Spermiozeugmen bei Libellen. *Biologisches Centralblatt*, 36: 209-216.
- Basibuyuk, HH; Fitton, MG; Rasnitsyn, AP & Quicke, DLJ (2000a) Two new genera of the Evaniidae (Insecta: Hymenoptera) from Late Cretaceous New Jersey amber. p. 313-325. In: Grimaldi, D (ed.). **Studies in Amber with Particular Reference to the Cretaceous of New Jersey**. Netherlands, Backhuys Publishers, 504 pp.
- Basibuyuk, HH; Rasnitsyn, AP; Fitton, MG & Quicke, DLJ (2000b) An archaic new genus of Evaniidae (Insecta: Hymenoptera) and implications for the biology of ancestral evanioids. *Bulletin of The Natural History Museum of London (Geology)*, 56: 53-58.
- Basibuyuk, HH; Rasnitsyn, AP; Fitton, MG & Quicke, DLJ (2002) The limits of the family Evaniidae (Insecta: Hymenoptera) and a new genus from Lebanese amber. *Insect Systematics and Evolution*, 33: 23-34.
- Báo, SN; Simões, DG & Lino-Neto, J (2004) Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1983 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener and Moure 1975 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 36: 23-28.
- 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.
- Caetano, FH (1980) Ultra-estrutura dos espermatozóides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). *Naturalia*. 5: 105-111.
- Cameron, E (1957) On the parasites of the cockroach II: *Evania appendigaster* (L.). *Bulletin of Entomological Research*, 48: 199-209.
- 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.
- Cholodkovsky, NA (1913) Über die Spermatozoiden der Locustiden. *Zoologischer Anzeiger*, 41: 615-619.
- Conte, M; Lino-Neto & J; Dolder, H (2005) Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): Fate of the atypical spermatids. *Caryologia*, 58 (2): 183-188.
- Cruz-Höfling, MA; Cruz-Landim, C & Kitajima, EW (1970) The fine structure of

- spermatozoa from the honey bee. *Annais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 69-78.
- Dallai, R (1974) Spermatozoa and phylogenesis. A few data on Insecta Apterygota. *Pedobiology*, 14: 148-156.
- Dallai, R & Afzelius, BA (1993) Development of the accessory tubules of insect sperm flagella. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 25: 499-504.
- Deans, AR (2005) Annotated catalog of the world's ensign wasp species (Hymenoptera: Evaniidae). *Contributions of the American Entomological Institute*, 34: 1-165.
- Deans, AR & Huben, M (2003) Annotated key to the ensign wasp (Hymenoptera: Evaniidae) genera of the world, with descriptions of three new genera. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 105: 859-875.
- Deans, AR; Basibuyuk, HH; Azar, D & Nel, A (2004) Descriptions of two new Early Cretaceous (Hauterivian) ensign wasp genera (Hymenoptera: Evaniidae) from Lebanese amber. *Cretaceous Research*, 25: 509-516.
- Deans, AR; Gillespie, JJ & Yoder, MJ (2006) An evaluation of ensign wasp classification (Hymenoptera: Evaniidae) based on molecular data and insights from ribosomal RNA secondary structure. *Systematic Entomology*, 31: 517-528.
- Edmunds, LR (1953) Some notes on the Evaniidae as household pests and as a factor in the control of roaches. *Ohio Journal of Science*, 53: 121-122.
- Engel, MS (2006) Two ensign wasps in Cretaceous amber from New Jersey and Myanmar (Hymenoptera: Evaniidae). *Polskie Pismo Entomologiczne (Polish Journal of Entomology)*, 75: 443-454.
- Fernández, F & Sharkey, M (2006) **Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical**. Bogotá Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, 893 pp.
- Fiorillo, BS; Coelho, AAM; Lino-Neto, J & Báó, 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; Báó, SN (2005b) Ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 22 (Suppl.): 60-61.
- Fiorillo, BS; Lino-Neto, J & Báó, SN (2008) Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron*, 39: 1271-1280.
- Fiorillo, BS; Zama, U; Lino-Neto, J & Báó, SN (2009) Structural and ultrastructural studies of male reproductive tract and spermatozoa in *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 89: doi: 10.1111/j.1463-6395.2009.00396.x
- Fox, EGP & Bressan-Nascimento, S (2006) Biological characteristics of *Evania appendigaster* (L.) (Hymenoptera: Evaniidae) in different densities of *Periplaneta americana* (L.) oothecae (Blattodea: Blattidae). *Biological Control*, 36: 183-188.
- Grimaldi, DA & Engel MS (2005) Evolution of insects. Cambridge, Cambridge

University Press, 755 pp.

- Hoage, TR & Kessel, RG (1968) An electron microscopical study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee with special reference to replication and elimination. *Journal of Ultrastructure Research*, 24: 6-32.
- Hogge, MAF, & King, PE (1975) The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Submicroscopic Cytology*, 7: 81-96.
- Hwang, S-Y & Chen, L-M (2004) Effects of four physical treatments of oothecae of *Periplaneta americana* on parasitism and development of parasitic wasp *Evania appendigaster*. *Environmental Entomology*, 33(5): 1321-1326.
- Jamieson, BGM (1987) **The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. Cambridge, Cambridge University Press, 320 pp.
- Jamieson, BGM; Dallai, R & Afzelius, BA (1999) **Insects: their spermatozoa and phylogeny**. New Hampshire, Scientific publishers, 555 pp.
- Kawada, R & Azevedo, CO (2007) Taxonomic revision of the neotropical ensign wasp genus *Decevania* (Hymenoptera: Evaniidae). *Zootaxa*, 1496: 1-30.
- Lee, PE & Wilkes, A (1965) Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. *Science*, 147; 1445-1446.
- Lensky, Y; Ben-David, E & Schindler, H (1979) Ultrastructure of the spermatozoan of the mature drone honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 18: 264-271.
- Lino-Neto, J; Bao, SN & Dolder, H (1999) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28: 253-259.
- Lino-Neto, J; Bao SN & Dolder, H (2000a) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica* (Stockholm), 81: 205-211.
- Lino-Neto, J; Bao, SN & Dolder, H (2000b) Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue and Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001a) Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*, 30: 89-96.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2001b) Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica* (Stockholm), 82: 159-164.
- Lino-Neto, J & Dolder, H (2002) Sperm structure and Ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue and Cell*, 34: 124-128.
- Lino-Neto, J; Dolder, H; Mancini, K; Mercati, D & Dallai, R (2008a) The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue and Cell*, 40: 185-193.
- Lino-Neto, J; Zama, U; Mancini, K (2008b) Morfologia dos espermatozoides de Hymenoptera. p. 150-173. In: Vilela, EF; Santos, IA; Schoereder, JH;

Campos, LAO; Lino-Neto, J (Org.). **Insetos Sociais: Da Biologia à Aplicação**. 1ª ed. Viçosa-MG: UFV, v. 1, 442 pp.

- Mancini, K; Lino-Neto, J; Campos, LAO & Dolder, H (2006) Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Insectes Sociaux*, 53: 333-338.
- Mancini, K; Lino-Neto, J; Dolder, H & Dallai, R (2009) Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Vespidae). *Arthropod Structure & Development*, 38: 54-59.
- Moreira, J; Zama, U & Lino-Neto, J (2004) Release, behaviour and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata (Hymenoptera). *Brazilian journal of morphological sciences*, 21: 185-189.
- Moya, J; Mancini, K; Lino-Neto, J & Dolder, H (2007) The exclusive 9+9+1 axoneme of *Pseudomyrmex penetrator* spermatozoa (Hymenoptera: Formicidae) *Brazilian journal of morphological science*, 22(Supplement): 55-56
- Newman, TM & Quicke, DLJ (1998) Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *Journal of Hymenoptera Research*, 7: 25-37.
- Newman, TM & Quicke, DLJ (1999a) Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera:Symphyta). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 35-47.
- Newman, TM & Quicke, DLJ (1999b) Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 197-203.
- Newman, TM & Quicke, DLJ (2000) Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megalyroidea). *Journal of Hymenoptera Research*, 9: 62-70.
- Nieves-Aldrey, JL & Fontal-Cazalla, FM (1999) Filogenia y evolución del orden Hymenoptera, pp. 459-474, In: Melic, A; Haro, JJ; Mendez, M & Ribera, I (eds.). **Evolución y filogenia de Arthropoda**. Volumen monográfico SEA, No. 26.
- Peng, CYS; Yin, CM & Yin, LRS (1992) Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiological Entomology*, 17: 269-276.
- Peng, CYS; Yin, CM & Yin, LRS (1993) Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera* sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiological Entomology*, 18: 93-101.
- Phillips, DM (1970) Insect flagellar tubule patterns theme and variations. In: Baccetti, B. **Comparative spermatology**. New York, Academic Press, pp. 263-278.
- Quicke, DLJ; Ingram, SN; Baillie, HS & Gaitens, PV (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta*, 21: 381-402.
- Roth, LM & Willis, ER (1960) The biotic associations of cockroaches. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 141: 1-470.
- Rothschild, L (1955) The spermatozoa of the honey bee. *Transactions of the*

*Royal Entomological Society of London*, 107: 289-294.

- Sharkey, MJ (2007) Phylogeny and Classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, 1668: 521-548.
- Simmons, LW (2001) Sperm in Competition II: Sperm Morphology. p. 250-275. In: Simmons, LW. **Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects**. New Jersey, Princeton University Press, 434 pp.
- Thompson, TE & Blum, MS (1967) Structure and behavior of spermatozoa of fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera - Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 60: 632-642.
- Triplehorn, CA & Johnson, NF (2005) **Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects**. 7th ed. Belmont, Thomson- Brooks/Cole, pp. 864.
- Wheeler, DE; Crichton, EG & Krutzsch, PH (1990) Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *Journal of Morphology*, 206: 343-350.
- Wilkes, A & Lee, PE (1965) The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in hymenoptera *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 7: 609-619.
- Yeh, C-C; Huang, C-C & Lin, C-S (2000) Prior experience affects the oviposition behavior in *Evania appendigaster* (L.). *Chinese Journal of Entomology*, 20(1): 13-21.
- Yeh, C-C & Mu, C-C. (1994) Observation of life history of *Evania appendigaster* (L.) (Hymenoptera: Evaniidae) in the laboratory. *Chinese Journal of Entomology* 14: 369-378.
- 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 (2005a) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Insectes Sociaux*, 52 (2): 122-131.
- Zama, U; Lino-Neto, J; Melo, SM; Campos, LAO; Dolder, H & Bao, SN (2005b) The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera:Apoidea:Sphecidae), as indicative of bee relation. *Journal Submicroscopic Cytology and Pathology*, 37: 313-321.
- Zama, U; Moreira, J; Bao, SN; Campos, LAO; Dolder, H & Lino-Neto, J (2007) Morphology of Testicular and Post-testicular Spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure and Development*, 36: 304-316.