

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PEDRO VALE DE AZEVEDO BRITO

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES DE *Melittobia hawaiiensis*,  
PERKINS, *M. australica*, GIRAULT (CHALCIDOIDEA: EULOPHIDAE) E  
*Neochrysis lecointei*, DUCKE (CHRYSIDOIDEA: CHRYSIDIDAE), COM  
CONSIDERAÇÕES FILOGENÉTICAS EM APOCRITA (HYMENOPTERA).**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Pedro Vale de Azevedo Brito  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Celular e Estrutural, na área de  
Biologia Celular.

  
Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Co-Orientador: Prof. Dr. José Lino Neto

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B777m	<p>Brito, Pedro Vale de Azevedo</p> <p>Morfologia dos espermatozóides de <i>Melittobia hawaiiensis</i>, Perkins, <i>M. australica</i>, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae) e <i>Neochrysis lecointei</i>, Ducke (Chrysoidea: Chrysididae), com considerações filogenéticas em Apocrita (Hymenoptera) / Pedro Vale de Azevedo Brito. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Mary Anne Heidi Dolder, José Lino Neto. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Melittobia</i>. 2. <i>Neochrysis</i>. 3. Hymenoptera. 4. Espermatozóides - Ultraestrutura. 5. Filogenia. I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Lino Neto, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
-------	--

**Título em inglês:** Spermatozoa morphology of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins, *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae) and *Neochrysis lecointei*, Ducke (Chrysoidea: Chrysididae), with phylogenetic considerations in Apocrita (Hymenoptera).

**Palavras-chave em inglês:** *Melittobia*; *Neochrysis*; Hymenoptera; Spermatozoa - Ultrastructure; Phylogeny.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Mary Anne Heidi Dolder, Lúcio Antonio de Oliveira Campos, Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello.

**Data da defesa:** 15/02/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 15 de fevereiro de 2008.

## BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr . Lúcio Antonio de Oliveira Campos



Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello



Assinatura

Profa. Dra. Marina Amélia Pinto Viégas da Silveira Santos

Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Assinatura

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me permitido realizar todos os meus sonhos até agora, me fornecendo meios para superar as dificuldades e persistência para continuar tentando sempre.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã pelo amor que sempre demonstraram, por jamais terem medido esforços por mim e por sempre apoiarem minhas decisões. Agradeço aos meus avós por terem sido um exemplo de vida no qual tento me espelhar sempre.

Agradeço aos meus sogros pela confiança depositada e pelo apoio manifestado de diversas formas.

Agradeço à professora Mary Anne Heidi Dolder por ter aceitado o desafio de me orientar mesmo sem me conhecer muito bem e por sempre demonstrar calma nos momentos em que eu pensava em me desesperar. Agradeço também ao professor José Lino Neto que aceitou ser meu co-orientador e mais uma vez me ajudou com sua experiência e seus conselhos.

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular que sempre se puseram à disposição para me ajudar em todas as questões. Aos colegas de laboratório eu agradeço pela convivência agradável e pelos momentos de conversa, que ajudaram a tornar as obrigações do trabalho mais agradáveis.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por viabilizar meus estudos.

Por último, o mais importante. Agradeço à minha esposa Cíntia e ao meu filho Daniel por serem capazes de encher todos os meus dias de alegrias e sorrisos. Por terem me ensinado um novo significado para a vida, mostrando que tudo é mais simples quando estamos juntos de quem nos ama.

dedico este trabalho  
e toda a minha vida  
à minha esposa  
e ao meu filho

## Índice

<b>Resumo.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>1- Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1- A ordem Hymenoptera.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2- <i>Melittobia</i> (Parasítica: Chalcidoidea).....</b>	<b>12</b>
<b>1.3- <i>Neochrysis lecointei</i> (Aculeata: Chrysididae).....</b>	<b>14</b>
<b>1.4- Os Espermatozóides de Hymenoptera.....</b>	<b>16</b>
<b>2- Objetivo Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3- Resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1- Sperm structure and ultrastructure of the <i>Melittobia hawaiiensis</i>, Perkins and <i>M. australica</i>, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae).....</b>	<b>21</b>
<b>3.2- Ultrastructure of <i>Neochrysis lecointei</i>, Ducke spermatozoa (Chrysididae: Chrysididae), with phylogenetics considerations.....</b>	<b>36</b>
<b>4- Discussão.....</b>	<b>53</b>
<b>5- Conclusões.....</b>	<b>59</b>
<b>6- Referências.....</b>	<b>60</b>

## Resumo

Hymenoptera é uma das maiores ordens de inseto no mundo e nenhum outro grupo possui tantas espécies benéficas para o homem quanto esse. A morfologia dos espermatozoides tem provado ser capaz de fornecer dados úteis para estudos filogenéticos em diversos grupos de insetos, inclusive os Hymenoptera. Porém, os estudos existentes até o momento descrevendo a morfologia dos espermatozoides nessa ordem ainda não são suficientes para permitir inferências filogenéticas mais abrangentes. Neste trabalho descrevemos a morfologia dos espermatozoides de *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica* (Chalcidoidea) e de *Neochrysis lecointei* (Chryridoidea) resultando em dois manuscritos que estão em fase de submissão. Comparando os dados desse estudo com os disponíveis na literatura observamos que algumas características como a presença de estruturas espiraladas nos espermatozoides, presença de material extracelular associado ao ápice dos espermatozoides e a ordem de desorganização dos microtúbulos do axonema no final do flagelo, parecem fornecer informações possíveis de serem utilizadas na filogenia das superfamílias de Hymenoptera. Outras características, como a morfologia do adjunto do centríolo e dos derivados mitocondriais, parecem ser capazes de fornecer informações que indicam as relações de parentesco entre táxons inferiores, inclusive gêneros (ou tribos) da mesma família.

## **Abstract**

Hymenoptera is one of the largest insect orders in the world and no other group presents so many benefic species for humanity. In spite of these insects' importance, there are still many uncertainties about this group's phylogeny. Spermatozoa morphology has proved useful in resolving phylogenetic questions in many insects' orders, including Hymenoptera, although the available studies describing sperm morphology in this order do not include enough taxa to allow detailed phylogenetic studies. This study describes the sperm morphology of *Melittobia hawaiiensis* and *M. australica* (Chalcidoidea) and of *Neochrysis lecointei* (Chrysoidea), which resulted in two manuscripts to be submitted for publication. Comparing data obtained in this study with those available in the literature there are some characteristics such as the presence of spiraling structures in spermatozoa, the extracellular material coating spermatozoa apex and the order of disorganization of the axoneme microtubules at the flagellum end that could be used to provide information about the Hymenoptera superfamilies' phylogeny. Other characteristics, such as the centriolar adjunct and mitochondrial derivatives' morphology, provide information about the relationships among inferior taxons, including those of the same genera, or tribes of the same family.



## **1 - Introdução**

### **1.1 - A ordem Hymenoptera**

Hymenoptera é uma das maiores ordens de insetos, com aproximadamente 115.000 espécies descritas (Gaston, 1991). Apesar das formigas cortadeiras, que causam enormes prejuízos na agricultura das regiões Neotropicais, pertencerem a esta ordem, nenhum outro grupo de insetos possui tantas espécies benéficas para o homem quanto os Hymenoptera (Hanson, 1995).

As abelhas melíferas têm sido exploradas há séculos para produção de mel e cera, mas sua maior importância está, sem dúvida, relacionada à polinização de espécies vegetais, onde colméias são utilizadas para aumentar a produtividade de lavouras. Na América do Norte, o valor estimado para essas lavouras atinge bilhões de dólares (Levin, 1983). As abelhas da subtribo Meliponina (abelhas “sem ferrão”) também possuem grande impacto econômico e ecológico nas regiões neotropicais, já que colméias de muitas espécies são usadas na melipocultura. No entanto, o maior interesse no estudo dessas abelhas advém do fato de constituírem importantes polinizadores de espécies vegetais nativas (Neff & Simpson, 1993).

A ordem Hymenoptera também é considerada o grupo de insetos mais importante no controle de pragas, já que concentra a maioria das espécies de insetos parasitóides e muitas espécies de predadores (Hanson, 1995). Os parasitóides, ao contrário dos parasitas, matam seus hospedeiros durante seu desenvolvimento, e causam, portanto, grande impacto na população destas espécies. Assim, o interesse na conservação e no desenvolvimento de técnicas adequadas de manejo dos Hymenoptera vem crescendo a cada dia. O

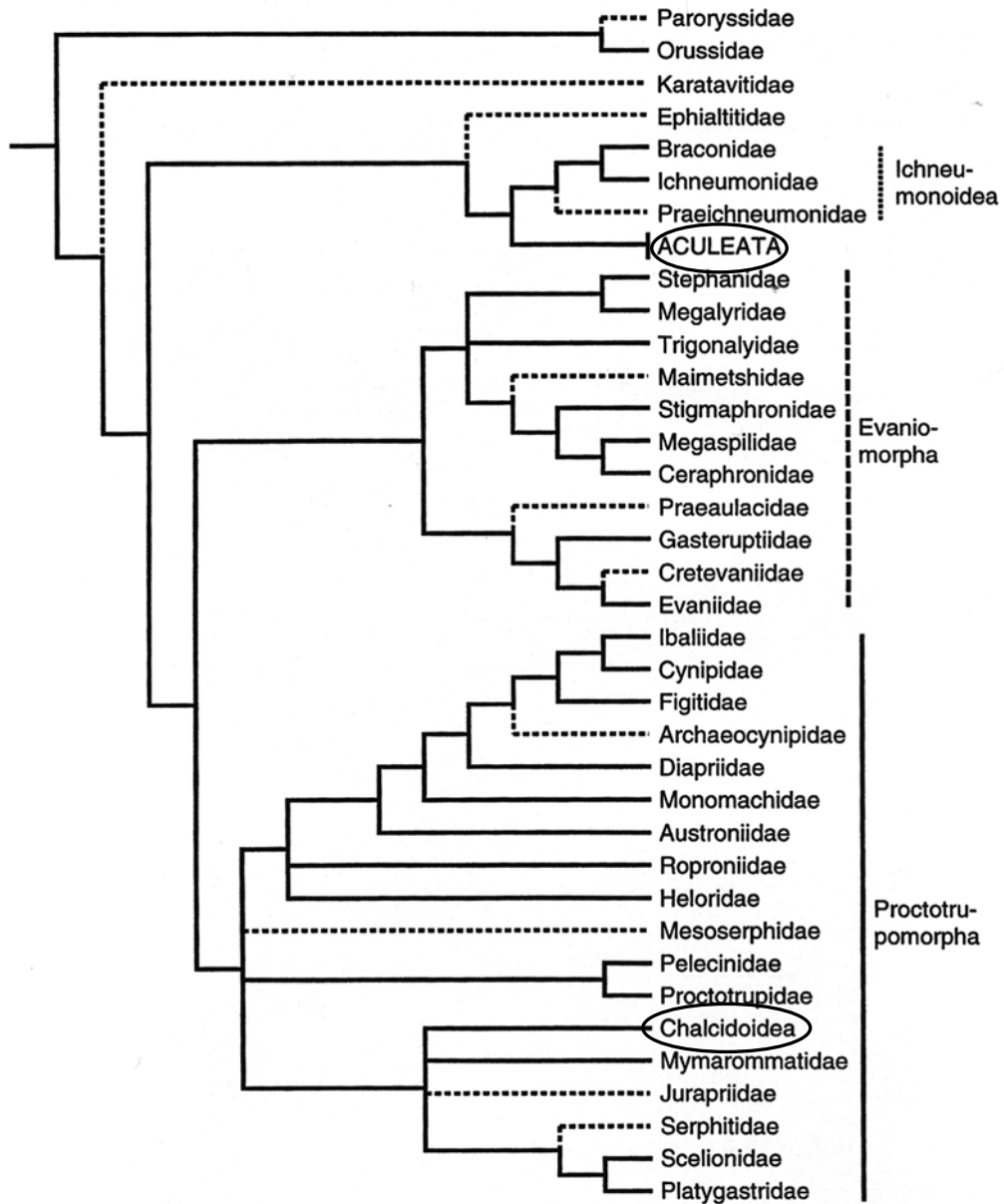
conhecimento sobre a biologia e a evolução deste grupo é essencial para o estudo de suas espécies e para o estabelecimento e planejamento de estratégias de conservação das mesmas.

A ordem Hymenoptera é dividida em duas subordens: Symphyta e Apocrita. A subordem Symphyta é um grupo parafilético, ou seja, artificial, que reúne os Hymenoptera mais basais (Gauld & Bolton, 1988; Naumann, 1991; Smith, 1993), sendo formada por quatro superfamílias: Megalodontoidea, Cephoidea, Siricoidea e Orussoidea (Hanson & Gauld, 1995).

A subordem Apocrita é derivada de Symphyta e é considerada monofilética (Gauld & Hanson, 1995). Esta subordem se subdivide em dois grupos: Parasitica e Aculeata (Figs. 1 e 2). O grupo Aculeata é considerado o grupo mais derivado em Hymenoptera, sendo caracterizado pela modificação do ovipositor das fêmeas em um ferrão e é um grupo considerado monofilético (Brothers, 1975). Aculeata é composto por três superfamílias: Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea (Brothers, 1975; Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Hubner, 1993). Parasitica reúne todas as demais espécies de Apocrita e é um grupo considerado parafilético em relação a Aculeata (Gauld & Hanson, 1995). As relações filogenéticas entre os principais grupos de Parasitica são mais confusas do que as relações em Symphyta e Aculeata. No entanto, existem algumas superfamílias com monofiletismo bem estabelecido como Ichneumonoidea, Chalcidoidea, Platygastroidea, Cynipoidea e Ceraphronoidea (Ronquist, 1999).

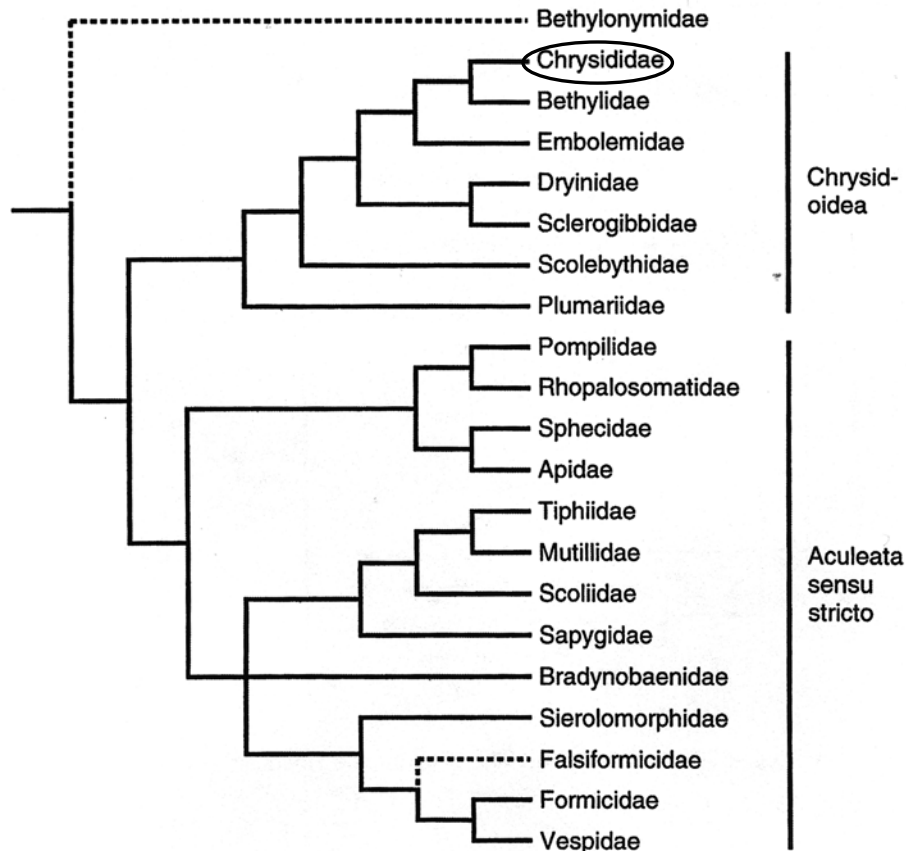
As espécies objeto desse estudo são representantes de duas superfamílias: *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica* pertencem à família Eulophidae,

Chalcidoidea (Parasitica), enquanto *Neochrysis lecointei* pertence à família Chrysididae, superfamília Chryidoidea (Aculeata).



**Fig. 1** – Filogenia do grupo Parasitica segundo Rasnitsyn (1988). Retirado de Ronquist *et al.*, 1999.

As linhas pontilhadas indicam grupos extintos.



**Fig. 2** – Filogenia dos Aculeata, segundo Rasnitsyn (1988). Retirado de Ronquist *et al.*, 1999. As linhas pontilhadas indicam grupos extintos.

### 1.2 - *Melittobia* (Parasitica: Chalcidoidea)

Rasnitsyn (1988) sugeriu que as espécies do grupo Parasitica fossem divididas em três outros subgrupos: Evaniomorpha, Proctotrupomorpha e Ichneumonoidea. Ichneumonoidea foi sugerido como sendo o grupo irmão de Aculeata, enquanto Evaniomorpha e Proctotrupomorpha juntos formariam os Microhymenoptera. A proximidade entre Ichneumonoidea e Aculeata foi sustentada por análises filogenéticas posteriores (Ronquist *et al.*, 1999) e por estudos com dados moleculares (Dowton & Austin, 1994). Por outro lado, o grupo Microhymenoptera mostrou-se artificial (Ronquist *et al.*, 1999). A superfamília

Chalcidoidea foi incluída em Proctotrupomorpha (Rasnitsyn, 1988), porém, a relação com as demais superfamílias do grupo ainda não está bem estabelecida. Por exemplo, a relação entre Chalcidoidea, Platygastroidea e Mymarommatoidea precisa ser mais bem estudada (Gibson *et al.*, 1999; Gibson, 1999).

A superfamília Chalcidoidea é a segunda maior entre os Hymenoptera, composta por 21 famílias (Boucek, 1988; Grissel & Schauff, 1990), com aproximadamente 2.000 gêneros e 19.000 espécies descritas, mas acredita-se que esse número pode chegar a mais de 100.000 espécies (Noyes, 1990). Muitos Chalcidoidea podem apresentar colorações verde ou azul metálico, mas também são observadas espécies em tons de marrom e amarelo (Hanson & LaSalle, 1995). A superfamília Chalcidoidea é um dos grupos com maior diversidade de hábitos alimentares, uma vez que as larvas de suas espécies podem variar desde herbívoras até carnívoras (Hanson & LaSalle, 1995). Muitos Chalcidoidea são parasitóides e atacam espécies em 15 ordens de insetos e 2 ordens de Arachnida (Hanson & LaSalle, 1995), sendo portanto importantes para o equilíbrio biológico e usadas também no controle biológico de pragas.

Eulophidae é a maior família dentre os Chalcidoidea (LaSalle & Schauff, 1995) e possui 3.977 espécies descritas em 283 gêneros (Noyes, 1998). Os indivíduos desta família têm comprimento variando entre 0,4 e 6,0 mm, mas raramente excedendo 3,0 mm (LaSalle & Schauff, 1995). A maioria das espécies desta família são parasitóides de estágios imaturos de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, sendo a terceira família de Chalcidoidea mais importante para o controle biológico de pragas (LaSalle & Schauff, 1995).

Além da importância no uso para controle biológico, as espécies desta família têm sido usadas como modelos experimentais importantes no estudo de uma série de questões ecológicas e evolutivas, graças à grande diversidade biológica dessas espécies e à riqueza de literatura disponível para o grupo (Godfray, 1994) o que permite embasamento teórico para os experimentos. Ainda assim, existem algumas questões filogenéticas que não estão bem esclarecidas nesta família, como por exemplo, o monofiletismo das subfamílias Euderinae e Entedoninae (Gauthier *et al.*, 2000).

O gênero *Melittobia* pertence à família Eulophidae, subfamília Tetrastichinae, sendo composto por 13 espécies, que são ectoparasitóides de pré-pupas de espécies de Aculeata, geralmente *Trypoxylon* e *Sceliphron* (Sphecidae) (González *et al.*, 2004). Porém, em laboratório, eles também podem parasitar larvas de Coleoptera e Diptera (Dahms, 1984). Os machos de *Melittobia* correspondem a aproximadamente 3% da população e possuem asas e olhos atrofiados (Schmieder & Whiting, 1947). Os machos emergem primeiro que as fêmeas e, como não se afastam muito do ninho, é freqüente haver acasalamento entre irmãos e entre mãe e filho (Schmieder & Whiting, 1947). Esse comportamento reprodutivo torna as espécies do gênero *Melittobia* interessantes modelos para estudos de ecologia, comportamento e biogeografia (Mathews, 1997, 2000).

### **1.3 - *Neochrysis lecointei* (Aculeata: Chrysoidea)**

O grupo Aculeata é constituído por espécies em que as fêmeas possuem o ovipositor modificado em ferrão. Análises do ovipositor dessas espécies sugerem

que o grupo Aculeata seja dividido em três superfamílias: Apoidea, Vespoidea e Chrysidoidea (Oeser, 1961), sendo Chrysidoidea considerado grupo irmão de Aculeata *sensu stricto* (Apoidea + Vespoidea) (Brothers, 1975; Brothers & Carpenter, 1993; Ronquist *et al.*, 1999).

A superfamília Apoidea é constituída pelas abelhas e pelas vespas esfecóides que são conhecidas pelos seus ninhos de barro facilmente encontrados em casas e prédios. Já a superfamília Vespoidea é constituída pelas formigas e pelas vespas sociais (marimbondos). No entanto, as espécies da superfamília Chrysidoidea são menos conhecidas e estudadas e não possuem nomes populares.

Os indivíduos da superfamília Chrysidoidea normalmente apresentam colorações verde e azul metálico, eles são parasitóides de outros insetos ou são cleptoparasitas de outros Aculeata (Gauld & Hanson, 1995). Os ovos de espécies cleptoparasitas são depositados em ninhos de outras espécies e as larvas se desenvolvem alimentando-se das provisões deixadas pelos pais do hospedeiro e também dos ovos deste (Hanson *et al.*, 1995). Dessa forma, as espécies de Chrysidoidea desempenham um importante papel no equilíbrio ecológico.

A superfamília Chrysidoidea é composta por aproximadamente 4.000 espécies (Goulet & Hubner, 1993) que se distribuem em sete famílias: Chrysididae, Bethylidae, Dryinidae, Embolemidae, Plumariidae, Sclerogibbidae e Scolebythidae. Apesar de não restarem muitas dúvidas quanto a Chrysidoidea ser um grupo monofilético (Gauld & Hanson, 1995), a relação entre suas famílias ainda apresenta algumas divergências (Königsmann, 1978; Rasnitsyn, 1980; Carpenter, 1986). No entanto, a família Chrysididae têm sido considerada grupo

irmão de Bethylidae devido a modificações no ferrão das espécies dessas famílias (Oeser, 1961; Carpenter, 1986; Brothers & Carpenter, 1993; Brothers, 1999).

A família Chrysididae, onde se encontra a espécie *Neochrysis lecointei*, é a maior dentre os Chryridoidea, com aproximadamente 3.000 espécies descritas, distribuídas em 84 gêneros (Kimsey & Bohart, 1991). O gênero *Neochrysis* é o maior gênero da região neotropical e seus hospedeiros são normalmente vespas esfecóides, sendo *Sceliphron* e *Trypoxylon* os mais comuns (Kimsey & Bohart, 1980). Normalmente, apenas um ovo de *N. lecointei* se desenvolve em cada célula do ninho do hospedeiro, sendo que mais de uma célula pode estar parasitada em cada ninho. Os parasitóides são os primeiros a emergir do ninho hospedeiro e as células parasitadas são facilmente reconhecidas pelo formato característico da pupa de *Neochrysis*.

#### **1.4 - Os Espermatozóides de Hymenoptera**

Os espermatozóides da ordem Hymenoptera são geralmente finos e alongados. Eles são divididos em duas regiões distintas: cabeça e flagelo. A cabeça é formada, na sua porção anterior, pelo acrossomo (vesícula acrossômica e perforatorium) e posterior ao acrossomo encontra-se o núcleo. O perforatorium é uma estrutura cilíndrica de comprimento variável que é envolvida pela vesícula acrossômica e que se insere numa cavidade no ápice do núcleo. Em alguns grupos de Hymenoptera, encontra-se associada ao acrossomo e ao ápice do núcleo uma camada extracelular da qual irradiam inúmeros filamentos. O núcleo é alongado e geralmente apresenta cromatina condensada.



O flagelo é constituído por um axonema, dois derivados mitocondriais, um adjunto do centríolo e dois corpos acessórios. O axonema geralmente segue o padrão 9+9+2, com nove túbulos acessórios externos, nove duplas e um par central de microtúbulos. Ele se estende por todo comprimento do flagelo e geralmente é o último elemento a se desorganizar. Os derivados mitocondriais são originados a partir da fusão das mitocôndrias durante a espermatogênese. Em seções transversais, eles podem possuir a mesma área, ou um pode ser maior que o outro. Os derivados se estendem ao longo do flagelo desorganizando-se um pouco antes do axonema terminar. Os corpos acessórios são estruturas alongadas que se encontram presentes entre os derivados mitocondriais e o axonema. Já o adjunto do centríolo é observado na região de transição entre o núcleo e o flagelo. Ele pode se localizar anterior aos dois derivados mitocondriais (simétrico), ou apenas de um derivado (assimétrico). Acredita-se que sua função seja manter a união entre a cabeça e o flagelo do espermatozóide.

Embora seja possível determinar uma estrutura geral para os espermatozóides dos Hymenoptera, é importante observar que existe uma grande diversidade morfológica em torno desse padrão.

A diversidade morfológica entre espermatozóides de diferentes espécies têm sido usada como fonte de caracteres para análises filogenéticas em diferentes grupos animais, inclusive insetos (Baccetti, 1970; Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1995, 1999). Esses dados são importantes porque podem se somar a dados morfológicos tradicionais e moleculares para auxiliar na resolução de questões filogenéticas mal esclarecidas.

Em Hymenoptera tem havido um crescente número de trabalhos descrevendo a morfologia dos espermatozóides. No entanto, esses trabalhos ainda não abrangem todos os grupos da ordem. Os principais trabalhos existentes envolvem a descrição dos espermatozóides de espécies em:

- subordem **Symphyla** (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999a).
- subordem **Apocrita** (Parasítica), nas superfamílias:
  - **Chalcidoidea** (Wilkes & Lee, 1965; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a),
  - **Platygastroidea** (Lino-Neto & Dolder, 2001b),
  - **Megalyroidea** (Newman & Quicke, 2000),
  - **Cynipoidea** (Newman & Quicke, 1999b) e
  - **Ichneumonoidea** (Chauvin *et al.*, 1988; Quicke, 1997).
- subordem **Apocrita** (Aculeata) nas superfamílias:
  - **Apoidea** (Peng *et al.*, 1993; Lino-Neto *et al.*, 2000b; Báó *et al.*, 2004; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a, b, 2007; Fiorillo *et al.*, 2005),
  - **Vespoidea** (Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini *et al.*, 2006; Moya *et al.*, 2007) e
  - **Chrysoidea** (Oliveira, 2007).

## 2 – Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo descrever a morfologia dos espermatozoides de três espécies da ordem Hymenoptera que apresentam material extracelular associado ao seu ápice, visando aumentar a abrangência desses estudos dentro da ordem e contribuir para futuros estudos filogenéticos.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Descrever a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozoides de *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica* (Chalcidoidea).
- b) Descrever a ultra-estrutura dos espermatozoides de *Neochrysis lecointei* (Chryridoidea), com ênfase nas estruturas extracelulares associadas à cabeça dos espermatozoides.

### 3 - Resultados

Os resultados obtidos nesse trabalho originaram dois manuscritos.

**3.1** - O primeiro manuscrito, intitulado “**Sperm structure and ultrastructure of *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae)**”, descreve a morfologia dos espermatozóides de duas espécies do gênero *Melittobia* apresentando uma série de caracteres morfológicos diferentes em relação aos espermatozóides dos Chalcidoidea já estudados. Este manuscrito foi submetido para publicação no periódico científico “Tissue & Cell”.

**3.2** - O segundo manuscrito, intitulado “**Ultrastructure of *Neochrysis lecointei*, Ducke spermatozoa (Chrysididae), with phylogenetic comments**”, descreve a morfologia dos espermatozóides de *Neochrysis lecointei*, apresentando características até então não observadas em espermatozóides de outros Hymenoptera já estudados. Este manuscrito está em fase final de preparação para submissão no periódico científico “The Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research”.

### 3.1 -

#### **Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae)**

##### **Authors:**

P. Brito<sup>1</sup> ; J. Lino-Neto<sup>2</sup> ;H. Dolder<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, CP 6109 – Unicamp, CEP: 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP: 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

**Running title:** *Melittobia* sperm morphology

**Keywords:** *Melittobia*; Eulophidae; Chalcidoidea; Hymenoptera; ultrastructure; sperm.

##### **Acknowledgements**

The authors thank Dr. Karina Mancini for carefully reading this text and the Brazilian financial agency, CAPES.

**Correspondence to:** Dr. Heidi Dolder, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP. 6109, Campinas, SP, Brasil, 13083-863. Fax: + 55 19 35216111, Phone: + 55 19 35216114, e-mail: heidi@unicamp.br.

This manuscript is an original submission.

## **Abstract**

Spermatozoa morphology has, for some years, been used to help answer some phylogenetic questions for Hymenoptera. This is the second study describing spermatozoa morphology of an Eulophidae species in which many important differences were observed. *Melittobia* spermatozoa measure approximately 270  $\mu\text{m}$  in length. They present spiraling structures and an extracellular layer, with numerous radiating filaments coating the head apex. The acrosome is formed by an acrosomal vesicle, which does not contain a perforatorium. The nucleus is helicoidal and completely filled with compact chromatin. A centriolar adjunct is observed at the nucleus-flagellum transition; it associates laterally with the nucleus and presents two small expansions, which reach around the centriole. Two mitochondrial derivatives are observed and present different areas in cross-sections. In the derivative with the larger diameter, two distinct regions are observed, a small one, near the axoneme, with a clear "fissure" inside, and a larger region where the cristae are observed. Both derivatives initiate near the nucleus, but the larger diameter derivative finishes first, before the flagellum extremity. At the end of the axoneme, the accessory microtubules are the first to disorganize. No accessory bodies are observed between the mitochondrial derivatives and the flagellum.

## Introduction

The Hymenoptera, with more than 115.000 species described, is one of the major insect orders of the world (Gaston, 1991). The superfamily Chalcidoidea is the second more specious among the Hymenoptera, with approximately 21.250 species in 2.040 genera (Noyes, 1998). Moreover, the species of this superfamily present great biological diversity, with larval feeding habits ranging from phytophagous to carnivorous (Hanson & LaSalle, 1995)

Eulophidae is the major family among the Chalcidoidea, with approximately 4.000 species and 283 genera (Noyes, 1998). Many species are used in biological control of coleopteran and lepidopteran pests (LaSalle & Schauff, 1995). *Melittobia* males are eyeless and short winged, so that they present reduced locomotion capacity and mate with their sisters, resulting in high endogamy rates. The presence of reproductive strategies like this one makes some Eulophidae species interesting models for biogeography studies (Mathews, 1997, 2000).

Besides the Chalcidoidea superfamily's ecological and economic importance, there are still many uncertainties about their phylogeny. An example of this is the poorly established relationships among the Chalcidoidea, Platygastroidea and Mymarommatoidea superfamilies (Gibson, 1999; Gibson *et al.*, 1999). Also inside the Eulophidae family, there are unresolved questions such as the possible monophyly of some subfamilies, which is not clear (Gauthier *et al.*, 2000). Resolving these questions is essential to comprehending the phylogenetics of Chalcidoidea and other Hymenoptera.

Spermatozoan morphology has been used to help answer some phylogenetic questions in Hymenoptera (Quicke *et al.*, 1992; Jamieson *et al.*,

1999). However, the studies in this order do not include all representative groups in the order. Among Chalcidoidea, there are few studies describing the spermatozoa morphology (Wilkes & Lee, 1965; Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001). In Eulophidae family, only the species *Dahlbominus fuscipennis* has its spermatozoa morphology described by Wilkes & Lee (1965).

The aim of this study was to describe the spermatozoa morphology of *Melittobia hawaiiensis* and *M. australica* with the intention of furnishing data that could be used in future phylogenetic study.

## **Material and Methods**

Adult males of *Melittobia australica* and *M. hawaiiensis* were collected from trap nests of Sphecidae and bees species that were infested by these parasites. Images of both species were used indiscriminately to illustrate their characteristics, since they did not present different features.

### *Light Microscopy*

Seminal vesicles were dissected and squashed on clean glass microscope slides, followed by spreading, then fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, the slides were observed with an Olympus BX41 photomicroscope equipped with a phase contrast lens to allow measurement of the spermatozoa. For nuclei measurements, some slides were stained for 15 minutes by 0.2 µg/ml of 4,6-diamino-2-phenylidole (DAPI) and analysed with an epifluorescence Olympus BX60 microscope equipped with a BP360-370 excitation filter. The images were analyzed using the Image Pro Plus program.



### *Transmission electron microscopy*

Seminal vesicles were dissected in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH7.2 and fixed in a 2.5% glutaraldehyde and 0.2% picric acid solution with the same buffer, for 24h at 4° C. The material was post-fixed in 1% osmium tetroxide solution in the same buffer. The material was dehydrated using acetone and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate in distilled water and 0.2% lead citrate in a 1N sodium hydroxide solution and observed with a Transmission Electron Microscope, Zeiss Leo 906.

For basic protein detection, the ethanolic phosphotungstic acid method (E-PTA) was applied. Seminal vesicles were fixed only in buffered glutaraldehyde solution for 24h at 4° C. The material was dehydrated in an alcoholic series and treated *en bloc* by a 2% PTA solution in absolute alcohol and embedded in Epon.

### **Results**

The *Melittobia australica* and *M. hawaiiensis* spermatozoa are long and slender, measuring approximately 270 µm in length. No dimorphism was observed in the spermatozoa studied. They are divided into two regions, head and flagellum (Fig. 1). The head region consists of a nucleus and an acrosome. The nucleus measures approximately 8.5 µm in length and is helically twisted (Fig. 2), filled with homogenous compacted chromatin and tapers gradually from base toward the apex. Nuclear cross sections are round with a diameter varying from 340 to 30 nm from the base toward the apex (Fig. 3). Above the nucleus, a short acrosome measuring approximately 260 nm in length is observed. It has a median electron density and no perforatorium was observed (Figs. 3 and 4).

An extracellular structure coats the spermatozoa from the apex over a length of 1.3  $\mu\text{m}$ . This structure consists in an amorphous layer with numerous filaments irradiating from it (Fig. 4). At the nucleus-flagellum transition the centriolar adjunct is inserted in a lateral depression at the nucleus base (Fig. 5). The centriolar adjunct partially encircles the nucleus (Figs. 6 and 8) and presents two small expansions reaching around the centriolar region (Fig. 7). The nucleus is E-PTA negative, differently from the centriolar adjunct that is positive (Figs. 8 and 9).

The flagellum is made up of two mitochondrial derivatives and an axoneme. No accessory bodies were identified between the mitochondrial derivatives and the axoneme. The axoneme begins from the centriole at the nucleus base and follows the 9+9+2 microtubules pattern, with the nine single accessory microtubules, nine doublets and a central pair (Figs. 10-13). The centriolar region is E-PTA positive (Fig. 9) and characterized by the absence of the central microtubules (Fig. 7). The spiraling of the axoneme can be clearly identified in longitudinal sections (Figs. 15-17). In cross sections not all tubules can be sectioned at perfectly right angles (Figs. 12-14). At the axoneme's final portion, the accessory microtubules are the first to disorganize (Fig. 11).

Both mitochondrial derivatives begin close together below the nucleus (Figs. 5 and 9) and follow together, coiling around the axoneme, with a complete turn every 2.2  $\mu\text{m}$  (Fig. 15). In cross sections they present different areas (Fig. 14). The derivative with a larger area begins a little above the smaller one and is observed in cross sections beside the centriole and the centriolar adjunct (Fig. 7). A constriction can be found in the derivative with larger area appearing in a pear

shape, in cross sections; this constriction originates two different portions, a smaller one near the axoneme and a more distant larger one (Figs. 10 and 14).

At the portion near the axoneme, an electron lucid fissure with electron dense material surrounding it can be found (Figs. 10 and 14). The layer around the fissure is the only E-PTA positive feature of either derivative (Fig. 8). The cristae of the larger derivative are seen in the portion that is more distant in relation of the axoneme (Figs. 7 and 10). The mitochondrial derivative with the smaller area has cristae, but does not present differentiated regions and is circular in cross section (Figs. 10, 12 - 15).

The mitochondrial derivatives follow the spiral of the axoneme, as shown in transverse sections where the smaller derivative is always found next to the ninth and the larger one next to the eighth doublet (considering the first microtubule doublet as that one exactly above the central pair of microtubules, following a perpendicular plane) (Figs. 12 and 13).

In the final portion of the flagellum, the mitochondrial derivatives terminate at different levels, with the smaller diameter derivative extending further than the larger one (Figs. 11 and 13). The smaller diameter mitochondrial derivative still continues spiraling together with the axoneme for a very long portion, making a full turn every 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 16). The axoneme is the last structure still present at the tip of the flagellum (Fig. 11), and it extends alone for a long portion (Fig. 17).

## **Discussion**

Similar to what was described in other Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001), with exception of the Eulophidae *Dahlbominus*

*fuscipennis* (Wilkes & Lee, 1965), in *Melittobia hawaiiensis* and *M. australica*, no spermatozoa dimorphism were observed.

Spermatozoa morphology of the two *Melittobia* species described in this study is similar to most Chalcidoidea, with helicoidal structures, a pair of mitochondrial derivatives, extracellular material associated at the spermatozoa apex and a 9+9+2 axoneme pattern with accessory microtubules as the first to disorganize at the flagellum tip (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001).

In *M. australica* and *M. hawaiiensis* spermatozoa, the acrosome is one of the shortest described up to this moment in Hymenoptera. The absence of a perforatorium, as observed in these two *Melittobia*, was reported also in other Chalcidoidea species, *Trichogramma pretiosum* and *T. dendrolimi* (Trichogrammatidae) (Lino-Neto *et al.*, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001). However, this structure was present in *Bephratelloides pomorum* (Eurytomidae) (Lino-Neto *et al.*, 1999) and *T. atopovirilia* (Trichogrammatidae) (Lino-Neto *et al.*, 2000).

Comparing the mitochondrial derivatives morphology of *Melittobia* species and what were described for other Chalcidoidea species (Wilkes & Lee, 1965; Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001), many important differences could be observed. The different shapes of mitochondrial derivatives in cross sections, as observed in *M. australica* and *M. hawaiiensis*, were never observed in Chalcidoidea superfamily before. Even in *D. fuscipennis* that belongs to the same family of the genus *Melittobia*, the mitochondrial derivatives are similar in shape (Wilkes & Lee, 1965). Mitochondrial derivatives with different shapes in cross sections are common in other Hymenoptera groups

such as Vespoidea (Mancini *et al.*, 2006) and Apoidea (Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005; Báo *et al.*, 2004). But in most of these cases, when the derivatives do not finish together at the flagellum end, the derivative with the smaller area finishes first (Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005), different from *M. australica*, *M. hawaiiensis* and some Vespidae (Mancini, personal communication) in which the larger derivatives finish first.

Two distinct portions in the larger derivative, one near the axoneme with an electron lucid “fissure” and another more distant, were never observed in any other Chalcidoidea before (Wilkes & Lee, 1965; Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001). The E-PTA response of the region around the “fissure” indicates a specialization of this part, with a different protein composition.

The derivatives morphology observed in *M. hawaiiensis* and *M. australica* is also different from that observed for Platygastroidea, in which the spermatozoa present only one mitochondrial derivative that twists around the spermatozoan structures, along their entire length (Lino-Neto & Dolder, 2000).

Centriolar adjunct morphology in these two *Melittobia* species is similar to that observed in other Chalcidoidea, as *T. pretiosum*, *T. atopovirilia* and *T. dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001; Lino-Neto *et al.*, 2000). However, the Chalcidoidea *B. pomorum* presents a different centriolar adjunct, which twists around the nucleus (Lino-Neto *et al.*, 1999). The centriolar adjunct is E-PTA positive in *Melittobia* and E-PTA negative in *T. pretiosum*, *T. atopovirilia* and *B. pomorum* (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000). This indicates a different protein

composition for these structures, with more basic proteins in the *M. australica* and *M. hawaiiensis* centriolar adjunct.

The centriole E-PTA positive response can be explained by the prevailing protein composition of this structure responsible for axoneme organization.

The terminal sequence of the axonemal microtubules in *Melittobia* species studied here is the same observed in all Chalcidoidea studied up to the moment, with the nine accessory microtubules finishing first (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001), whereas in most of the Aculeata, these microtubules are the last to be disorganized (Zama *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2006).

*Melittobia* spermatozoa do not have accessory bodies, or they are so reduced that they could not be distinguished, as seems to occur in most Chalcidoidea, with *B. pomorum* being the only exception described so far (Lino-Neto *et al.*, 1999).

Spermatozoa morphology of *Melittobia australica* and *M. hawaiiensis* present many similarities with those described for other Chalcidoidea: a) spiraling structures; b) apical associated extracellular material forming a cap; c) a pair of mitochondrial derivatives; d) axonemal microtubules terminal sequence. These characteristics probably suggest the monophily of this group. However, there are many variable characteristics among Chalcidoidea families, such as the presence or absence of a perforatorium, and the centriolar adjunct E-PTA response. Other characteristics vary even in Eulophidae family: a) different or similar areas for the mitochondrial derivatives; b) presence of specialized structures (such as the

electron lucid “fissure”) in the derivatives; c) mitochondrial derivatives finishing at different levels; d) spermatozoa dimorphism.

Despite the similarities and differences observed, further research, including more unstudied families must be carried out for Hymenoptera, in order to enable correct analysis in future phylogenetic studies.

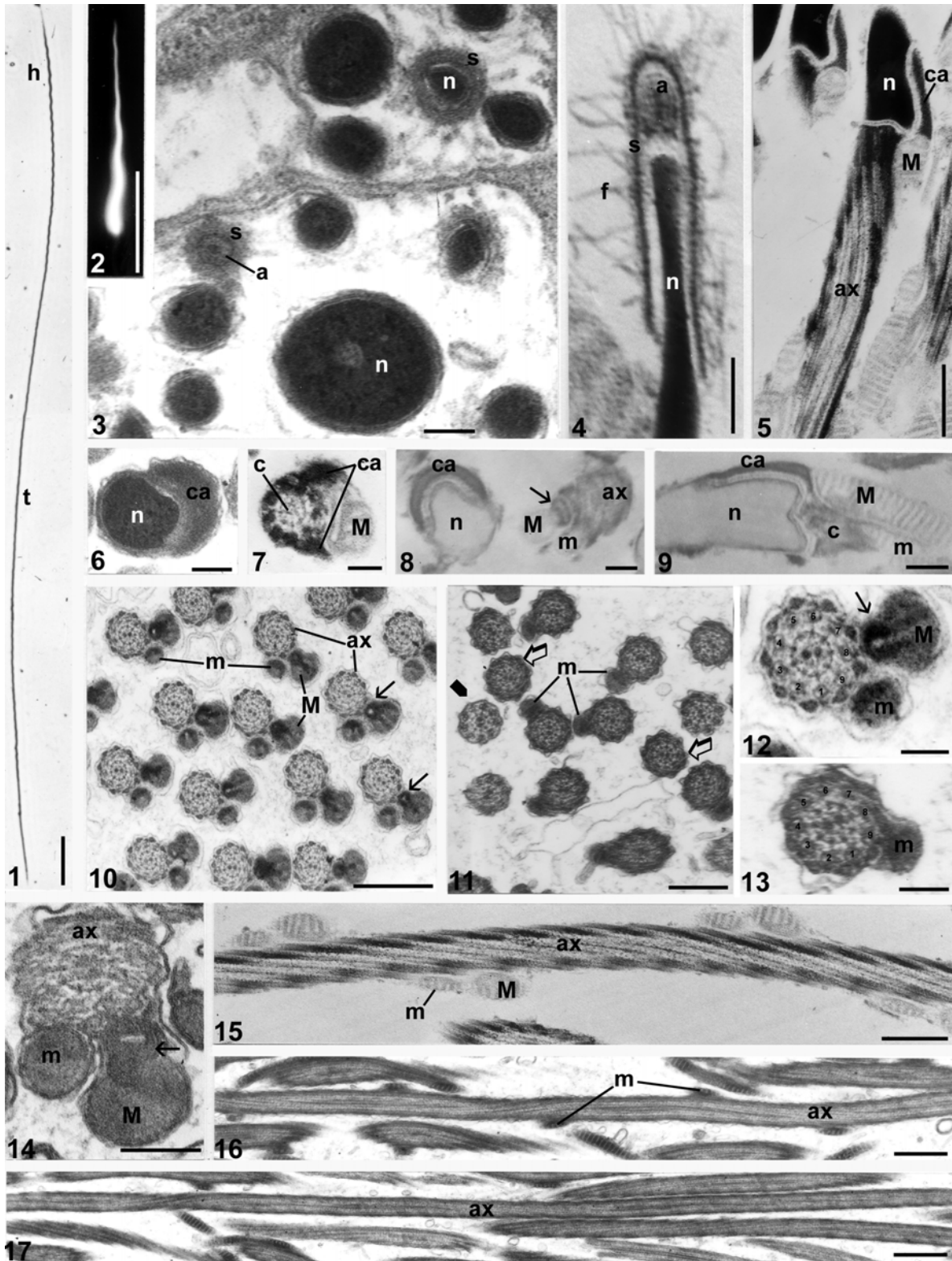
## References

- Báo, S. N., Simões, D. G. & Lino-Neto J., 2004. Sperm ultrastructure of the bees *Examalopsis (Examalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener & Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 36 (1), 23-28.
- Fiorillo, B. S., Coelho, A. A. M., Lino-Neto, J. & Báo, S. N., 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 37 (1), 75-81.
- Gaston, K. J., 1991. The magnitude of global insect species richness. Conserv. Biol. 5, 283-296.
- Gauthier, N., LaSalle, J., Quicke, D. L. J. & Godfray, H. C. J., 2000. Phylogeny of the Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids. Syst. Entomol. 25, 521-539.
- Gibson, G. A., 1999. Sister group relationships of the Platygastroidea and Chalcidoidea (Hymenoptera) – an alternative hypothesis to Rasnitsyn (1988). Zool. Scr. 28, 125-138.
- Gibson, G. A. P., Heraty, J. M. & Woolley, J. B., 1999. Phylogenetics and classification of Chalcidoidea and Mymarommatoidea – a review of current concepts (Hymenoptera, Apocrita). Zool. Scr. 28, 87-124.
- Hanson, P. E. & LaSalle, J., 1995. The chalcidoid families. In: The Hymenoptera of Costa Rica. Ed. Hanson & Gauld. Oxford University Press, London, UK, 893, 266-388.
- Jamieson, B. G. M., Dallai, R. & Afzelius, B. A., 1999. Insects: Their spermatozoa and phylogeny. Science Publishers, Enfield, NH, 555.
- LaSalle, J. & Schauf, M. E., 1995. The chalcidoid families. Eulophidae. In: The Hymenoptera of Costa Rica. Ed. Hanson & Gauld. Oxford University Press, London, UK, 893, 315-319.
- Lino-Neto, J., Báo, S. N. & Dolder, H., 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). Int. J. Insect Morphol. Embriol. 28: 253-259.
- Lino-Neto, J., Báo, S. N. & Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Acta Zool. (Stockholm) 81: 205-211.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H., 2001. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolini* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Acta Zool. (Stockholm) 82: 159-164.
- Lino-Neto, J. & Dolder H., 2000. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. Zool. Scr., 30: 89-96.



- Mancini, K., Lino-Neto, J., Campos, L. A. O. & Dolder, H., 2006. Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.* 53: 333-338.
- Mathews, R. W., 1997. Teaching ecological instructions with mud dauber nests. *Amer. Biol. Teacher.* 59, 152-158.
- Mathews, R. W., 2000. Developing life science instructional materials using a parasitic wasp, *Melittobia digittata* Dahms (Hymenoptera: Eulophidae): A case study. In: *Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control*. Eds: Austin, A. D. & Dolton, M. CSIRO Publishing. 423-433.
- Noyes, J. S., 1998. Catalogue of the Chalcidoidea of the world. Electronic Publication (CD-ROM). ETI, Amsterdam.
- Quicke, D.J.L., Ingram, S.N., Baillie, H.S. & Gaitens, P.V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.* 21: 381-402.
- Wheeler, D. E., Crichton, E. G. & Krutzsch, P. H., 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.* 206, 343-350.
- Wilkes, A. & Lee, P. E., 1965. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in the hymenopteron *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). *Can. J. Genet. Cytol.* 7, 609-619.
- Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H., 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.* 10 (2), 261-270.
- Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H., 2004. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue & Cell* 36, 29-41.
- Zama, U., Lino-Neto, J., Brito, P., Campos, L.A.O., Dolder, H. & Báo, S.N., 2005. The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 37 (3-4): 91-99.

**Figs. 1-17)** Light (1,2) and electron (3-17) microscopy images of spermatozoa of the two *Melittobia* species. **1)** Phase contrast of the spermatozoa, (h) head and (t) tail. **2)** Fluorescent micrograph of the spiraling nucleus stained with DAPI. **3)** Cross sections of the head in different levels, (n) nucleus, (a) acrosome, (s) extracellular layer. **4)** Longitudinal section of the head apex. Notice filaments radiating from the extracellular cap. **5)** Longitudinal section of the transition from head to flagellum where (ca) is the centriolar adjunct, (ax) axoneme, (M) the larger mitochondrial derivative. **6-7)** Cross sections of the transition region between head and flagellum. **8)** Transverse sections at the base of the nucleus and beginning of the flagellum, stained with E-PTA. (m) smaller mitochondrial derivative, (arrow) layer around the fissure of the larger derivative. **9)** Longitudinal section of the transition region between the head and the flagellum stained with E-PTA, (c) centriolar region. **10,11)** Transverse sections of the flagellum at different levels. Notice in (11) final portions of the flagellum with only the smaller derivative (m), followed by the axoneme alone, below the derivatives (open arrow), and finally the terminal portion with the microtubules beginning to disorganize (dark arrow). **12,13)** Cross sections of the flagellum with the doublets numbered, and the smaller mitochondrial derivative, which is longer than the larger one (already ended). **14)** Transverse section of the flagellum showing details of the derivatives, including the clear fissure in the larger derivative (arrow). **15-17)** Longitudinal sections of the flagella with two mitochondrial derivatives (15), with only the smaller one (16) and without either derivative (17). Scale bars: 1)= 15 $\mu$ m; 2)= 4 $\mu$ m; 3, 6, 7, 8, 12, 13) = 0.1  $\mu$ m; 4, 11, 15)= 0.3 $\mu$ m; 5, 10, 16)= 0.4 $\mu$ m; 9)= 0.2 $\mu$ m; 14)= 0.15 $\mu$ m; 17)= 0.8 $\mu$ m.



### 3.2 -

## **Ultrastructure of *Neochrysis lecointei*, Ducke spermatozoa (Chrysoidea: Chrysididae), with phylogenetic comments**

### **Authors:**

Brito, P<sup>1</sup>., Lino-Neto, J<sup>2</sup>. & Dolder, H<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, IB, Unicamp.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV)

**Running title:** *Neochrysis lecointei* sperm morphology

**Keywords:** *Neochrysis*; Chrysididae; phylogeny; ultrastructure; spermatozoa.

---

Correspondence to: Dr. Heidi Dolder, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), CP. 6109, Campinas, SP, Brasil, 13083-863. Fax: + 55 19 35216111, Phone: + 55 19 35216114, e-mail: heidi@unicamp.br.

**Abstract**

The superfamily Chrysidoidea is considered the most basal in Aculeata (Hymenoptera), so that knowledge of this group's phylogeny is important for studies of the Hymenoptera order. The aim of this study is to describe the morphology of *Neochrysis lecointei* spermatozoa, making comparisons with the existing morphological data with the intention of providing ultrastructural characters that may be useful for future phylogenetic studies. The acrosome and the greater part of the spermatozoa nuclei are coated by two extra cellular structures in *N. lecointei*. The outer structure is a homogeneous fibrillar coat that extends between 600 and 860 nm beyond the inner structure. A loose fibrillar material fills the space left between the two structures. This material is sometimes arranged in electron dense bodies. The inner structure is composed by components of variable electron density, which are organized around the spermatozoa. Near the flagellum, the inner structure ends 1  $\mu\text{m}$  before the outer coat, which, in turn, finishes 1  $\mu\text{m}$  before the flagellum begins. The acrosome is formed by an acrosomal vesicle and a perforatorium that fits its base in a 0.13  $\mu\text{m}$  deep cavity in the nuclear tip. The nuclei are elliptical in cross section and filled by a poorly condensed chromatin. The flagellum is formed by an axoneme with a 9+9+2 microtubule arrangement, two mitochondrial derivatives, one longer than the other, and an asymmetric centriolar adjunct.

## Introduction

Hymenoptera is one of the largest insect orders, with more than 115.000 described species (Gaston, 1991). It is divided into Symphyta and Apocrita suborders (LaSalle & Gauld, 1992). The Apocrita contain the majority of the species and they can be divided into Parasitica and Aculeata. The Aculeata are characterized by the presence of a sting in females, developed from modifications of the ovipositor.

The Aculeata are divided in three superfamilies: Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea. Chrysidoidea is a relatively small group, with approximately 4.000 species distributed in seven families around the world (Goulet & Hubner, 1993). As Chrysidoidea include several parasitoid species, this group have an important ecological role, sometimes being used in biological pest control. Chrysididae is the largest and most thoroughly studied family in Chrysidoidea, with 3.000 species described (Kimsey & Bohart, 1991). Their body color vary from brown or black, to metallic green or blue (O'Neil, 2001).

There are not many uncertainties about Chrysidoidea monophily (Gauld & Hanson, 1995), but the relationships between the families present some divergence (Königsmann, 1978; Rasnitsyn, 1980; Carpenter, 1986). As a basal group in Aculeata, the correct interpretation of Chrysidoidea phylogeny is essential for the phylogeny of the entire group.

Spermatozoa morphology has proved useful in resolving phylogenetic questions in Hymenoptera (Quicke *et al.*, 1992). Although, the ultrastructural data available does not include all representative taxa, since the majority of studies are

concentrated in Apoidea (Lino-Neto *et al.*, 2000; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a, 2005b, 2005c, 2007; Zama, 2003; Báo *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Badke *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005) and Vespoidea (Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini *et al.*, 2006). Only one species of the Chryridoidea superfamily has its spermatozoan morphology described (Oliveira, 2007). The Chryridoidea species studied, *Prorops nasuta*, belongs to the Bethylidae family, considered a sister-group of Chrysididae (Carpenter, 1986; Brothers, 1998).

The aim of this work is to describe the *Neochrysis lecointei* (Chrysididae) sperm morphology and contribute with additional data, which may be useful to clarify the systematics of the order Hymenoptera as a whole.

## **Material and Methods**

The adult males used in this study were parasites of *Trypoxylon* wasps (Crabronidae) and were obtained from trap nests maintained in the Central Apiary of the Federal University of Viçosa, state of Minas Gerais, and in the Santa Genebra Forest, Campinas, state of São Paulo/ Brazil. The reproductive systems were fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid and 3% sucrose in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The material was post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and included in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Zeiss Leo, Transmission Electron Microscope.

## Results

The spermatozoa of *Neochrysis lecointei* are long and slender; they are divided into head and flagellum. The head is formed by the acrosome and the nucleus and is almost integrally coated by two complex and morphologically distinct extracellular structures. One of these structures is external and consists in a fibrillar material that forms a coat of uniform electron density (“e” Figs. 1, 2, 7 and 8). The inner structure seems to be made up of subunits of variable electron density that are organized around the spermatozoon plasmic membrane (“i” Figs. 1, 2, 7 and 8). Both structures are observed extending from above the acrosome to near the flagellum.

The outer coat extends beyond the inner structure for a length varying between approximately 600 and 860 nm and the space formed between them is full of a loose fibrillar material that originates from the external layer. Sometimes, this fibrillar material is arranged forming electron dense bodies observed close to the cap (Figs. 1 and 2). Thin filaments are observed projecting also from the outside surface of the coat (Figs. 1-3).

The inner structure extends approximately 300 nm beyond the acrosome and it tapers a little in the apical portion (Figs. 1 and 2). In cross sections of this portion, loose fibrillar material is still observed between the two structures, while the electron dense fibrillar aggregates are no longer found (Fig. 4). In longitudinal sections, the components of the inner structure are aligned (Figs. 1 and 7) and in cross sections they seem to be organized concentrically around the spermatozoa plasmic membrane (Figs. 5, 6 and 9). The inner structure was always observed



coated by the external coat and tightly associated to the spermatozoon plasmic membrane (Figs. 1-9).

Near the flagellum, the inner structure finishes approximately 1  $\mu\text{m}$  before the outer coat (Fig. 8). Cross sections of this region show only the nucleus and the outer coat, while the space between them is filled with the loose fibrillar material (Fig. 10). The outer cap finishes 1  $\mu\text{m}$  above the flagellum. At this level the cap is disorganizing and its fibrillar nature is clearly observed (Fig. 11). It is also possible to observe the nucleus alone, with no associated structure (Fig. 11).

The acrosome is completely coated by the extracellular structures and is formed by an acrosomal vesicle of median electron density and an electron dense perforatorium, with a clear space between them (Figs. 1, 6 and 7). In cross sections, the acrosome is circular in the apical region (Fig. 5) and is elliptical at the base (Fig. 6). The perforatorium fits into a small cavity, approximately 0.1  $\mu\text{m}$  deep, in the upper nucleus tip (Fig. 7). The spermatozoon nucleus is homogeneously filled with poorly condensed chromatin and is elliptical in cross sections, with approximately 400 x 260 nm at its large and small axes, respectively (Figs. 9-11). Below the extracellular structures, the plasma membrane surrounding the nucleus region seems to be externally associated with an amorphous material similar to a glycocalix (Fig. 11).

The flagellum begins just below the nucleus and consists in an axoneme, a centriolar adjunct, two mitochondrial derivatives (a large and a smaller one) and two accessory bodies. At the flagellum apex, the centriolar adjunct and the large mitochondrial derivative are observed parallel to the axoneme (Figs. 12 and 13). The axoneme follows the 9+9+2 pattern with the nine external single accessory

microtubules, nine doublets and a central pair (Fig. 14). The initial portion of the axoneme, the centriole, is characterized by the absence of the central pair (Fig. 12). Below the centriole, where the central pair of tubules can be seen in the axoneme, the large mitochondrial derivative is approximately 140 nm in diameter (Fig. 14).

The centriolar adjunct is formed by a homogeneous electron dense material and is approximately triangular in cross section (Fig. 14). It is situated between the nucleus and the small mitochondrial derivative (Figs. 12, 13 and 15), and is called asymmetric because of this location. Below the centriolar adjunct both mitochondrial derivatives are observed and have different diameters (not shown). The mitochondrial derivatives present a differentiated region near the axoneme, but no paracrystalline structure was observed. They are circular in cross sections and can be observed along the entire derivatives (Figs. 14 and 16). At the terminal region of the flagellum, the derivatives gradually taper and terminate simultaneously (Fig. 16). An accessory body is observed between each mitochondrial derivative and the axoneme, they are long structures with a linear shape in cross sections (Figs. 14 and 16). At the end of the flagellum, the axoneme is the last structure to disorganize with the accessory microtubules disappearing last (*inset*, Fig. 16).

## **Discussion**

*Neochrysis lecointei* spermatozoa general morphology is similar to the majority of the descriptions for Hymenoptera, not presenting spiraling structures as in Chalcidoidea and Platygastroidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000, Lino-Neto & Dolder, 2001a, 2001b).

An acrosome formed by a perforatorium and an acrosomal vesicle is a characteristic observed in almost all Hymenoptera studied up to the moment. The exceptions are some Chalcidoidea, *Trichogramma dendrolimi* (Lino-Neto & Dolder, 2001b), *T. pretiosum* (Lino-Neto *et al.*, 2000), where no perforatorium was observed, and the Platygastroidea, *Telenomus podisi*, which does not present an acrosome (Lino-Neto & Dolder, 2000).

Cross sections of the acrosome changing the shape from round to elliptical (sections from top to base), as observed in *N. lecointei*, are also observed in: *Solenopsis invicta*, Formicidae (Lino-Neto & Dolder, 2002); *Sceliphron fistularium*, Sphecidae (Zama *et al.*, 2005a) and in Euglossini bees (Zama *et al.*, 2005b). In *Prorops nasuta*, Chrysididae (Oliveira, 2007) and *Agelaia vicina*, Vespidae (Mancini *et al.*, 2006) only elliptical sections were described. But in the Meliponini bees, Apidae (Zama *et al.*, 2001, 2004) and the *Pseudomyrmex* genus, Formicidae (Moya *et al.*, 2007), the acrosome changes from circular to triangular. In all these cases an electron lucid space is observed between the perforatorium and the acrosomal vesicle.

The nucleus with poorly condensed chromatin as observed in this study is uncommon in Hymenoptera, but it was also observed in *Dialictus* spp., Halictidae (Fiorillo *et al.*, 2005) and in the stingless bees *Melipona marginata* and *M. rufiventris* (Zama *et al.*, 2004). Species with isolated clear areas in the spermatozoon nucleus are more frequently observed, as in *P. nasuta*, (Oliveira, 2007), *S. invicta*, (Lino-Neto & Dolder, 2002) and *Bephratelloides pomorum*, (Lino-Neto *et al.*, 1999). Some ant species of *Pseudomyrmex* genera present variable chromatin condensation patterns, even in the same species (Moya *et al.*, 2007).

A centriolar adjunct occurring in the nucleus flagellum transition is a common characteristic among Hymenoptera. As *N. lecointei*, the Aculeata species generally present an asymmetric centriolar adjunct. Only the ants seem to have a symmetric pattern, with both the mitochondrial derivatives located just below the centriolar adjunct (Wheeler, *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007).

Mitochondrial derivatives with the same cross section area and without organized paracrystalline regions, as observed in *N. lecointei*, is a common characteristic in most Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b). Although in Chalcidoidea, the mitochondrial derivatives spiral around the axoneme and both derivatives begin very close the nucleus. These characteristics are not common to most of the Aculeata (Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a, 2005b; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini *et al.*, 2006). In the Chryridoidea *P. nasuta* (Bethyidae), paracrystalline organized regions were observed in both derivatives (Oliveira, 2007), different from *N. lecointei* (Chrysididae) where no region with a crystalline organization was observed in either derivative.

The presence of accessory bodies between the mitochondrial derivatives and the axoneme is a common characteristic among the Aculeata. However, this is not a rule for all Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b) and the Platygastroidea (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

The nine accessory microtubules are the last elements to be disorganized at the flagellum end, as is frequently observed in Aculeata, differing from Chalcidoidea parasitic wasps (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b), where these microtubules are the first to disorganize.

The anterior portion of spermatozoa coated by extracellular material is also observed in parasitic wasps from Chalcidoidea (Lino-Neto et al., 1999, 2000; Lino-Neto & Dolder, 2001b), Ichneumonoidea (Quicke, 1997) and Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999) parasitic superfamilies. However, the extracellular material observed in these species forms only one layer and in Chalcidoidea, many long, thick filaments radiate from this layer. In *N. lecointei*, the filaments are thinner and extend also into the inner space between the external coat and the internal structure. No extracellular structure was observed in *P. nasuta* that belongs to a closely related family to Chrysididae (Oliveira, 2007) or in other Aculeata spermatozoa (Zama et al., 2001, 2004, 2005a, 2005b; Lino-Neto & Dolder, 2002; Mancini et al., 2006). So, considering the basal position of Chrysididae among Aculeata, there are at least two hypothesis: the extracellular material coating the spermatozoa apex is a plesiomorphic characteristic maintained in Chrysididae superfamily, but that was lost in Bethyloidea (*P. nasuta*), or else this characteristic was lost in all of the Aculeata group, reappearing only in the Chrysididae family. To answer this question, more species, from other Chrysididae families must be studied. However, considering the greater complexity observed in *N. lecointei* spermatozoa structures and the absence of this structures in *P. nasuta*, it is more plausible that the characteristic appeared secondarily only in Chrysididae family.

### **Acknowledgements**

The authors sincerely thank Dr. Lynn Kimsey for species identification, Dr. Karina Mancini for carefully reading this text and the Brazilian financial agency, CAPES.

## References

- Araújo VA, Zama U, Dolder H, Lino-Neto J (2005) Ultrastructure of *Scaptotrigona xanthotricha* spermatozoa (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz J Morphol Sci* 22 (3): 137-141.
- Badke J P, Banin T M, Scorza L C T, Zama U, Lino-Neto J, Dolder H (2005) Ultrastructure of Spermatozoa in *Partamona helleri* Friese (1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz J Morphol Sci* 22 (suppl.): 64-65.
- Báo S N, Gonçalves-Simões D, Lino-Neto J (2004) Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener & Moures 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 36: 23-28.
- Brothers, D. J. 1998. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zool Scripta* 28: 233-249.
- Brothers D J, Carpenter J M (1993) Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). *J Hym Res* 2: 227-302.
- Carpenter J M (1986) Cladistics of the Chrysidoidea (Hymenoptera). *J New York Entomol Soc* 94: 303-330.
- Fiorillo B S, Coelho A M, Lino-Neto J, Báo S N (2005) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *J Submicrosc Cytol Pathol* 37: 75-81.
- Gaston K J (1991) The magnitude of global insect species richness. *Conserv Biol* 5: 283-296.
- Gauld I D, Hanson P E (1995) The chrysidoid families. In: *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford University Press, 893: 464-503.
- Goulet H, Hubner J T (1993) *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Research Branch, Agriculture Canada. Centre for Land and Biological Resources Research, Ottawa.
- Kimsey L S, Bohart R M (1991) *The chrysidid of the world*. Oxford University Press.
- Königsmann E (1978) Das phylogetische system der Hymenoptera. Teil 4: Aculeata (Unterordnung Apocrita). *Drutsche Entomologische Zeitschrift*, 25: 365-435.
- 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 & I.D. Gauld) C.A.B International, UK. pp. 1-26.
- Lino-Neto J, Báo S N, Dolder H (1999) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Inter J Insect Morphol Embriol* 28: 253-259.

- Lino-Neto J, Báo S N, Dolder H (2000) Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool (Stockholm)* 81: 205-211.
- Lino-Neto J, Dolder H (2000) Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto J, Dolder H (2001a) Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera: Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool Scripta* 30: 89-96.
- Lino-Neto J, Dolder H (2001b) Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolini* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Acta Zool* 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: 124-128.
- Mancini K, Lino-Neto J, Campos L A O, Dolder H (2006) Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae). *Insect Soc* 53: 333-338.
- Moya J, Mancini K, Lino-Neto J, Delabie J, Dolder H (2007) Sperm ultrastructure of five species of the Neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool (Stockholm)* 88: 181-187.
- Newman T M, Quicke D L J (1999) Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J Hym Res* 8: 197-203.
- Oliveira C M (2007) Estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides de *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bethyilidae). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil (Master thesis).
- O'Neil K M (2001) Solitary wasps: behavior and natural history. Cornell University Press. 406 pp.
- Quicke D L J, Ingram S N, Baillie H S, Gaitens P V (1992) Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool Scripta* 21: 381-402.
- Quicke D L J (1997) Preimaginal development: from gametogenesis to syngamy. In: *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall, pp 470.
- Rasnitsyn A P (1980) Origin and evolution of hymenopterous insects. *Trudy Paleontologicheskogo Instituta Akademiyi Nauk SSSR*, 174: 1-191.
- Wheeler D E, Crichton E G, Krutzsch P H (1990) Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J Morphol* 206: 343-350.
- Zama U (2003) Estudo Estrutural e Ultraestrutural dos Espermatozóides nas Tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com Consideraoes Filogenéticas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP Brasil (Doctoral thesis).

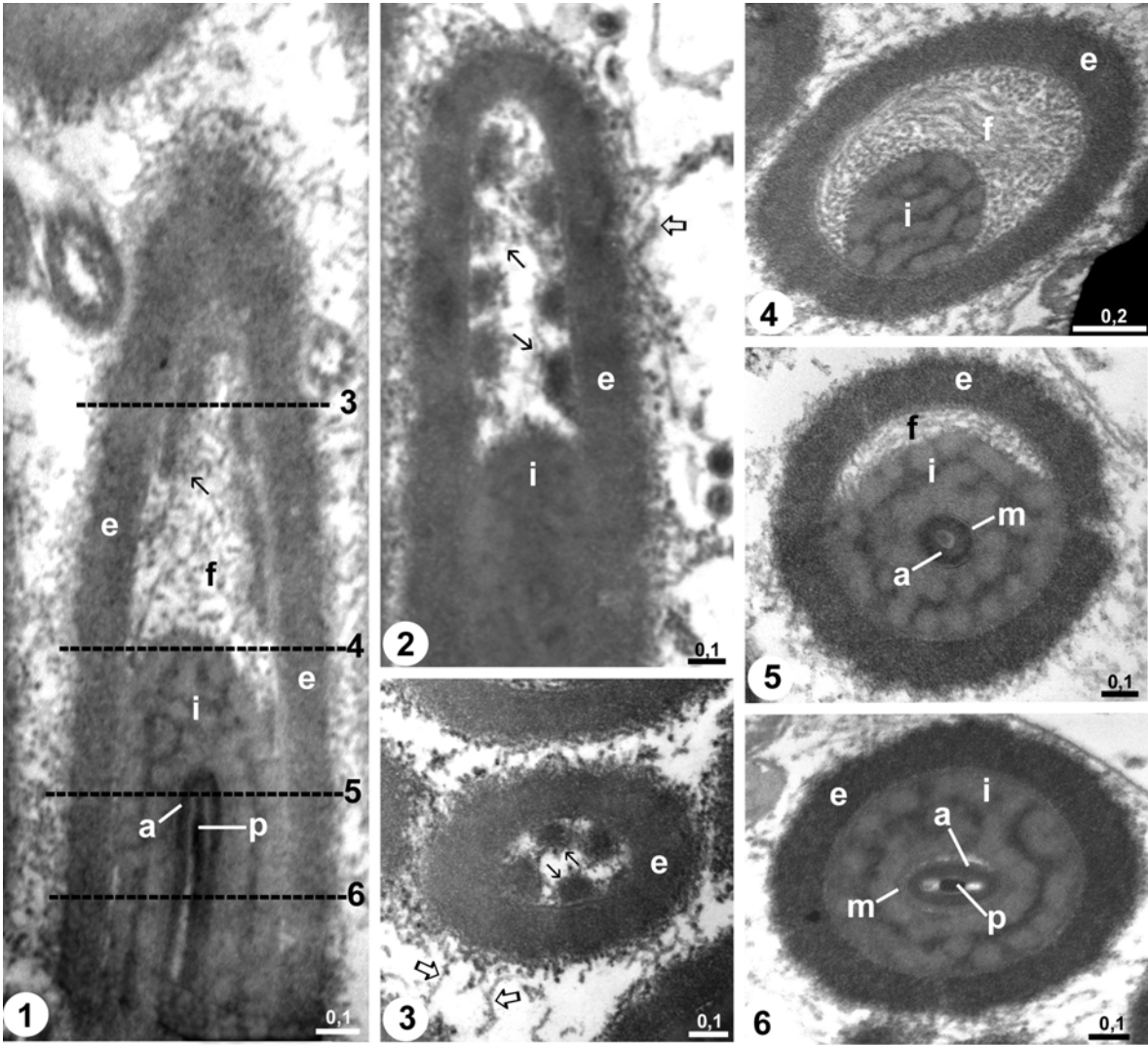
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H (2001) Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J Hym Res 10: 261-270.
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H (2004) Structure and Ultrastructure of Spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). Tissue Cell, 36: 29-41.
- Zama U, Lino-Neto J, Melo S M, Campos L A O, Dolder H (2005a) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). Insect Soc 52: 122-131.
- Zama U, Lino-Neto J, Brito P, Campos L A O, Dolder H, Báo S N (2005b) The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. J Submicrosc Cytol Pathol 37 (3-4): 91-99.
- Zama U, Bottura G, Lino-Neto J, Dolder H, Báo S N (2005c) The nucleus-flagellum transition in *Trypoxylon (Trypargilum)* subgenus, with emphasis on a singular centriolar adjunct (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae: Anthophoridae) Braz J Morphol Sci 22 (suppl.): 56.
- Zama U, Moreira J, Báo S N, Campos L A O, Dolder H, Lino-Neto J (2007) Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigma arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. Arthropod Struct Dev, 36: 304-316.

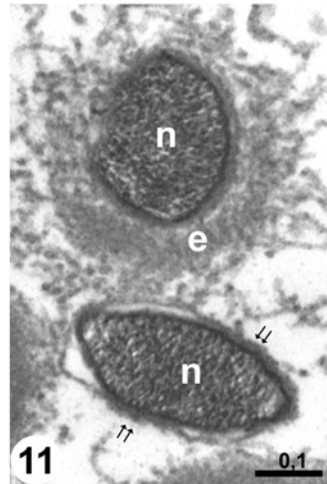
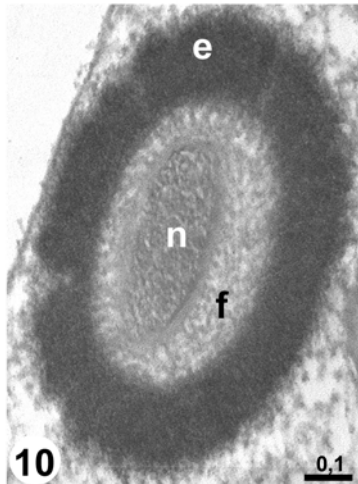
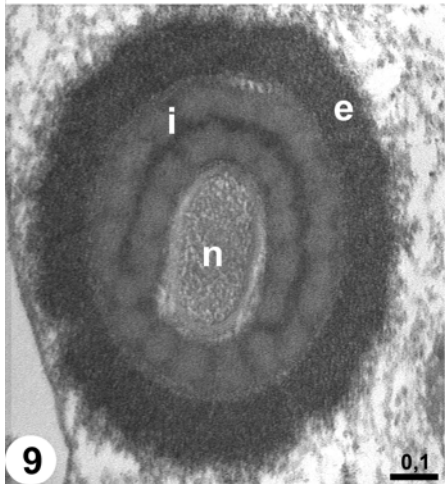
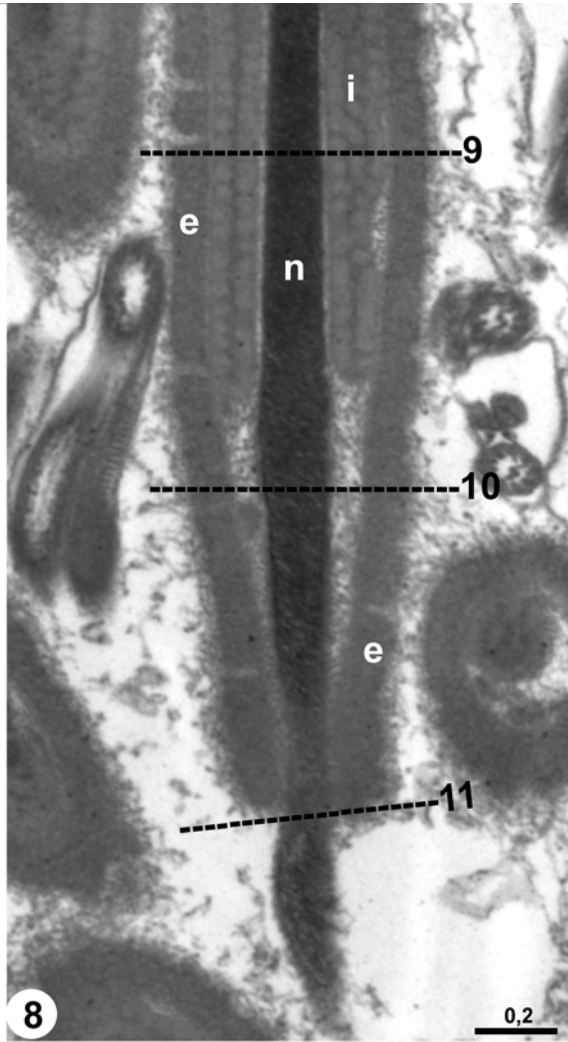
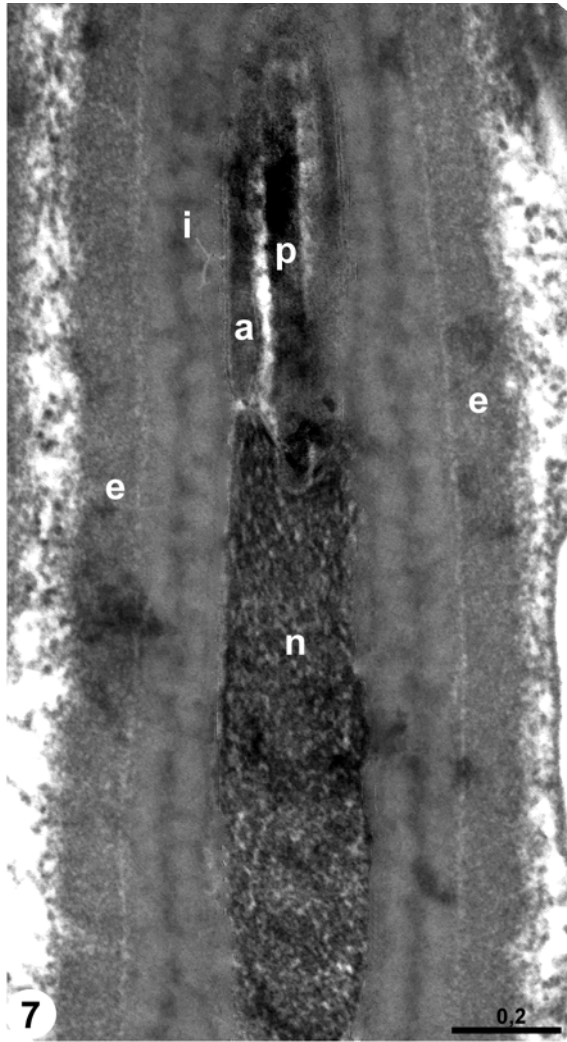


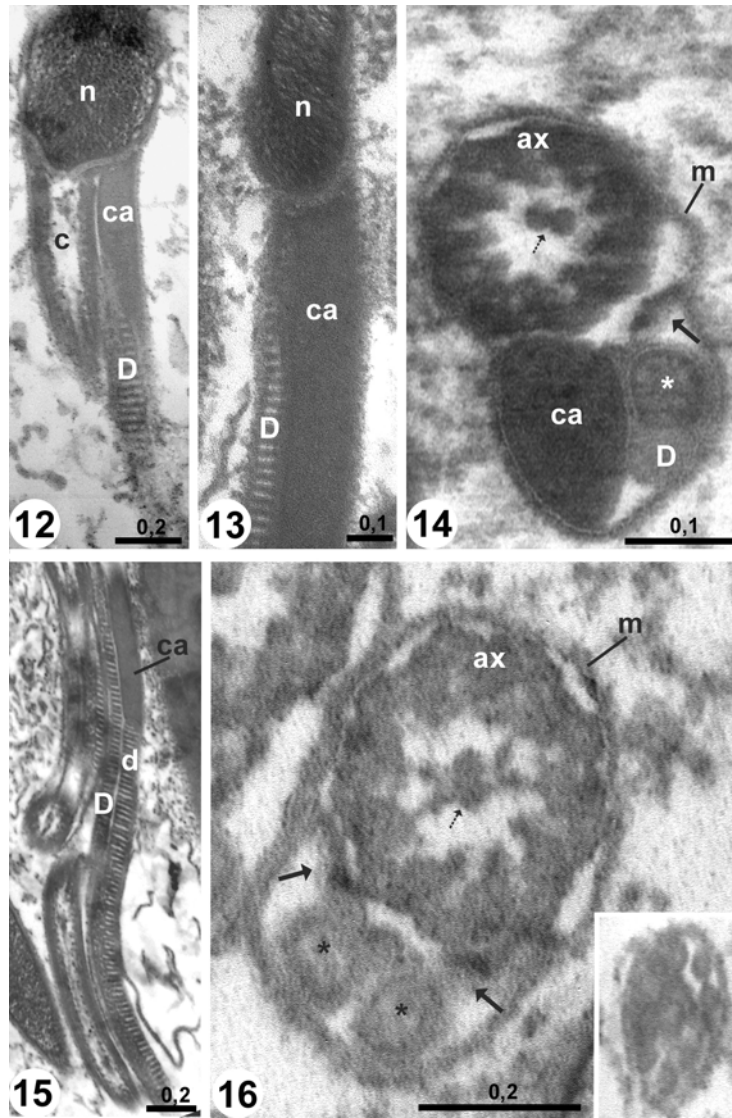
**Figs. 1-6:** **1, 2)** Longitudinal sections of the spermatozoon apex, showing an acrosomic vesicle (a), the perforatorium (p), the internal extracellular structure (i), the external coat (e), the fibrillar material (f) in the space between the two structures and some electron dense fibrillar aggregates (arrow); **3)** Cross-section of the spermatozoon apex with only the external coat (e) with external filaments (open arrows), internal loose fibrillar material and dense aggregates (arrows) of this fibrillar material; **4)** Cross section of the beginning of the inner layer of extracellular material, above the acrosome; **5-6)** Cross sections of the acrosome, circular at the apex (5) and oval further down (6). Observe the plasma membrane (m). Broken lines in (1) indicate the cross-section levels. All bars are in  $\mu\text{m}$ .

**Figs. 7-11:** **7)** Longitudinal section of the insertion region of the perforatorium (p) into the nucleus (n): observe the acrosomic vesicle (a), the external coat (e) and the internal extracellular structure (i); **8)** Longitudinal section of the basal portion of the nucleus, showing the region of disorganization of the extracellular structures. **9-11)** Cross sections of the nucleus at different levels, showing the gradual disorganization of the external structures. Notice the fibrillar material between the external coat and the nucleus (10, "f"), the disorganization of the external coat (11, "e") showing its fibrillar nature and the nucleus associated glycocalix (11, double arrows). Broken lines indicate the cross-section levels. All bars are in  $\mu\text{m}$ .

**Figs. 12-16:** **12-13)** Longitudinal sections of the transition zone of nucleus (n) and flagellum with the centriolar adjunct (ca), the larger mitochondrial derivative (D) and the centriolar region (c). **14)** Cross section of the initial portion of the flagellum. Notice the plasma membrane (m), the accessory body (arrow), the central pair of microtubules (small arrow) and the differentiated region of the mitochondrial derivative (\*). **15)** Longitudinal section of the transition region between the centriolar adjunct and the smaller mitochondrial derivative (d). **16)** Cross section of the flagellum. Notice the derivatives' reduction near the flagellum tip; (*inset*) nine accessory microtubules in the final portion of the flagellum. All bars are in  $\mu\text{m}$ .







#### 4 - Discussão

Considerando os resultados apresentados nos trabalhos acima, são necessárias algumas considerações em relação à ultra-estrutura dos espermatozóides em Hymenoptera e suas relações filogenéticas. Como as espécies estudadas nesse trabalho pertencem à subordem Apocrita, vamos centrar a discussão nesse grupo.

As vespas parasíticas do grupo Proctotrupomorpha que tiveram a morfologia dos seus espermatozóides descrita até o momento, pertencem a três superfamílias, Cynipoidea (Newman & Quicke, 1999b), Platygastroidea (Lino-Neto & Dolder, 2001b) e Chalcidoidea (Wilkes & Lee, 1965; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a), incluindo *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica* (artigo I dessa tese). Em todos esses trabalhos foram descritos espermatozóides com ao menos algumas estruturas espiraladas. As vespas parasíticas do grupo Evaniomorpha (Newman & Quicke, 2000) e da superfamília Icheumonoidea (Quicke, 1997) não apresentaram estruturas espiraladas nos seus espermatozóides. No grupo Aculeata, as únicas espécies estudadas até o momento que apresentam alguma estrutura espiralada pertencem ao gênero *Microstigmus* (Apoidea: Pemphredoninae) (Zama *et al.*, 2007).

No entanto, as estruturas espiraladas observadas nesses trabalhos são diferentes entre si. Em Chalcidoidea e Platygastroidea todas as organelas do espermatozóide seguem uma espiral. Em Cynipoidea, apenas o núcleo apresenta uma projeção lateral que segue em espiral ao longo do comprimento do núcleo. Em Pemphredoninae, apenas o ápice do núcleo possui dois prolongamentos que se enrolam em torno do acrossomo também espiralado.

Observamos então, que as estruturas espiraladas encontradas nos espermatozoides de Apocrita são bastante diversas e que essas características são observadas em grupos algumas vezes distantes uns dos outros. Dessa forma, acreditamos que a presença de estruturas espiraladas nos espermatozoides de Apocrita podem ter surgido mais de uma vez na história evolutiva do grupo.

Outra característica, que parece conter significado filogenético em Hymenoptera, é a presença de material extracelular associado ao ápice dos espermatozoides. Essa característica, descrita também em *M. hawaiiensis* e *M. australica* (artigo I dessa tese), tem sido amplamente relatada em vespas parasíticas pertencentes a Proctotrupomorpha (Newman & Quicke, 1999b; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a) exceto nas espécies da superfamília Platygastroidea (Lino-Neto & Dolder, 2001b). Na superfamília Ichneumonoidea, considerada grupo irmão de Aculeata, os espermatozoides também são observados associados a uma estrutura extracelular de organização complexa (Quicke, 1997). No grupo Aculeata até o momento, a única espécie em que os espermatozoides são associados a estruturas extracelulares, é *Neochrysis lecointei* (Chrysididae) (artigo II dessa tese). No entanto, nenhuma estrutura extracelular foi observada em *Prorops nasuta* (Oliveira, 2007), que pertence à família Bethyidae, considerada grupo irmão de Chrysididae.

Assim, acreditamos que a presença de material extracelular associado ao ápice dos espermatozoides é uma característica comum aos Proctotrupomorpha, mas que foi perdida pelos representantes da superfamília Platygastroidea. Porém, como os espermatozoides em Platygastroidea diferem em outros aspectos do observado nas demais vespas parasíticas, é possível que os espermatozoides

dessa superfamília tenham passado por um longo processo de diferenciação, que resultou inclusive na perda do material extracelular associado ao ápice.

Como a presença de material extracelular não é uma característica presente em nenhum outro grupo de Aculeata ou em Evaniomorpha (vespa parasíticas), acreditamos que essa característica surgiu independentemente em Ichneumonoidea e Chrysididae. No entanto, é preciso que mais espécies, principalmente de Evaniomorpha, Ichneumonoidea e Chrysididae sejam estudadas para que essas suposições sejam confirmadas. Outro aspecto que merece mais estudos é a origem de tais estruturas durante a espermatogênese. A determinação do momento em que essas estruturas são formadas e quais as células responsáveis pela sua síntese pode ajudar a esclarecer se essas estruturas possuem uma origem filogenética comum.

A ordem em que os elementos do axonema se desorganizam no final do flagelo, também parece conter significado filogenético. Em todas as espécies da superfamília Chalcidoidea estudadas até o momento (Lino-Neto & Dolder, 2001a; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a), inclusive em *M. hawaiiensis* e *M. australica* (artigo I dessa tese), os microtúbulos acessórios são os primeiros a se desorganizarem. Ao contrário do observado nas espécies de Aculeata (Wheeler *et al.*, 1990; Zama *et al.*, 2004, 2005a, b; Fiorillo *et al.*, 2005; Oliveira, 2007), inclusive *N. lecointei* (artigo II dessa tese), em que os microtúbulos acessórios são os últimos elementos do flagelo a se desorganizarem.

Porém, mais estudos são necessários para se saber, se a característica observada em Chalcidoidea é exclusiva desta superfamília ou se é compartilhada por outras vespas parasíticas, já que os trabalhos com outras superfamílias não

mencionam essa informação. Entretanto, no grupo Aculeata os registros são suficientemente abrangentes para se concluir que os microtúbulos acessórios se desorganizando por último é uma característica amplamente compartilhada no grupo.

As características tratadas até o momento (espermatozóides espiralados, material extracelular nos espermatozóides e ordem de desorganização do axonema) parecem fornecer informações filogenéticas importantes para a comparação entre os grandes grupos de Apocrita, por exemplo, entre as superfamílias. Porém, outras características dos espermatozóides são menos constantes e podem fornecer informações importantes sobre a relação entre as famílias da subordem Apocrita.

O primeiro exemplo de estrutura, que apresenta grande variedade morfológica entre famílias de Apocrita relativamente próximas, é o adjunto do centríolo. Nos espermatozóides de *N. lecointei* (Chysididae) (artigo II dessa tese) o adjunto do centríolo é observado abaixo do núcleo, sem haver sobreposição dessas estruturas. No entanto, em *P. nasuta* (Oliveira, 2007), que pertence à família Bethyidae (considerada grupo irmão de Chysididae), o adjunto do centríolo possui uma projeção lateral ao núcleo. Na superfamília Chalcidoidea, as famílias Trichogrammatidae (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a) e Eulophidae (descrito para *M. hawaiiensis* e *M. australica* nesse trabalho), possuem o adjunto do centríolo semelhante, localizado na lateral do núcleo e envolvendo parte do centríolo. No entanto, em *Bephratelloides pomorum* (Lino-Neto *et al.*, 1999), que pertence à família Eurytomidae, o adjunto do centríolo segue uma espiral envolvendo a base do núcleo. Diferenças na morfologia do adjunto do



centríolo também são observadas entre famílias de Vespoidea. Nos espermatozoides dos indivíduos da família Formicidae (Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002; Moya *et al.*, 2007) o adjunto do centríolo situa-se anterior aos dois derivados mitocondriais. Nos espermatozoides de Vespidae (Mancini *et al.*, 2006), ele é observado acima do derivado mitocondrial menor, paralelo ao derivado maior.

Contudo, outros grupos parecem apresentar a morfologia do adjunto do centríolo constante entre as espécies de diferentes famílias. Um exemplo é a superfamília Apoidea, em que todas as espécies das famílias Apidae, Halictidae e Sphecidae *s. stricto*, estudadas até o momento possuem a mesma morfologia do adjunto do centríolo (Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005b; Báó *et al.*, 2004; Fiorillo *et al.*, 2005).

Outra característica que parece variar muito, mesmo entre grupos relativamente próximos, é a morfologia dos derivados mitocondriais. Por exemplo, nos espermatozoides de *M. hawaiiensis* e *M. australica* (artigo I dessa tese), os derivados mitocondriais quando analisados em seções transversais possuem áreas diferentes, sendo que no derivado com maior diâmetro foram observadas regiões diferenciadas. Nos espermatozoides de *Dahlbominus fuscipennis* (Wilkes & Lee, 1965), que pertence à mesma família que *Melittobia* (Eulophidae), os derivados são idênticos em seções transversais e nenhuma região diferenciada foi observada. Outro exemplo de diversidade morfológica dos derivados mitocondriais é quando comparamos os espermatozoides de *P. nasuta* (Bethylidae) (Oliveira, 2007), com o descrito para *N. lecointei* (Chrysididae) (artigo II dessa tese). Em *P. nasuta* foi observado material paracristalino organizado no interior dos dois

derivados e o derivado mitocondrial mais longo foi observado associado lateralmente à porção basal do núcleo. Já em *N. lecointei*, o derivado mitocondrial maior é observado apenas abaixo do núcleo e contendo uma região diferenciada onde não foi identificado material com arranjo paracristalino.

Gostaríamos então de reforçar o conceito de que a diversidade morfológica observada nos espermatozóides em Hymenoptera é capaz de fornecer uma base de dados úteis em estudos filogenéticos. Acreditamos que esses dados associados a dados morfológicos tradicionais e aos de estudos moleculares podem ajudar a responder algumas das questões ainda não esclarecidas na filogenia dos Hymenoptera. Entretanto, para que os dados provenientes da morfologia dos espermatozóides possam ser corretamente interpretados em estudos filogenéticos, é preciso que representantes de famílias ainda não estudadas tenham a morfologia dos seus espermatozóides descrita, aumentando a abrangência desses estudos.

## 5 - Conclusões

A morfologia dos espermatozóides de Hymenoptera se mostra capaz de fornecer dados úteis para análises filogenéticas. Algumas características como: a) presença de estruturas espiraladas nos espermatozóides, b) presença de material extracelular associado à cabeça dos espermatozóides e c) a ordem em que os microtúbulos do flagelo se desorganizam no final do flagelo, parecem capazes de fornecer informações sobre as relações entre os grandes grupos de Hymenoptera.

Por outro lado, características tais como: a) morfologia do adjunto do centríolo e b) a morfologia dos derivados mitocondriais, poderão fornecer informações úteis na comparação entre taxa inferiores em Hymenoptera. 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.

## 6 - Referências

- Baccetti, B. 1970. Comparative Spermatology. Accademia Nazionale dei Lincei, pp. 573.
- Báo, S. N., Simões, D. G. & Lino-Neto, J. 2004. Sperm ultrastructure of the bees *Exomalopsis (Exomalopsis) auropilosa* Spinola 1853 and *Paratetrapedia (Lophopedia)* sp. Michener & Moure 1957 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology, 36: 23-28.
- 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.
- Brothers, D. J. 1975. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. University of Kansas Science Bulletin, 50: 1-38.
- Brothers, D. J. & Carpenter, R. M. 1993. Phylogeny of Aculeata: Chryridoidea and Vespoidea (Hymenoptera). Journal of Hymenoptera Research, 2: 227-304.
- Brothers, D. J. 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chryridoidea, Vespoidea, Apoidea). Zoologica Scripta, 28: 233-249.
- Carpenter, J. M. 1986. Cladistics of the Chryridoidea (Hymenoptera). Journal of the New York Entomological Society, 94: 303-330.
- Chauvin, G., El Agoze, M., Hanson, C. & Huignard, J. 1988. Ultrastructure des spermatozoïdes des males haploïdes et diploïdes de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera: Ichneumonidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology, 17: 359-366.
- Dahms, E. 1984. A review of the biology of species in the genus *Melittobia* (Hymenoptera: Eulophidae) with interpretations and additions using observations on *Melittobia australica*. Memoirs of the Queensland Museum, 21: 337-360
- 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., Coelho, A. A. M., Lino-Neto, J. & Báo, S. N. 2005. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology, 37: 75-81.
- Gaston, K. J. 1991. The magnitude of global insect species richness. Conservation Biology, 5: 283-296.
- 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.

Gauthier, N., LaSalle, J., Quicke, D. L. J. & Godfray, H. C. J. 2000. Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids. *Systematic Entomology*, 25: 521-539.

Gibson, G., Heraty, J. M. & Woolley, J. B. 1999. Phylogenetics and classification of Chalcidoidea and Mymarommatoidea – a review of current concepts (Hymenoptera, Apocrita). *Zoologica Scripta*, 28: 87-124.

Gibson, G. 1999. Sister group relationships of the Platygastroidea and Chalcidoidea (Hymenoptera) an alternate hypothesis to Rasnitsyn (1988). *Zoologica Scripta*, 28: 125- 138.

Godfray, H. C. J. 1994. *Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.

González, J. M., Genaro, J. A. & Matthews, R. W. 2004. Species of *Melittobia* (Hymenoptera: Eulophidae) established in Bahamas, Costa Rica, Cuba, Hispaniolo, Puerto Rico and Trinidad. *Florida Entomologist*, 87: 619-620.

Goulet, H. & Hubner, J. T. 1993. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Agriculture Canada Publications, pp. 668.

Grissel, E. E. & Schauff, M. E. 1990. A handbook of the families of nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). The Entomological Society of Washington, pp. 85.

Hanson, P. E. 1995. Economic importance of Hymenoptera. Em: The Hymenoptera of Costa Rica. Eds. Hanson, P. E. & Gauld, I. D. Oxford University Press, 89-101.

Hanson, P. E. & Gauld, I. D. 1995. *The Hymenoptera of Costa Rica*. Oxford University Press, pp. 893.

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., West-Eberhard, M. J. & Gauld, I. D. 1995. The biology of Hymenoptera: Interspecific interactions of nesting Hymenoptera. Em: The Hymenoptera of Costa Rica. Eds. Hanson, P. E. & Gauld, I. D. Oxford University Press, 76-88.

Jamieson, B. G. M. 1987. *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. Cambridge University Press, pp. 320.

Jamieson, B. G. M., Ausió, J. & Justine, J. 1995. Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, pp. 564.

Jamieson, B. G. M., Dallai, R. & Afzelius, B. 1999. *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, pp. 555.

Kimsey, L. S. & Bohart, R. M. 1980. A synopsis of the chrysidid genera of Neotropical America (Chryridoidea, Hymenoptera). *Psyche*, 87: 75-92.

Kimsey, L. S. & Bohart, R. M. 1991. The chrysidid wasps of the world. Oxford University Press.

Königsmann, E. 1978. Das phylogenetische system der Hymenoptera. Teil 4: Aculeata (Unterordnung Apocrita). *Drutsche Entomologische Zeitschrift*, 25: 365-435.

LaSalle, J. & Schauff, M. E. 1995. The chalcidoid families: Eulophidae. Em: The Hymenoptera of Costa Rica. Eds. Hanson, P. E. & Gauld, I. D. Oxford University Press, 315-329.

Levin, M. D. 1983. Value of bee pollination to U.S. agriculture. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 29 (4): 50-51.

Lino-Neto, J. & Dolder, H. 2001a. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 82: 159-164.

Lino-Neto, J. & Dolder, H. 2001b. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*, 30: 89-96.

Lino-Neto, J. & Dolder, H. 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell*, 34: 124-128.

Lino-Neto, J., Báo, S. N. & Dolder, H. 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 28: 253-259.

Lino-Neto, J., Báo, S. N. & Dolder, H. 2000a. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 81: 205-211.

Lino-Neto, J., Báo, S. N. & Dolder, H. 2000b. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue & Cell*, 32: 322-327.

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.

Matthews, R. W, 1997. Teaching ecological interactions with mud dauber nests. *American Biology Teacher.*, 59: 152-158.

Matthews, R. W. 2000. Developing life science instructional materials using a parasitic wasp, *Melittobia digitata* Dahms (Hymenoptera: Eulophidae): A case study. Em: Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control. Eds. Austin, A. D. & Dolton, M. CSIRO Publishing, 427-433.

Moya, J., Mancini, K., Lino-Neto, J., Delabie, J. & Dolder, H. 2007. Sperm ultrastructure of five species of the neotropical ant genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 88: 181-187.

Naumann, I. D. 1991. Hymenoptera (Wasps, Bees, Ants, Sawflies). Em: *The Insects of Australia*, Volume II, Melbourne University Press, pp. 1137.

Neff, J. L. & Simpson, B. B. 1993. Bees, pollination systems and plant diversity. Em: *Hymenoptera Biodiversity*. Eds. LaSalle, J. & Gauld, I. D. Wallingford, pp. 143-167.

Newman, T. M. & Quicke, D. L. J. 1999a. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 33-47.

Newman, T. M. & Quicke, D. L. J. 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucolidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 8: 197-203.

Newman, T. M. & Quicke, D. L. J. 2000. Sperm development and ultrastructure of mature spermatozoa of *Megalyra* (Hymenoptera: Megaliroidea). *Journal of Hymenoptera Research*, 9: 62-70.

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. 1998. *Catalogue of the Chalcidoidea of the World*. Electronic Publication (CD-Rom). Expert Center for Taxonomic Information, Amsterdam.

Oeser, R. 1961. Vergleichend- morphologische Untersuchungen über den Ovipositor der Hymenoptera. *Mitteilungen aus den Zoologische Museum in Berlin*, 37: 3-119.

Oliveira, C. M. 2007. Estrutura e ultra estrutura dos espermatozóides de *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bethyridae). Universidade Federal de Viçosa (Tese de Mestrado).

Peng, C. Y., Yin, C. & Yin L. R. S. 1993. Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiological Entomology*, 18: 93-101.

Quicke, D. L. J. 1997. *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall, pp. 470.

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. 1980. Origin and evolution of hymenopterous insects. *Trudy Paleontologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR*, 174: 1-191.

Rasnitsyn, A. P. 1988. An outline of evolution of the hymenopterous insects. *Oriental Insects*, 22: 115-145.

Ronquist, F., Rasnitsyn, A. P., Roy, A., Eriksson, K. & Lindgren, M. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. *Zoologica Scripta*, 28: 13-50.

Ronquist, F. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): The state of the art. *Zoologica Scripta*, 28: 3-11.

Schmieder, R. G. & Whiting, P. W. 1947. Reproductive economy in the chalcidoid wasp *Melittobia*. *Genetics*, 32: 29-37.

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.

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 of Genetics and Cytology*, 7: 609-619.

Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Frise (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). *Journal of Hymenoptera Research*, 10: 261-270.

Zama, U., Lino-Neto, J. & Dolder, H. 2004. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). *Tissue & Cell*, 36: 29-41.

Zama, U., Lino-Neto, J., Mello, S. M., Campos, L. A. O. & Dolder, H. 2005a. Ultrastructure characterization of spermatozoa in euglossine bees (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Insectes Sociaux*, 52: 122-131.

Zama, U., Brito, P., Lino-Neto, J., Campos, L. A. O., Dolder, H. & Báo, S. N. 2005b. Sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indication of bees relation. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology*, 37: 313-321.

Zama, U., Moreira, J., Báo, S. N., Campos, L. A. O., Dolder, H. & Lino-Neto, J. 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigma arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophtalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure & Development*, 36: 304-316.