



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

Juliana Souza da Silva

**Caracterização ultraestrutural dos espermatozóides
de três espécies do gênero *Idarnes*
(Chalcidoidea, Hymenoptera)**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Biologia Animal da Universidade
de Brasília como parte dos
requisitos necessários para a
obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal**

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília
2010

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

À Profa. Dra. Sônia Nair Bão pela orientação e paciência dedicada;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira pela co-orientação, discussão do projeto e orientação em relação às vespas Idarnes;

Aos membros da Banca de Qualificação: Drs. José Roberto Pujol-Luz e Uyrá Zama pela disponibilidade, análise e sugestões;

Ao Prof. Dr. José Lino-Neto pela paciência e ensinamentos das técnicas de dissecação do aparelho reprodutor de Idarnes e pelas sugestões;

Aos alunos e estagiários do Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira, em especial à Michele Medeiros, pela recepção no laboratório, ajuda e dedicação na coleta dos figos e pela amizade;

Ao Prof. Dr. José Roberto Pujol-Luz e sua esposa, Cristiane Pujol-Luz, pela oportunidade de estágio concedida, oportunidade esta que me introduziu no “mundo” das pesquisas científicas, serei eternamente grata;

À amiga Khesller Patrícia Olázia Name pela amizade, dedicação, ajuda em todos os momentos que precisei, pela cumplicidade e pela grande contribuição nesta etapa de minha vida;

À Renata (Revet) pela amizade, paciência, ajuda na utilização do microscópio confocal e pelas correções em algumas etapas do trabalho;

Aos colegas de laboratório: Marcela, Suzi, Débora, Paula, Fabiano, João Victor, Ingrid, Mayara, Misléia, Raphael, Ricardo, Amanda, Lauro e Lorraine pela amizade e principalmente pela paciência nos momentos em que ela me faltou;

Ao professor José Raimundo pela ajuda e sugestões;

Ao Bruno Fiorillo pela atenção dedicada;

À minha família pelo apoio e por acreditarem em mim;

À Universidade de Brasília, em especial ao PPG de Biologia Animal e à USP pelo local de coleta;

Às agências financiadoras: CNPq, CAPES, FINATEC e FINEP.

Sumário

Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução	1
A classificação do gênero <i>Idarnes</i>	7
A utilização dos espermatozoides como ferramenta em trabalhos de sistemática	8
Morfologia geral dos espermatozoides de Hymenoptera	8
Características dos espermatozoides de Chalcidoidea	9
2. Objetivos	12
3. Materiais e Métodos	14
4. Resultados	17
Região da cabeça	18
Região de transição núcleo-flagelo	20
Região flagelar	25
5. Discussão	31
Região da cabeça	32
Região de transição núcleo-flagelo	33
Região flagelar	34
6. Conclusões	37
7. Referências Bibliográficas	40

Resumo

O gênero *Idarnes* compreende vespas de figo não-polinizadoras associadas com plantas do gênero *Ficus*, seção *Americana*. São conhecidas como parasitas do mutualismo, uma vez que exploram o mutualismo estabelecido entre a figueira e sua vespa polinizadora, causando um efeito negativo na produção das polinizadoras e, conseqüentemente, afetando a capacidade de dispersão do pólen. Neste trabalho, foram estudadas três espécies de *Idarnes* com machos ápteros encontrados no interior de figos de *Ficus citrifolia*. Estes machos são completamente diferentes de suas fêmeas co-específicas, aladas. Devido ao acentuado dimorfismo sexual, vespas deste gênero foram inicialmente descritos em gêneros diferentes. E, até o momento não estão classificados em família. Pesquisas têm demonstrado que a ultraestrutura dos espermatozoides em Hymenoptera apresentam variações suficientes para fornecer caracteres adicionais para estudos filogenéticos. Isto porque os caracteres destas células apresentam uma natureza mais conservativa do que aqueles morfológicos tradicionalmente utilizados. Sendo assim, neste trabalho descrevemos a ultraestrutura dos espermatozoides de vespas *Idarnes*. Para tanto, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão. Os espermatozoides das três espécies descritas neste trabalho são morfológicamente semelhantes aos outros Chalcidoidea, com núcleo e flagelo helicoidalmente retorcidos. A região da cabeça é formada pelo acrossoma e o núcleo; e a região flagelar composta pelo axonema com arranjo microtubular 9+9+2, o adjunto do centríolo e dois derivados mitocondriais. No entanto, algumas diferenças foram observadas: (1) somente uma das espécies de *Idarnes* apresentou o revestimento extracelular circundando a porção anterior do flagelo, que por sua vez, se estende até a região anterior do flagelo, mas não apresentou filamentos irradiando-se dele; (2) o acrossoma das três espécies é diferente; (3) o adjunto do centríolo e (4) os derivados mitocondriais são diferentes dos outros Chalcidoidea já descritos. Estes dados mostram que a estrutura espermática pode diferir dentro de um mesmo gênero, e confirmam o potencial destas células em análises filogenéticas da superfamília Chalcidoidea e dos Hymenoptera em geral.

Palavras-chave: Chalcidoidea, Vespas de figo, Espermatozoide de inseto, Ultraestrutura espermática.

Abstract

Idarnes is a nonpollinating fig wasp genus associated with *Ficus*, section *Americana*. These wasps are known as mutualism parasites because they exploit the mutualism established between the fig and their pollinator, causing a negative effect on pollinator wasp production, therefore affecting the fig's ability to disperse pollen. We studied three species of *Idarnes* with wingless males found in figs of *Ficus citrifolia*. These males are completely unlike their co-specific females, which are winged. Due to the accentuated sexual dimorphism, males and females were initially described in different genera. Up to date their family is unknown. Numerous investigations have demonstrated that ultrastructure of the spermatozoa in Hymenoptera provides sufficient variations of characters for phylogenetic studies. This occurs because the characters of those cells are better preserved than the morphologic ones traditionally used. The aim of this study was to describe the sperm ultrastructure of three species of the *Idarnes* genus. The samples were processed for transmission electron microscopy and then characterized. Spermatozoa morphology of the three species described in this study was similar to that of most Chalcidoidea, with nucleus and flagellum helicoidally twisted. The head area consisted of an acrosome and a nucleus, and a flagellum area, which includes the axoneme with microtubular arrangement 9+9+2, centriolar adjunct and two mitochondrial derivatives. However, some differences were noted: (1) only one *Idarnes* species exhibited an extracellular sheath surrounding the anterior portion of the nucleus, which extends to the anterior region of the flagellum, but it did not present filaments; (2) the acrosome in the three species was quite different; (3) the centriolar adjunct and (4) mitochondrial derivatives were unlike other Chalcidoidea described so far. These data showed that sperm structure may differ within the same genus and confirms the potential of these cells in phylogenetic and taxonomic analyses in the Chalcidoidea superfamily, as well as in Hymenoptera in general.

Keywords: Chalcidoidea, fig wasps, Insect Spermatozoa, Ultrastructure sperm.

1. Introdução

O gênero *Ficus* apresenta uma distribuição pantropical e é considerado o maior gênero da família Moraceae, com cerca de 750 espécies descritas (Berg, 1989). Destas, 140 espécies, aproximadamente, encontram-se nas Américas (Berg, 1989) e 66 espécies nativas são conhecidas no Brasil, oito pertencentes ao subgênero *Pharmacosycea* e 58 ao subgênero *Urostigma* (Carauta & Diaz, 2002). Este gênero é caracterizado por uma inflorescência globosa, fechada, conhecida por sicônio ou figo (Fig. 1), no interior da qual estão inseridas as flores; a única comunicação entre os lados internos e externos é através do ostíolo (Verkerke, 1989). As figueiras nativas brasileiras são todas monóicas, contendo flores masculinas e femininas no mesmo figo.



Fig. 1 Figos de *Ficus citrifolia*

Ficus citrifolia Miller é uma espécie monóica e pode crescer como uma árvore de porte mediano a grande ou como hemiepífita (Fig. 2), iniciando seu crescimento sobre os troncos de outras árvores, que servem de suporte para o seu crescimento.



Fig. 2 *Ficus citrifolia* (hemiepífita)

No Brasil é distribuída em toda a região sul, bem como em parte das regiões Sudeste e Centro-Oeste (Carauta & Diaz, 2002) e a polinização de *F. citrifolia*, nestas regiões, é realizada por uma espécie não descrita do gênero *Pegoscapus* (Hymenoptera: Agaonidae). Além da espécie polinizadora, Pereira *et al.* (2000) encontraram outras 14 espécies de vespas chalcidoídes não polinizadoras associadas a ela. Destas vespas, *Idarnes* foi o gênero mais representativo, com cinco espécies registradas: sendo três espécies do grupo *carne*, uma do grupo *flavicollis* e uma do grupo *incerta*.

Idarnes é o gênero de vespas de figo mais diverso e abundante da fauna Neotropical (Gordh, 1975). Segundo Hanson & Ramirez (1995) existem cerca de 30 espécies na Costa Rica. No Brasil, acredita-se que sejam distribuídas em todo o país, mas as regiões de maior concentração de estudos são a Sul e Sudeste (Pereira *et al.*, 2000; Schiffler, 2002).

Assim como as polinizadoras, vespas *Idarnes* apresentam certa especificidade de hospedeiro, desenvolvendo-se exclusivamente em plantas da seção *Americana* de *Ficus* (Bouček, 1993).

As espécies de *Idarnes* encontradas em *F. citrifolia* pertencem a três grupos taxonômicos (*carne*, *flavicollis* e *incerta*) (Bouček, 1993). A identificação é baseada, principalmente, nas características morfológicas das fêmeas, uma vez que os machos de espécies diferentes apresentam diferenças morfológicas sutis, podendo ser diferenciados por suturas longitudinais presente nas cápsulas cefálicas (Figs. 3 A-C) (Pereira *et al.*, 2008). As vespas do grupo *incerta* apresentam machos e fêmeas alados, enquanto nos grupos *carne* e *flavicollis* as fêmeas são aladas, de vida livre, e os machos ápteros (Figs. 4 A-B) com atividade restrita ao interior do sicônio (Bouček, 1993).



Figura 3. Diferenças nas cápsulas cefálicas de machos de *Idarnes*. (A e B) grupo *carne* sp. 1 e sp. 2, respectivamente (C) grupo *flavicollis* sp. 3. Seta preta: suturas longitudinais. (Fotos: R. A.S, Pereira)

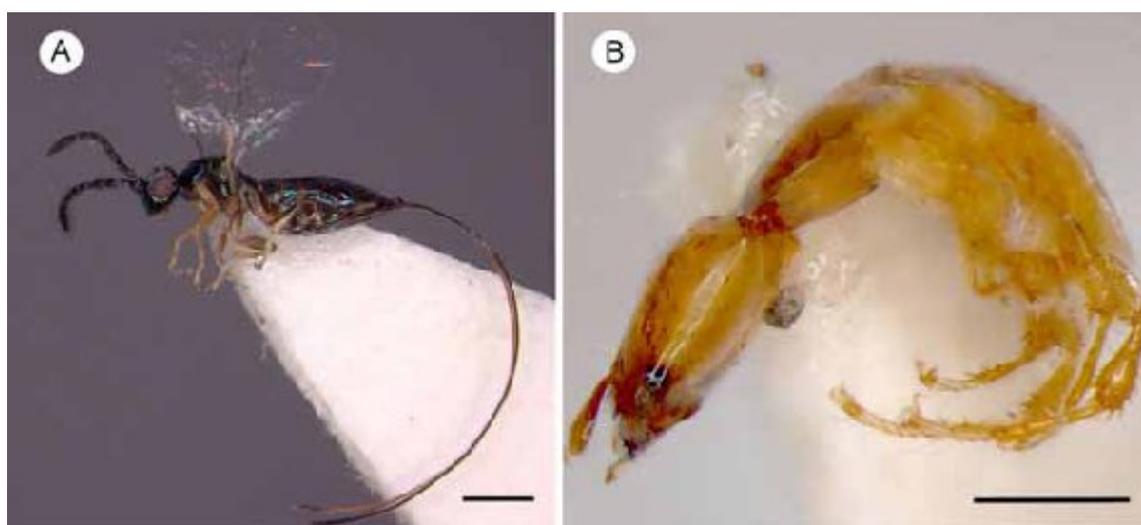


Figura 4. Dimorfismo sexual entre vespas *Idarnes* (grupo *carne*). (A) Fêmea (B) Macho. Escalas: A e B 0,3 mm. (Fonte: Elias, 2008)

Figueiras e suas vespas polinizadoras estabelecem um mutualismo obrigatório, isto porque são completamente dependentes uma da outra para sobrevivência e reprodução. A polinização das figueiras é mediada exclusivamente pelas vespas Agaonidae, que, por sua vez utilizam os ovários de algumas flores para depositar seus ovos e desenvolver sua prole (Weiblen, 2002). Além da espécie polinizadora, uma única espécie de figueira pode abrigar cerca de 30 espécies de diferentes linhagens de vespas não-polinizadoras (Cook & Rasplus, 2003). Essas espécies são denominadas não-polinizadoras porque exploram o mutualismo sem oferecer os benefícios da polinização, sendo conhecidas como parasitas do mutualismo (Yu, 2001).

As vespas não-polinizadoras podem ser galhadoras, inquilinas ou parasitóides (Kerdulhué & Rasplus, 1996). As galhadoras fitófagas são capazes de induzir galhas nas flores pistiladas, que servirão de alimento para a larva; e por consequência, competem com as polinizadoras por sítio de oviposição. As inquilinas, também fitófagas, não são capazes de induzir galhas e, por isso, obtém alimento do tecido vegetal da galha induzida por outras espécies. As parasitóides se desenvolvem alimentando-se das larvas das vespas fitófagas (Abdurahiman & Joseph, 1978; Kerdulhué & Rasplus, 1996).

Embora a biologia larval da maioria das vespas não-polinizadoras seja pobremente documentada (West *et al.*, 1996; Kjellberg *et al.*, 2005), trabalhos recentes têm reportado que ela pode variar dentro de um gênero (Pereira *et al.*, 2007; Elias *et al.*, 2008) e que o efeito negativo que causam sobre o mutualismo varia de acordo com sua biologia (Bronstein, 1992). Elias *et al.* (2008) demonstraram que as vespas dos três grupos de *Idarnes* apresentam biologias larvais diferentes e que colonizam o figo em fases distintas do desenvolvimento do figo. Segundo os autores, as vespas dos grupos *flavicollis* e *incerta* colonizam o figo durante sua fase receptiva, sustentando a hipótese de que sejam galhadoras, impactando negativamente na produção de vespas polinizadoras e, conseqüentemente, na capacidade de dispersão do pólen (West *et al.*, 1996). A colonização das vespas do grupo *carne* dá-se mais tardiamente, quando já não há mais espaço para indução de novas galhas, indicando, que sejam inquilinas das polinizadoras, matando-as por inanição.

O modo de oviposição é diferenciado nas vespas polinizadoras e não-polinizadoras. Enquanto as polinizadoras adentram o sicônio, por meio do ostíolo, para depositar os ovos e realizar a polinização; as vespas *Idarnes* ovipositam inserindo seu longo ovipositor através da parede do sicônio até alcançarem o ovário das flores (Figs. 5 A-D), e por esta razão não são capazes de efetuarem a polinização. Os machos emergem antes das fêmeas e competem localmente entre si por acasalamentos (Hamilton, 1979; Pereira & Prado, 2005).

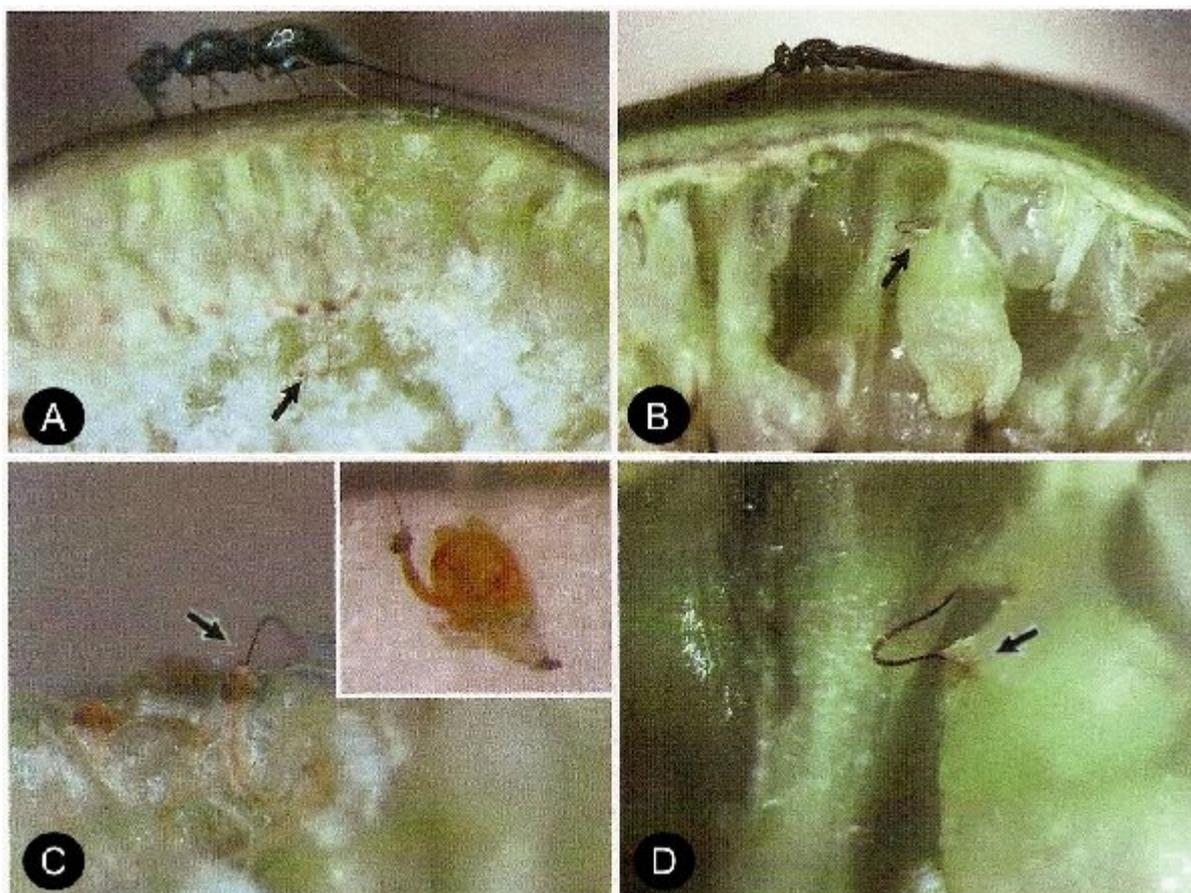


Figura 5. Modos de oviposição de espécies de *Idarnes*. (A) Oviposição de fêmea *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). (B) Oviposição de fêmea sp. 1 (grupo *carne*). (C e D) Aumento das figuras A e B, respectivamente. *Inset* da figura C corresponde ao local de inserção do ovipositor de *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). Seta preta: ovipositor inserido na parede da galha. (Fonte: Elias, 2005)

A classificação do gênero *Idarnes* Walker, 1843 (Sycophaginae)

Desde que foi descrito por Francis Walker no ano de 1843, a classificação do gênero *Idarnes* tem passado por inúmeras modificações. Essas modificações não se limitaram apenas ao gênero, mas estenderam-se no seu posicionamento dentro das famílias Torymidae e Agaonidae.

Dentre os motivos para tal inconstância em sua classificação estão: (1) a escassez de estudos a respeito do grupo, (2) o elevado dimorfismo sexual e o (3) tamanho diminuto das vespas. O grupo *carne* apresenta fêmeas com tamanho corpóreo com cerca de 1,5 mm e machos com 0,8 mm, enquanto que em *flavicollis* as fêmeas possuem cerca 2,3 mm e os machos com 1,9 mm (Gordh, 1975).

O estudo de Gordh (1975) é a única revisão publicada do gênero, incluindo considerações ecológicas e uma chave de identificação para o gênero. Embora existissem alguns trabalhos anteriores, citados por Gordh (e.g. Wolcott, 1951; Butcher, 1964) sobre a espécie tipo *Idarnes carne*, nenhum deles tinham caracterizado o gênero devidamente. Segundo o autor, a falta de observações detalhadas fez com que Mayr (1885) descrevesse machos e fêmeas da mesma espécie em gêneros diferentes, devido ao acentuado dimorfismo sexual. Os gêneros estabelecidos por Mayr foram: *Tetragonaspis* para as fêmeas, e *Ganosoma* para os machos. No ano seguinte, Müller (1886) notou que ambas pertenciam à mesma espécie e corrigiu o erro. No entanto, a transferência para o gênero *Idarnes* ocorreu apenas no ano de 1904, por Ashmead (apud Bouček, 1993).

Quanto à classificação em família, a subfamília Sycophaginae, a qual *Idarnes* pertence, foi inicialmente colocada por Ashmead (1899) (apud Bouček, 1988) em Torymidae. Este se baseou, principalmente, no longo ovipositor apresentado pelas vespas, que eram semelhantes aos das vespas pertencentes à referida família. Mas, no ano de 1988, esta classificação foi modificada por Bouček, que agrupou todas as vespas não-polinizadoras que dependiam dos tecidos do sicônio não só para alimentação, mas para completar seu ciclo de vida, na família Agaonidae. Desta forma, esta última deixou de ser restrita às polinizadoras e passou a incluir seis subfamílias; a das polinizadoras (Agaoninae) e outras cinco de não-polinizadoras (Epichrysomallinae, Otitesellinae, Sycoriclinae, Sycoecinae, e Sycophaginae).

Posteriormente, ferramentas moleculares (Rasplus *et al.*, 1998) mostraram que a família Agaonidae não era monofilética, e uma nova classificação foi proposta. A família foi novamente restringida às vespas polinizadoras e as subfamílias das não-polinizadoras redistribuídas em outras famílias de Chalcidoidea. No entanto, Sycophaginae não pôde ser reclassificada e, atualmente é considerada *incerta sedis*, necessitando, portanto, de mais estudos que possam ajudar a esclarecer sua posição taxonômica.

A utilização de espermatozoides como ferramenta em trabalhos de sistemática

Acredita-se que a maioria das dúvidas a respeito da filogenia dos Hymenoptera possa ser resolvida com análises de dados morfológicos externos juntamente com dados moleculares e morfológicos cujas características sejam menos susceptíveis às condições ambientais, como por exemplo, os espermatozoides.

Estas células são consideradas conservativas, (1) por não sofrerem pressão direta de mudanças ambientais, (2) por ser um caráter único de identidade para a espécie que o produz, uma vez que tanto o material genético quanto sua morfologia é espécie-específico e (3) por sua evolução acompanhar a evolução da espécie. Assim, com análises cuidadosas, podem fornecer informações importantes para uma melhor interpretação de relações filogenéticas entre táxons (Dallai *et al.*, 2008) e elucidar problemas de classificação. Desta forma, espermatozoides estão sendo cada vez mais explorados em trabalhos de sistemática de vários grupos de animais, incluindo os insetos (Carcupino *et al.*, 1995; Jamieson *et al.*, 1999).

Morfologia geral dos espermatozoides de Hymenoptera

Os espermatozoides em Hymenoptera são semelhantes àqueles considerados típicos para os Pterygota (Baccetti, 1972). São células filiformes, com comprimento variando entre as espécies, podendo medir de 8 µm em *Meteorus sp.* (Braconidae) (Quicke *et al.*, 1992) a 1.500 µm em *Euglossa mandibularis* (Apidae) (Zama *et al.*, 2005a). Apresentam a região da cabeça, constituída por um acrossoma, seguido pelo núcleo; e a região da cauda, ou flagelar, que na maioria

dos Hymenoptera, é composta pelo axonema, dois derivados mitocondriais, um adjunto do centríolo e dois corpos acessórios (Quicke *et al.*, 1992; Jamieson *et al.*, 1999).

O acrossoma é uma organela longa, anterior ao núcleo e formada pela vesícula acrossomal e o *perforatorium* (Jamieson *et al.*, 1999; Zama *et al.*, 2001; Lino-Neto & Dolder, 2002). O núcleo é geralmente muito longo e com cromatina elétron-densa e compactada. O axonema apresenta um arranjo padrão para insetos 9+9+2, ou seja, nove microtúbulos acessórios externos, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. Os dois derivados mitocondriais geralmente apresentam cristas, podendo conter material paracristalino, com diâmetros e comprimentos podendo ser iguais ou não (Wheeler *et al.*, 1990; Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1998). Os corpos acessórios situam-se entre os derivados mitocondriais e o axonema; são longos e com formato triangular em cortes transversais (Baccetti, 1972).

Características dos espermatozóides de Chalcidoidea

Diferentemente da maioria dos Hymenoptera, os espermatozóides de Chalcidoidea já estudados apresentam núcleo, axonema e derivados mitocondriais espiralados, como pode ser observado no desenho esquemático (Fig. 6) (Wilkes & Lee, 1965; Hogge & King, 1975; Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder 2001a; Fiorillo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2009). E, assim como a maioria das vespas parasíticas (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke 1998, 1999a; Lino-Neto & Dolder, 2001b), apresentam uma camada extracelular recobrando o acrossoma (quando presente) e a parte anterior no núcleo (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2009). Na região de transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo antecede o axonema e os dois derivados mitocondriais, que por sua vez, apresentam diâmetro bastante semelhante (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a, Fiorillo *et al.*, 2008).

Embora existam poucos trabalhos relacionados à ultraestrutura dos espermatozóides de Chalcidoidea, estes apontam que estas células apresentam

uma diversidade ultraestrutural suficiente para fornecer um sistema de caracteres (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a, Fiorillo *et al.*, 2008), que podem ser utilizados em trabalhos de sistemática para ajudar a elucidar problemas de classificações.

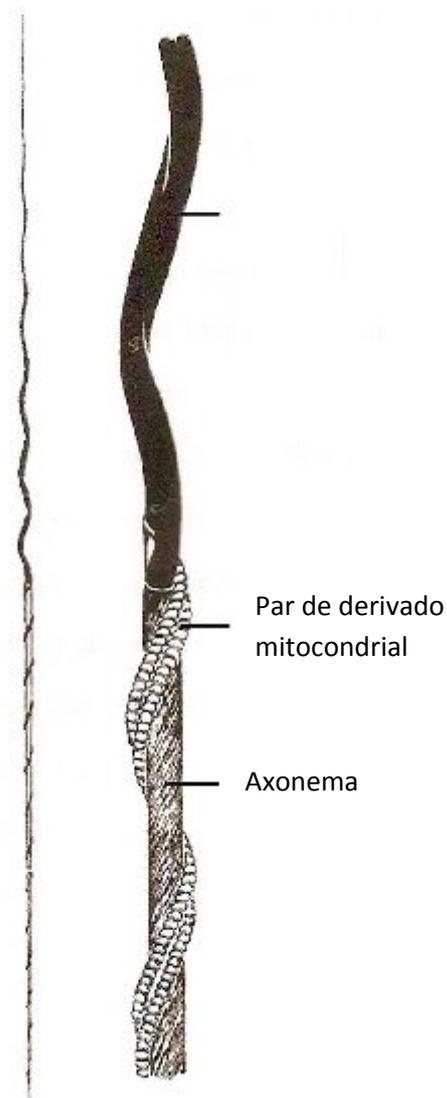


Figura 6: Esquema de espermatozóide típico de Chalcidoidea. Modificado de Wilkes & Lee (1965)

A morfologia dos espermatozoides de vespas *Idarnes* foi primeiramente observada por Pereira *et al.* (2008), no entanto, a única técnica utilizada para análise destas células foi a microscopia de luz (Figs. 7 A-F). Para a observação da característica retorcida do espermatozoide, típico de Chalcidoidea, assim como a medidas do comprimento total, foi utilizado a microscopia de contraste de fase (Figs. 7 A-C) e, observações e medidas nucleares foram realizadas por meio de marcações com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) (Figs 7 D-F).

Espermatozoides de *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) são longos, com comprimento total de 230 μm , em média, com núcleo pequeno, medindo cerca de 18 μm . Enquanto que em *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*) os espermatozoides são menores, aproximadamente 190 μm e 210 μm , respectivamente, e possuem núcleos maiores, 25 μm para ambas as espécies (Pereira *et al.*, 2008).

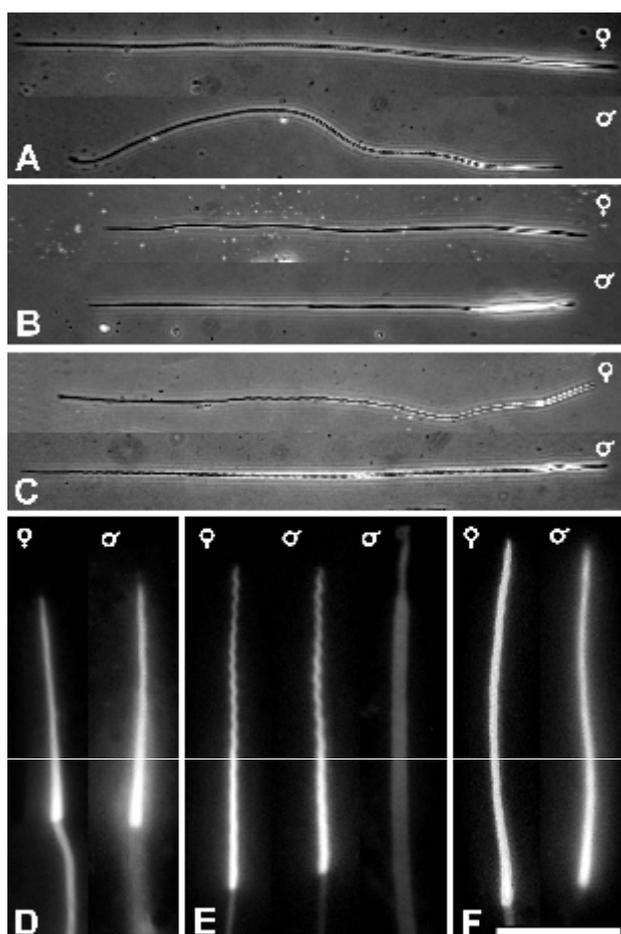


Figura 7. Micrografias de espermatozoides obtidos de espermateca (♀) e vesícula seminal (♂) de vespas *Idarnes*. (A-C) Espermatozoides em comprimento total mostrando formato contorcido. (D-F) Região da cabeça com núcleo com formato helicoidal. (A, D) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*), (B, E) *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), (C, F) *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). Escalas: (A-C) 50 μm ; (D-F) 10 μm . (Fonte: Pereira *et al.*, 2008)

2. Objetivos

Partindo do pressuposto que (1) a ultraestrutura de espermatozoides possa ajudar na problemática de classificação em insetos, (2) que a falta de posicionamento em família da subfamília Sycophaginae, assim como a escassez de trabalhos a respeito de vespas *Idarnes* seja ainda um problema para este gênero, torna-se necessário a descrição e comparação da ultraestrutura dos espermatozoides desde grupo, de modo que sejam utilizadas como uma ferramenta adicional para melhor interpretar as relações filogenéticas deste gênero de vespas de figo.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram:

- Caracterizar a ultraestrutura dos espermatozoides de três espécies do gênero *Idarnes* e,
- Compará-las não apenas entre si, para verificar se existem diferenças marcantes entre as espécies, mas também compará-las aos dados de outros Chalcidoidea já existentes na literatura, para que estudos filogenéticos sejam realizados posteriormente nesta superfamília.

3. Materiais e Métodos

As três espécies de *Idarnes* utilizadas no trabalho foram *Idarnes* sp.1 e *Idarnes* sp.2, ambas pertencente ao grupo *carne*, e *Idarnes* sp.3 (grupo *flavicollis*).

Espécimes machos destas três espécies de *Idarnes* foram coletados no campus da Universidade de São Paulo (USP), na cidade de Ribeirão Preto, nos meses: abril/2008, janeiro, junho, agosto e setembro/2009. O material testemunho pode ser encontrado na coleção de vespas de figo do laboratório de Biologia Reprodutiva de *Ficus* - Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto/SP, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira.

Os machos foram dissecados em Tampão Fosfato-Salino (PBS), para remoção dos testículos e vesículas seminais e em seguida processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Testículos e vesículas seminais foram fixadas em solução fixadora convencional (rotina): glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, CaCl_2 5 mM e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 a 4 °C por 24h; pós fixadas em tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 1,6% CaCl_2 10 mM em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 por 1h. A contrastação *in block* foi realizada em acetato de uranila 0,5% overnight; e a desidratação em séries crescentes de acetona (30-100%). Após a desidratação, as estruturas foram infiltradas em resina Spurr, emblocadas com a referida resina, e mantidas em estufa a 60 °C por 48h para polimerização. Cortes semifinos e ultrafinos foram realizados em ultramicrótomos Reichert Supernova, analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 a 80 Kv e fotografados em câmera Gatan.

Visando uma melhor preservação dos microtúbulos axonemais, utilizou-se a técnica de ácido tânico. Esta técnica consiste na fixação em glutaraldeído 2%, ácido tânico 1%, sacarose 1,8% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 5 dias a 4 °C. A seguir foi realizada a contrastação *in block* com acetato de uranila 1% em água destilada e em seguida o material foi processado conforme descrito anteriormente.

Para a detecção de proteínas básicas, foi realizada análises citoquímicas por meio de ácido etanólico fosfotúngstico (E-PTA), uma vez que em insetos, o adjunto do centríolo é constituído por ribonucleoproteínas e proteínas (Taffarel & Esponda, 1980). O material foi, inicialmente, fixado em glutaraldeído 2,5%, sacarose 5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 24h a 4 °C. Desidratado em série crescente de etanol (30-90%) e tratadas *in block* com uma solução de PTA 2% em etanol absoluto durante 24h em temperatura ambiente, e em seguida o material foi infiltrado em resina Spurr, emblocado na mesma resina e mantido em estufa para polimerização.

Nas técnicas de ácido tânico e E-PTA não foram realizadas a pós fixação. E, em todas as técnicas utilizadas, os cortes ultrafinos foram analisados sem contrastação das telinhas.

4. Resultados

Os espermatozoides das três espécies de *Idarnes* são células alongadas e helicoidalmente retorcidas ao longo de todo o seu comprimento. São divididas em duas regiões, uma anterior correspondente à cabeça onde se encontra o núcleo e o acrossoma, e outra posterior, correspondente ao flagelo que é, por sua vez, composto pelo axonema, com um arranjo microtubular 9+9+2, um par de derivados mitocondriais e o adjunto do centríolo.

Região da cabeça

Acrossoma

O acrossoma localiza-se no ápice do núcleo e apresenta formato diferente para as três espécies, como observado em cortes longitudinais (Figs. 8 A-B, D-E, G-H) e transversais (Figs. 8 C, F, I). Em *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) o acrossoma é longo e dividido em dois compartimentos (Figs. 8 A-B), um inferior, correspondente a vesícula subacrossomal, com aproximadamente 180 nm de comprimento; e um superior, correspondente a vesícula acrossomal, com 715 nm de comprimento. A vesícula acrossomal apresenta formato ovalado, e na sua extremidade superior encontra-se uma estrutura paracristalina (Figs. 8 A-B), melhor observado em corte transversal (Fig. 8 C). Vespas *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) apresentam acrossoma recoberto pelo revestimento extracelular (Figs. 8 D-F), o qual é pequeno, ovalado e também bicompartimentado (Figs. 8 D-E). A vesícula subacrossomal possui aproximadamente 100 nm, e a vesícula acrossomal, 195 nm de comprimento. Em *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*) esta estrutura é bastante alongada, composta por três compartimentos (Fig. 8 H), o *perforatorium*, com aproximadamente 560 nm, a vesícula subacrossomal, 705 nm, e a vesícula acrossomal com 870 nm de comprimento. Estes compartimentos também podem ser observados em corte transversal (Fig. 8 I). Nesta última espécie, as vesículas subacrossomal e acrossomal recobrem o *perforatorium* ao longo de todo o seu comprimento (Figs. 8 G-H). Este, por sua vez, encaixa-se em uma pequena cavidade na ponta do núcleo (Fig. 8 G), apresentando a extremidade anterior dilatada e seu formato assemelhando-se a um cone (Fig. 8 G-H). Embora o *perforatorium* não tenha sido observado nas outras duas espécies, o acrossoma também se encaixa em uma cavidade no ápice do núcleo (Figs. 8 A, D-E).

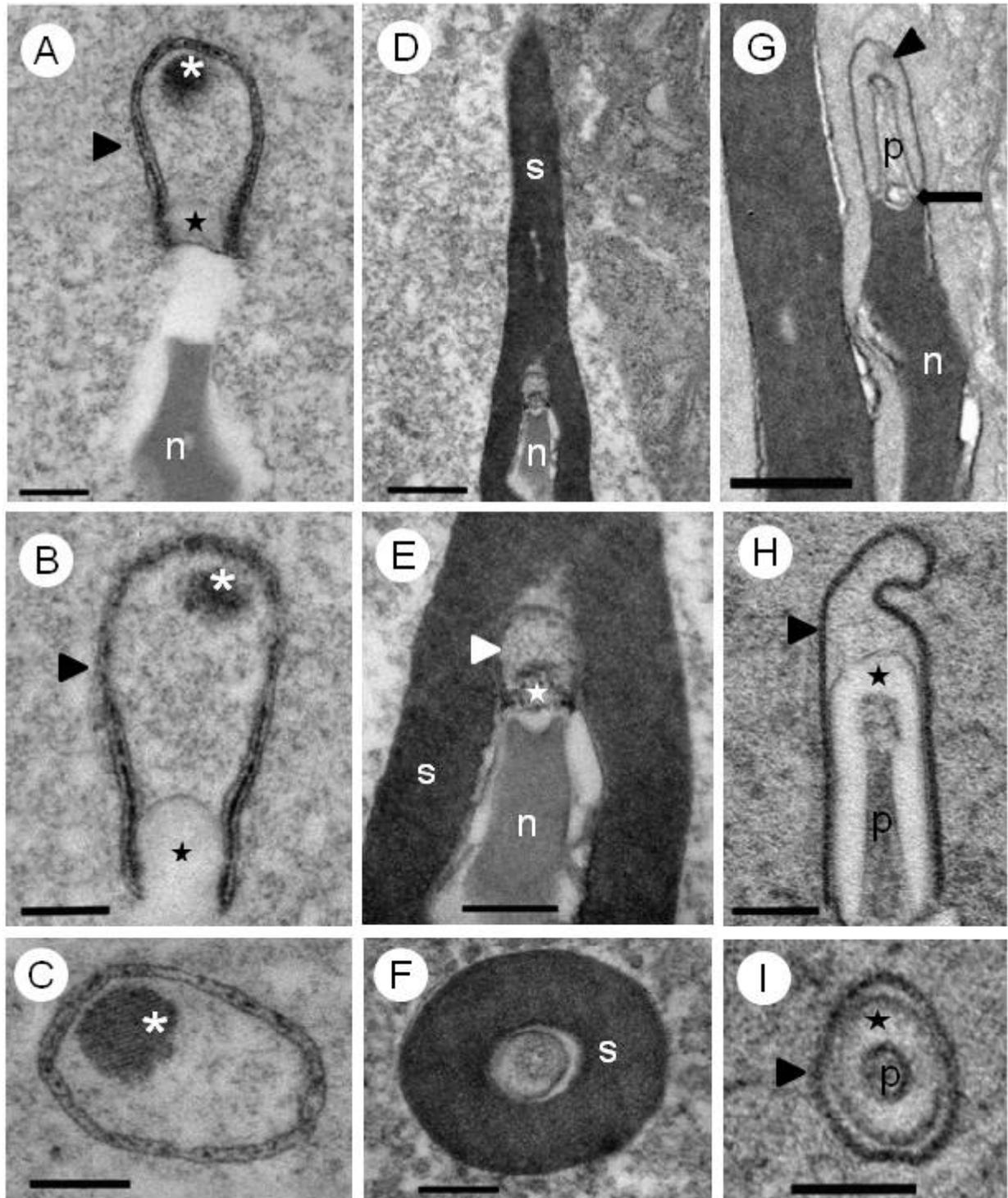


Figura 8. Micrografias Eletrônicas de Transmissão da região do acrossoma. (A-B, D-E, G-H) Cortes longitudinais mostrando os diferentes formatos do acrossoma nas três espécies de *Idarnes*. (C, F, I) Cortes transversais. (A-C) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*); (D-F) *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*); (G-I) *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). (cabeça de seta) vesícula acrossomal, (estrela) vesícula subacrossomal, (asterisco) estrutura paracristalina, (p) *perforatorium*, (s) revestimento extracelular, (n) núcleo, (seta) inserção do *perforatorium* no núcleo. (A-F, H-I) Ácido tânico, (G) Rotina. Escalas: (A-C, E-F, H-I) 0,2 μm ; (D, G) 0,5 μm

Núcleo

A cromatina nuclear é altamente compactada, homogênea e elétron-densa (Figs. 9 A-F). A torção do núcleo pode ser observada tanto em cortes longitudinais (Figs. 9 A-C) como em cortes transversais (Figs. 9 E-F), uma vez que apresentam formato irregular. O núcleo também apresentou elétron densidade para a técnica de ácido etanólico fosfotúngstico (E-PTA) (dados não mostrados).

Dentre as espécies analisadas, *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) foi a única que apresentou um revestimento extracelular envolvendo o acrossoma (Figs. 8 D-F) e o núcleo (Fig. 9 B, F) que, por sua vez, se estende até a região anterior do flagelo e, termina em alturas diferentes (Fig. 9 D).

Região de transição núcleo-flagelo

A região de transição núcleo-flagelo é caracterizada pela presença do adjunto do centríolo e é assim denominada por ser o local de inserção do flagelo à base do núcleo, possibilitando esta união.

As três espécies de *Idarnes* apresentam adjunto do centríolo alongado, como pode ser observado em cortes longitudinais (Figs. 10 A-D). Estes evidenciam ainda, que o adjunto do centríolo encontra-se envolvido pelos derivados mitocondriais; característica também observada em cortes transversais (Figs. 10 F-G). Esta estrutura, no entanto, não se encontra inserida na base do núcleo, mas inicia-se pouco abaixo dele, como observado nas figuras 10 A-D e na sequência de cortes transversais da porção inicial do flagelo (Figs. 10 E-G). Estes últimos estão dispostos de acordo com a altura do flagelo em relação ao núcleo, ou seja, a figura 10 E [*Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*)] ilustra o início do flagelo, logo abaixo do núcleo; nesta região observa-se um espaço entre os derivados mitocondriais, e a figura 10 F [*Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*)] é referente à região mais inferior onde o adjunto do centríolo encontra-se presente. Em *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) (Fig. 10 G) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*) (dado não mostrado em corte transversal), o espaço entre os derivados mitocondriais não é tão evidente. Nas técnicas de rotina e ácido tânico o adjunto do centríolo mostrou-se com um aspecto semelhante a uma massa elétron-densa (Figs. 10 A-D, F-G). Mas, na técnica de ácido etanólico fosfotúngstico (E-

PTA), ficou constatado que tal estrutura é formada por uma massa elétron-densa, mas permeada por lacunas elétron-lúcidas (Fig. 11 A).

O adjunto do centríolo estende-se, portanto, pouco distante do núcleo (Figs. 10 A-D) até o início do axonema (Figs. 11 A-C), região onde os microtúbulos axonemais se inserem (Figs. 11 D-F)

Em *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) o revestimento extracelular é observado tanto em cortes longitudinais (Figs. 9 D, 10 B, 11 B) como transversais (Figs. 10 G, 11 E) recobrimdo esta região do espermatozóide.

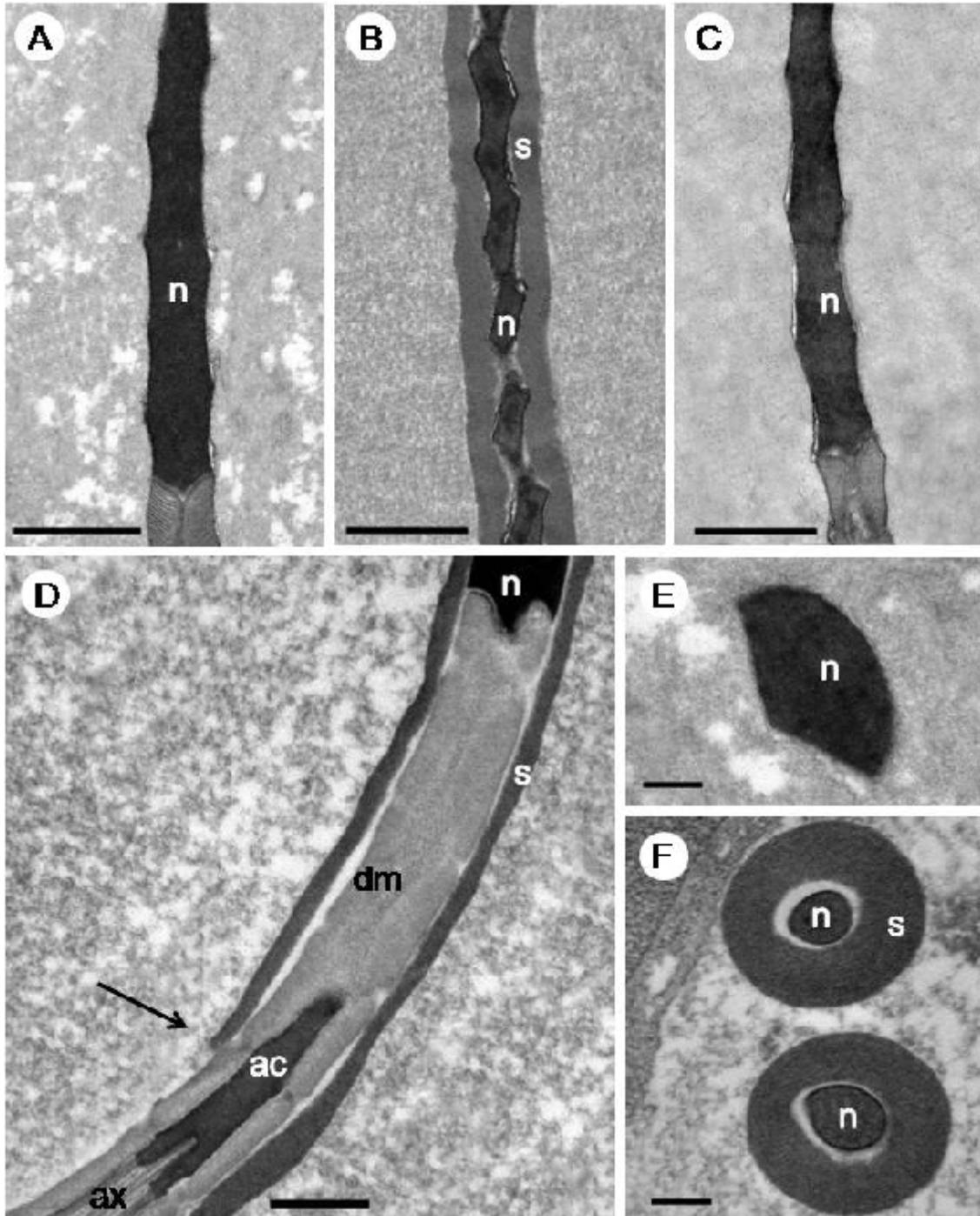


Figura 9. Micrografias Eletrônicas de Transmissão da região do núcleo. **(A-D)** Cortes longitudinais e **(E-F)** transversais mostram núcleo (n) com formato contorcido. **(B)** Revestimento extracelular (s) recobrimo o núcleo e **(D)** a porção anterior do flagelo. **(A, E)** *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*); **(B, D, F)** *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*); **(C)** *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). (Seta) porção final do revestimento extracelular, (ac) adjunto do centríolo, (ax) axonema. **(A-C, E)** Rotina, **(D, F)** Ácido tânico. Escalas: **(A-C)** 1 μ m; **(D)** 0,5 μ m; **(E-F)** 0,2 μ m

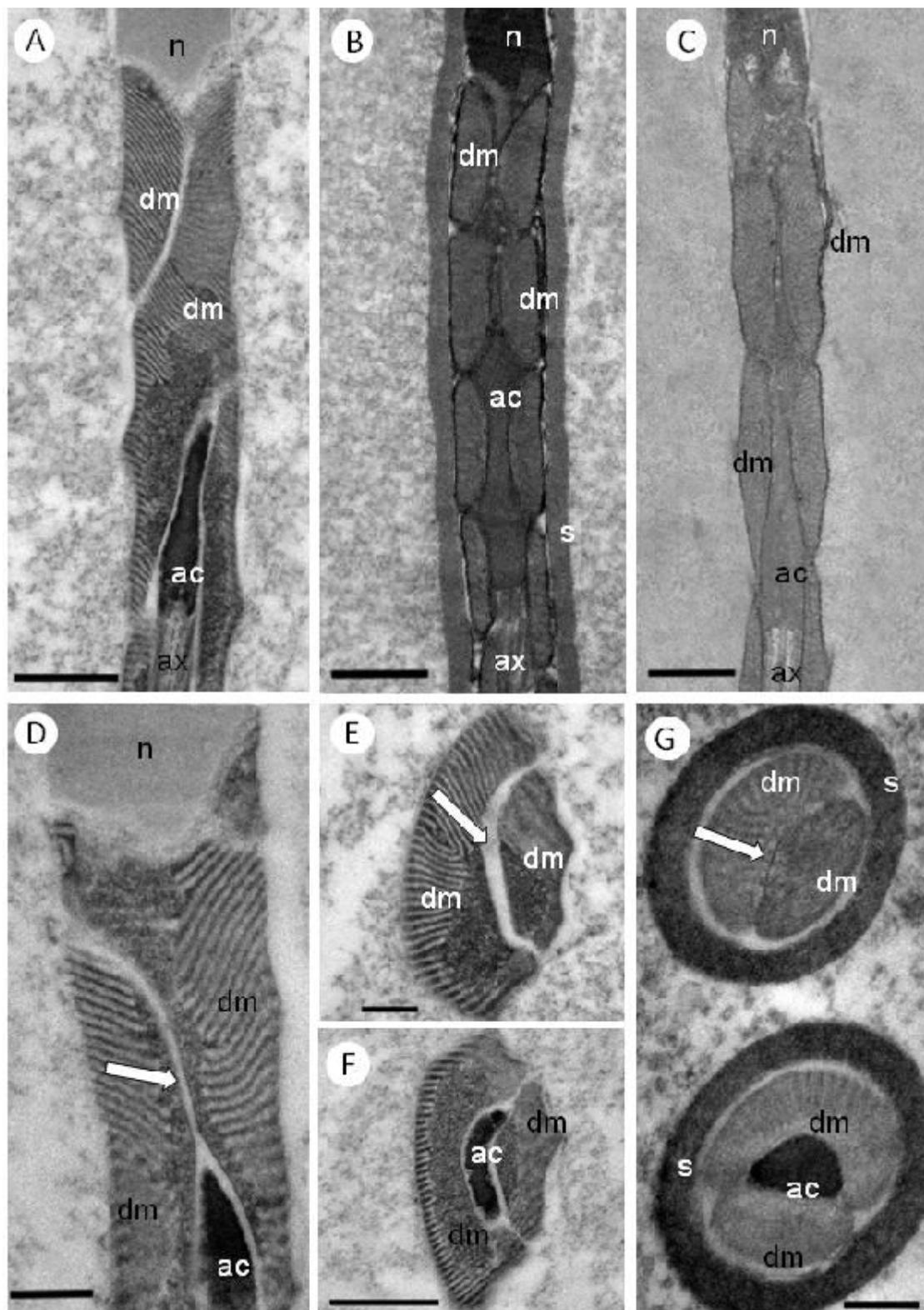


Figura 10. Micrografias Eletrônicas de Transmissão da região de transição núcleo-flagelo – adjunto do centríolo. (A-D) Cortes longitudinais mostrando o adjunto do centríolo (ac) envolvido pelos derivados mitocondriais (dm). (E-G) Sequência de cortes transversais do início do flagelo. (A, D-F) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*); (B, G) *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*); (C) *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). (s) revestimento extracelular, (ax) axonema, (n) núcleo, (seta) espaço entre os derivados mitocondriais. (B-C) Rotina, (A, D-G) Ácido tânico. Escalas: (A, B, C, F) 0,5 μ m; (D-E, G) 0,2 μ m

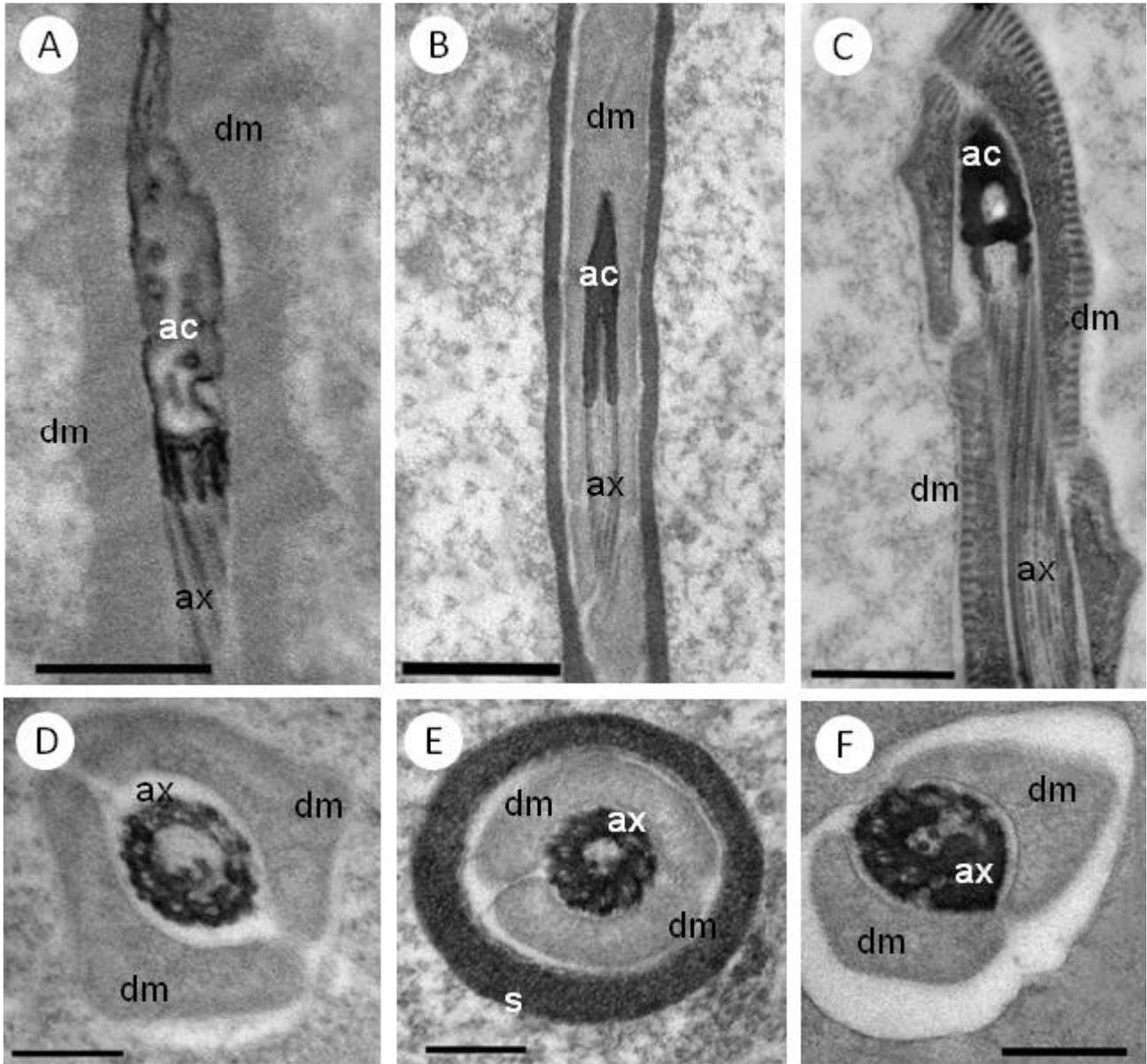


Figura 11. Micrografias Eletrônicas de Transmissão da região de transição núcleo-flagelo - inserção do axonema. (A-C) Cortes longitudinais mostrando o adjunto do centríolo (ac) envolvido pelos derivados mitocondriais (dm). (D-F) Cortes transversais evidenciando o adjunto do centríolo revestindo os elementos do axonema. (A, C-D) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*), (B, E) *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), (F) *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). (s) revestimento extracelular. (B-C, E-F) Ácido tânico, (A,D) E-PTA. Escalas: (A, C) 0,5 μ m; (B) 1 μ m; (D-F) 0,2 μ m

Região do flagelo

Torção flagelar

Nas três espécies de *Idarnes* a torção do axonema é facilmente observada em cortes longitudinais (Figs. 12 A-F) e evidenciada em cortes transversais (Figs. 13 A-I) por meio dos microtúbulos, uma vez que alguns parecem desfocados enquanto outros são bastante evidentes. Isso se dá pelo fato de, devido à torção, nem todos os microtúbulos serem seccionados em ângulo reto.

Outra estrutura pela qual se pode observar a torção do flagelo é o par de derivados mitocondriais, para isto, deve-se comparar tanto os cortes longitudinais (Figs. 12 A-B, C-D, E-F) quanto os cortes transversais (Figs. 13 A-B, D-E, G-H). As figuras (12 A, C, E e 13 A, D, G) correspondem a porção anterior do flagelo, onde os derivados aparecem bastante próximos, indicando grande torção, enquanto que as figuras (12 B, D, F e 13 B, E, H) correspondem a porção intermediária do flagelo, nesta região os derivados encontram-se mais espaçados, evidenciando uma redução na torção.

Em espermatozóides de *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*), a torção observada no par de derivados mitocondriais, na porção intermediária do flagelo, é aproximadamente 1,3 μm , enquanto que nas espécies de *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*) é de 0,6 μm e 1,6 μm , respectivamente. Desta forma, constata-se que a torção é mais acentuada em *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*).

Constituição flagelar

O axonema apresenta um arranjo microtubular 9+9+2 (Fig. 14 A), sendo dois microtúbulos centrais, nove pares periféricos e nove microtúbulos acessórios, localizados mais externamente. No entanto, este arranjo é sequencialmente desfeito na porção final do axonema (Figs. 14 A-D). Na extremidade final do flagelo, os acessórios são os primeiros a terminarem (comparar as figuras 14 A e B); em seguida os centrais (comparar figuras 14 B e C) e, por último, os pares periféricos, que antes de terminarem, encontram-se de maneira desorganizada (Fig. 14 D).

Além do axonema, o flagelo também possui um par de derivados mitocondriais que o percorre ao longo de quase todo o comprimento do

espermatozóide de maneira helicoidal (Figs. 12 A-F), estes apresentam cristas mitocondriais (Figs. 10 A, D-G, 11 C, 12 A-B, 13 A, G) e material amorfo foi observado apenas em *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) (10 A, D-F, 11 C, 13 A).

Embora os dois derivados mitocondriais iniciam-se juntos, logo abaixo do núcleo (Figs. 10 A-D), na porção final do flagelo eles terminam em alturas diferentes, isto é, um termina antes do outro (Figs. 13 C, F, I).

Os derivados mitocondriais diferem nas três espécies tanto no seu formato quanto no seu tamanho (Figs. 13 A-C, D-F, G-I). Em cortes longitudinais, os derivados mitocondriais de vespas *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) (Figs. 12 A-B) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicolis*) (Figs. 12 E-F) são pontiagudos, enquanto que em vespas *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) (Figs. 12 C-D) são achatados e compridos. Em cortes transversais, os derivados de vespas *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) (Figs. 13 A-C) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicolis*) (Figs. 13 G-I) apresentam diferenças sutis no seu tamanho, com formato triangular. Já em *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) (Figs. 13 D-E) os derivados apresentam tamanhos semelhantes, são achatados e compridos na região proximal do flagelo (Fig. 13 D) e ovalados na região distal (Figs. 13 E-F).

Tanto cortes longitudinais (Figs. 12 A-B) quanto transversal (Fig. 13 A) de *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) mostram que as cristas mitocondriais são paralelas, com periodicidade de cerca de 35 nm. Nas outras duas espécies as cristas também estão dispostas paralelamente (dados não mostrados), com periodicidade de 34 nm para *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicolis*).

Em vespas *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) os derivados mitocondriais encontram-se envolvidos pelo revestimento extracelular apenas na região anterior do flagelo, como observado na figura 12 C, longitudinal, e na figura 13 D, transversal.

Não foi possível identificar a presença de corpos acessórios entre os derivados mitocondriais e o axonema em nenhuma das três espécies.

Os resultados foram ilustrados de forma simplificada na tabela 1 para melhor visualização dos mesmos.

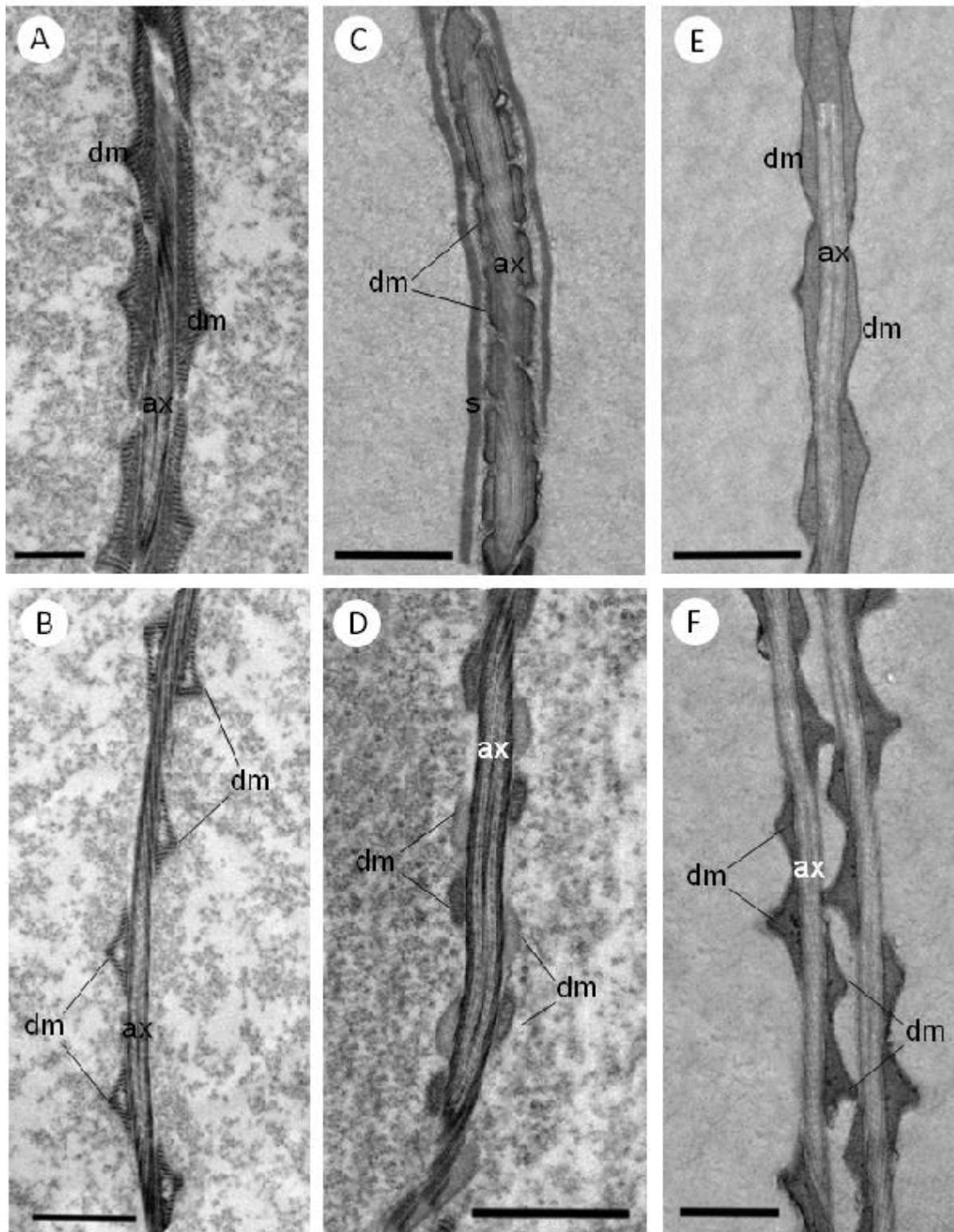


Figura 12. Micrografias Eletrônicas de Transmissão da região do flagelo em secções longitudinais. (A-F) Mostrando o axonema (ax) retorcido e envolvido pelos derivados mitocondriais (dm). (A-B) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*), (C-D) *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), (E-F) *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicolis*). (s) revestimento extracelular. (A-B, D) Ácido tânico, (C,E-F) Rotina. Escalas: (A) 0,5 μ m; (B-F) 1 μ m

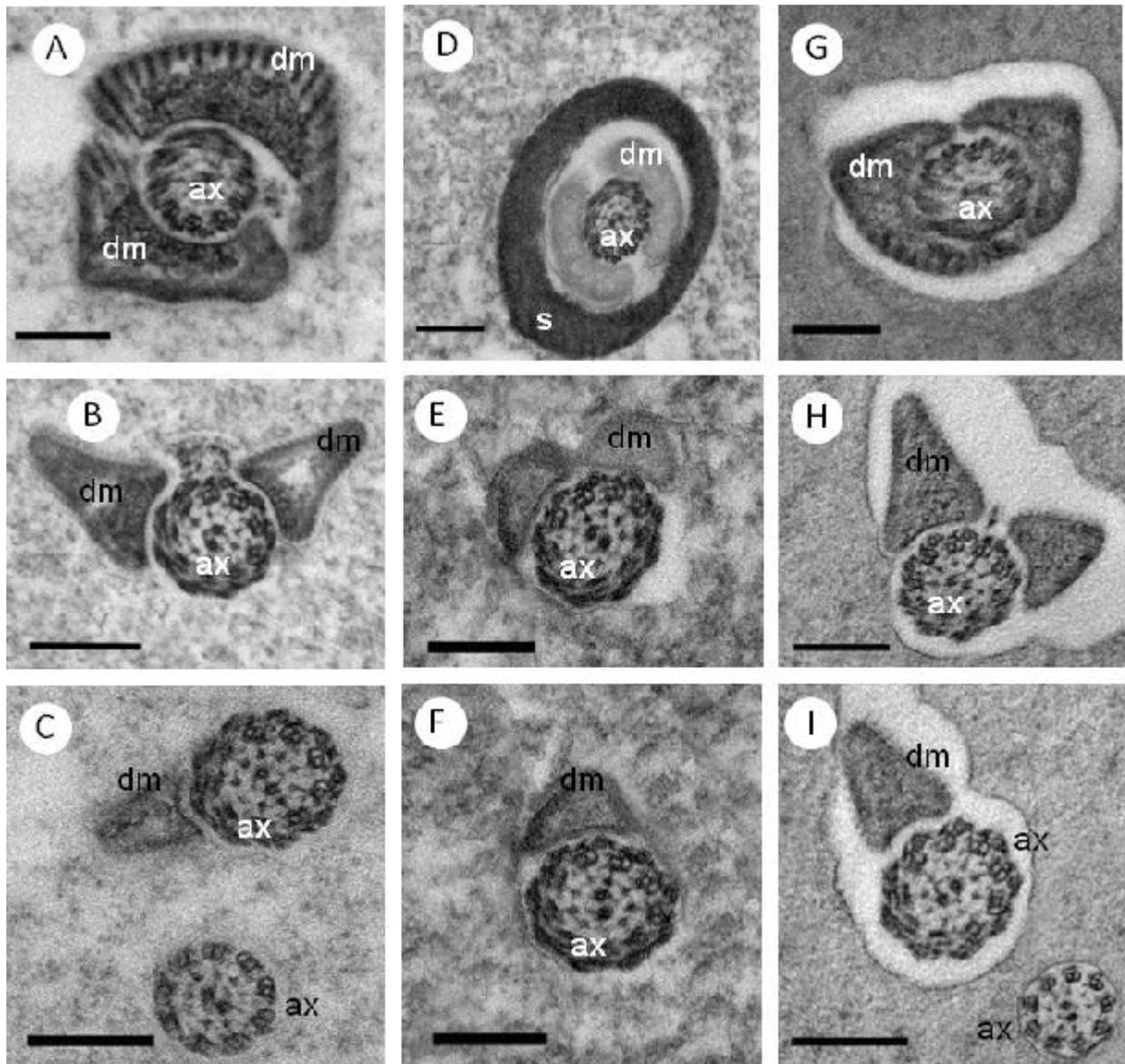


Figura 13. Micrografias Eletrônicas de Transmissão da região do flagelo em seções transversais. (A-I) Mostra o formato e a sequência da abertura dos derivados mitocondriais (dm) e o término deles nas três espécies. (A-C) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*), (D-F) *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), (G-I) *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicolis*). (ax) axonema, (s) revestimento extracelular. (A-I) Ácido tânico. Escalas: (A-I) 0,2 μ m

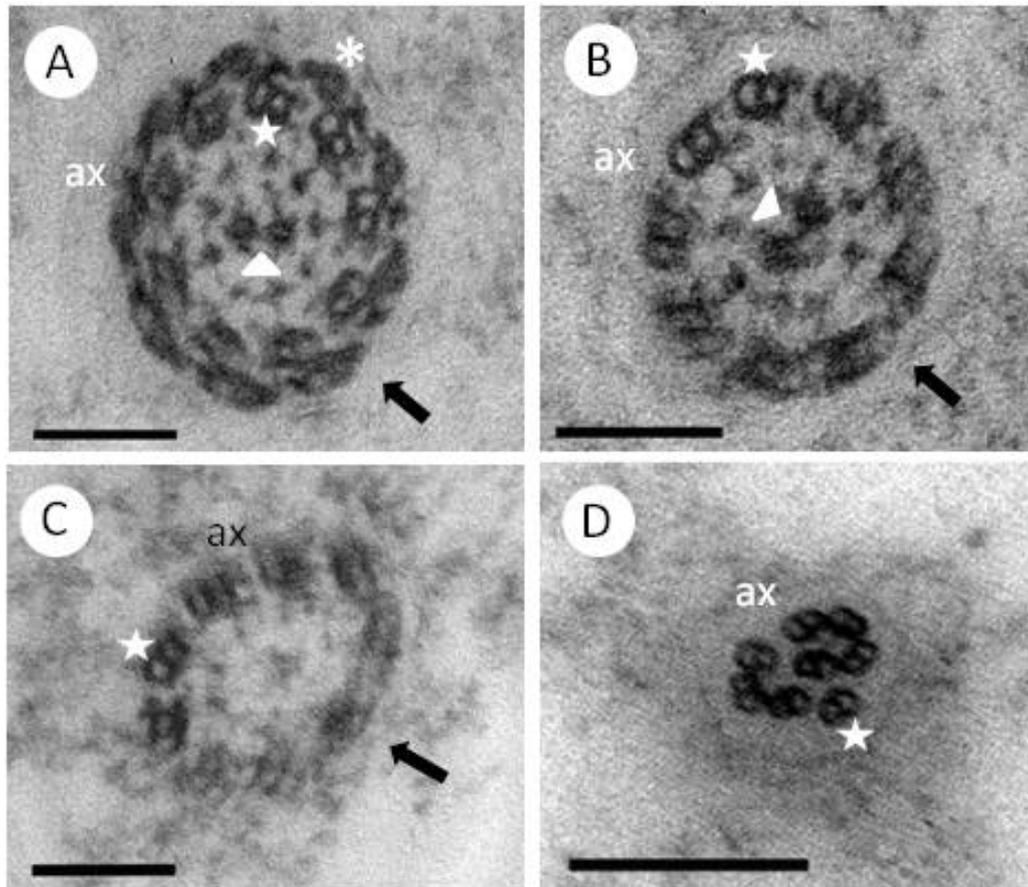


Figura 14. Micrografias Eletrônicas de Transmissão do final do flagelo em secções transversais. (A-D) Mostrando a sequência do término dos microtúbulos axonemais. (A-D) *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*). (ax) axonema, (asterisco) microtúbulos acessórios, (estrela) pares de microtúbulos periféricos, (cabeça de seta) par de microtúbulo central, (seta) torção dos microtúbulos. (A-D) Ácido tânico. Escalas: (A-C) 0,1 μm ; (D) 0,2 μm

Tabela 1. Caracteres das regiões de espermatozoides de três espécies de *Idarnes*

Região do espermatozoide	Caracteres	Estado do Caractere	Espécies		
			<i>Idarnes</i> sp. 1 (grupo <i>carne</i>)	<i>Idarnes</i> sp. 2 (grupo <i>carne</i>)	<i>Idarnes</i> sp. 3 (grupo <i>flavicollis</i>)
Cabeça	Acrossoma	Diferente nas 3 espécies	+ 2compartimentos (Vesícula acrossomal e subacrossomal)	+ 2compartimentos (Vesícula acrossomal e subacrossomal)	+ 3compartimentos (Vesícula acrossomal, subacrossomal e <i>perforatorium</i>)
		Núcleo	+ Retorcido com cromatina compactada, homogênea e eletrondensa	+ Retorcido com cromatina compactada, homogênea e eletrondensa	+ Retorcido com cromatina compactada, homogênea e eletrondensa
	Região de transição núcleo-flagelo	Adjunto do centríolo	+ Alongado, afastado do núcleo e envolvido pelos derivados mitocondriais	+ Alongado, afastado do núcleo e envolvido pelos derivados mitocondriais	+ Alongado, afastado do núcleo e envolvido pelos derivados mitocondriais
	Revestimento extracelular	- Presente em apenas uma espécie	- Presente em apenas uma espécie	+ Recobre o acrossoma, núcleo e se estende até a região anterior do flagelo	- Presente em apenas uma espécie
Flagelo	Derivados mitocondriais	Envolve o adjunto do centríolo e o axonema.	+ Triangulares	+ Achatados/ Alongados	+ Triangulares
		Diferença no formato mais evidente em uma espécie	Triangulares	Achatados/ Alongados	Triangulares
	Axonema	+ Retorcido, com início afastado do núcleo	+ Retorcido, com início afastado do núcleo	+ Retorcido, com início afastado do núcleo	

5. Discussão

Espermatozoides de *Idarnes* apresentam uma estrutura básica semelhante aos outros Chalcidoidea já descritos na literatura, tais como *Bephratelloides pomorum* (Eurytomidae) (Lino-Neto *et al.*, 1999); *Trichogramma pretiosum* e *T. atopovirilia* (Trichogrammatidae) (Lino-Neto *et al.*, 2000a); *Trichogramma dendrolimi* (Trichogrammatidae) (Lino-Neto & Dolder, 2001a); *Pegoscopus* sp. 1, *Pegoscopus* sp. 2 e *P. tonduzi* (Agaonidae) (Fiorillo *et al.*, 2008) e *Melittobia hawaiiensis* e *M. australica* (Eulophidae) (Brito *et al.*, 2009). Nestas espécies, os espermatozoides são longos, delgados e com uma estrutura helicoidal tanto na região da cabeça, quanto na região flagelar, ou seja, apresentam núcleo e flagelo torcidos com derivados mitocondriais percorrendo o axonema helicoidalmente. Esta característica retorcida dos Chalcidoidea os difere de muitos himenópteros, cujos espermatozoides são lineares (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto & Dolder, 2002, Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2006).

Em *Idarnes* o comprimento total dos espermatozoides é diferente para as três espécies, variando de 230 µm [*Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*)] a 190 µm [*Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*)], no entanto, o comprimento do núcleo é diferente apenas para uma espécie, *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) com 18 µm, enquanto que as outras duas espécies o núcleo possui 25 µm de comprimento (Pereira *et al.*, 2008).

Região da cabeça

Embora as três espécies de *Idarnes* apresentem acrossoma anterior ao núcleo, a estrutura clássica do complexo acrossomal, constituída pela vesícula acrossomal e *perforatorium*, presente em muitos himenópteros (Lino-Neto & Dolder, 2001b (apenas em *Trissolcus basal*), 2002; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a,b; Bão *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005, 2009; Fiorillo *et al.*, 2005; Lino-Neto *et al.*, 2008; Gracielle *et al.*, 2009; Mancini *et al.*, 2009) foi observada apenas em *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*). O formato cônico da vesícula acrossomal e *perforatorium*, assim como sua inserção no ápice do núcleo em *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*) são semelhantes ao descrito para *Bephratelloides pomorum* (Eurytomidae: Chalcidoidea) (Lino-Neto *et al.*, 1999) e outros hymenopteros [(Formicidae - Lino-Neto & Dolder, 2002); (Apidae – Bão *et al.*, 2004); (Halictidae - Fiorillo *et al.*, 2005); (Sphecidae – Zama *et al.*, 2005b); (Crabronidae - Araújo *et al.*, 2009); (Vespidae - Mancini *et al.*,

2009)]. Em *Idarnes* sp. 1 e *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), assim como em outros Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Brito *et al.*, 2009), o *perforatorium* do complexo acrossomal não foi observado. A total ausência do acrossoma em espécies chalcidoides foi registrada apenas em três espécies de Agaonidae (Fiorillo *et al.*, 2008).

O acrossoma de *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), medindo 195 nm, é o menor já observado em Chalcidoidea, cujos relatos variam de 260 nm em Eulophidae (Brito *et al.*, 2009) a 1,5 µm em Trichogrammatidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Em relação à presença do revestimento extracelular, as três espécies de *Idarnes* analisadas, diferem não apenas entre si, uma vez que tal revestimento foi observado apenas em espermatozoides de *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), mas também em relação às outras espécies chalcidoides já descritas, no que diz respeito ao seu comprimento e aos filamentos que se irradiam dele. Nos Chalcidoidea, tal revestimento se limita à região do acrossoma e à porção anterior do núcleo (Hogge & King, 1975; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Fiorillo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2009) além de apresentarem numerosos filamentos (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a, Fiorillo *et al.*, 2008, Brito *et al.*, 2009).

Acredita-se que a presença desta estrutura seja uma característica de vespas parasíticas, uma vez que foi relatada não apenas em vespas chalcidoides, mas também em Ichneumonidae (Quicke *et al.*, 1992) e Cynipoidea (Newman & Quicke 1999a). No entanto, não foi observada em duas das três espécies de *Idarnes* aqui analisadas, e em Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001b).

O núcleo helicilmente retorcido, com cromatina compactada e homogênea é uma característica das vespas Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2009).

Região de transição núcleo-flagelo

A região de transição núcleo-flagelo é composta pela base nuclear, o adjunto do centríolo e a porção anterior do flagelo. É neste local que ocorre a inserção do flagelo à base do núcleo.

Esta união é facilitada pela presença do adjunto do centríolo, estrutura característica desta região, cuja composição é basicamente por ribonucleoproteínas

e proteínas (Taffarel & Esponda, 1980). Desta forma, a técnica de ácido etanólico fosfotúngstico (E-PTA) é comumente utilizada em estudos de espermiogênese de invertebrados (Báo, 1996; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Conte *et al.*, 2005; Zama *et al.*, 2005b, 2007) e vertebrados (Ferreira & Dolder, 2003 a,b) para detecção de proteínas básicas. Nas espécies *Idarnes* foi possível observar que o adjunto do centríolo é E-PTA positivo, mas apresenta espaços elétron-lúcidos, provavelmente devido à composição de proteínas diferentes.

Nas espécies de *Idarnes* o adjunto do centríolo, alongado e localizado entre os derivados mitocondriais, difere grandemente dos outros Chalcidoidea. Nestes, o adjunto do centríolo é curto e apresenta formato em disco entre o núcleo e o flagelo (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo *et al.*, 2008), com projeções se estendendo a partir dele (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo *et al.*, 2008, Brito *et al.*, 2009). Estas projeções podem ser anteriores e justapostas basolateralmente ao núcleo (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Brito *et al.*, 2009); apenas posterior, associada ao início do flagelo (Fiorillo *et al.*, 2008); com projeções tanto anterior quanto posterior (Lino-Neto & Dolder, 2001a); ou ainda se estendendo do centríolo em sentido anterior, em formato espiral ao redor do núcleo (Lino-Neto *et al.*, 1999), nestas vespas o formato desta estrutura é dito simétrico. Embora outros himenópteros também apresentem adjunto do centríolo alongado, este se localiza lateralmente, circundando a extremidade posterior do núcleo e a base dos derivados mitocondriais e o axonema, num arranjo assimétrico (Newman & Quicke, 1998; 1999a,b; Lino-Neto *et al.*, 2000b; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a,b; Báo *et al.*, 2004; Fiorillo *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2006).

Além das diferenças no formato e localização, o adjunto do centríolo em *Idarnes* parece não atingir a base do núcleo. Nestas vespas o adjunto do centríolo afila-se anteriormente, não sendo claramente observada sua ligação à base nuclear.

Região flagelar

O flagelo em *Idarnes* segue o mesmo arranjo observado em outros Chalcidoidea, onde o axonema é torcido, com microtúbulos axonemais 9+9+2, que para melhor visualização é comumente utilizado a técnica de ácido tânico, e um par de derivados mitocondriais percorrendo o axonema helicoidalmente (Lino-Neto *et al.*,

1999, 2000a, Lino-Neto & Dolder, 2001a; Fiorillo *et al.*, 2008, Brito *et al.*, 2009). O flagelo difere apenas na distância em que o axonema se inicia, em relação ao núcleo. Nas três espécies, ele se inicia mais distante do núcleo, devido ao longo adjunto do centríolo que apresentam, enquanto que nas espécies de Eurytomidae (Lino-Neto *et al.*, 1999), Trichogrammatidae (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a), Agaonidae (Fiorillo *et al.*, 2008) e Eulophidae (Brito *et al.*, 2009), o axonema começa logo abaixo do núcleo, após um curto adjunto do centríolo.

À medida que os microtúbulos axonemais aproximam-se da extremidade final do flagelo, eles vão sendo desmontados em diferentes sequências, variando entre os grupos de insetos. Em *Idarnes*, assim como em outros Chalcidoidea, com exceção de *Pegoscapus* (Fiorillo *et al.*, 2008) os microtúbulos acessórios terminam primeiro (Lino-Neto *et al.*, 1999; 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Brito *et al.*, 2009). E, assim como observado em alguns Parasitica, os pares periféricos são os últimos a terminar (Newman & Quicke, 1998; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a). Já nos Aculeata, os microtúbulos centrais e os nove pares periféricos terminam primeiro, e mais adiante os microtúbulos acessórios (Lino-Neto *et al.*, 2000b, Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005 a,b, 2007, Báó *et al.*, 2004, Fiorillo *et al.*, 2005). Em formigas, todos eles terminam aproximadamente juntos (Wheeler *et al.*, 1990; Lino-Neto & Dolder, 2002).

Diferenças importantes podem ser observadas comparando os derivados mitocondriais tanto entre as três espécies de *Idarnes*, quanto com outros Chalcidoidea (Wilkes & Lee, 1965; Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a, Fiorillo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2009). Tais diferenças residem, basicamente, no formato dos mesmos. Os formatos triangulares e, alongados e achatados relatados em *Idarnes*, nunca foram observados nesta superfamília.

Entre as espécies aqui analisadas, eles apresentam formato triangular em *Idarnes* sp. 1 (grupo *carne*) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*); achatados e alongados em *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*). Enquanto que em outros Chalcidoidea os derivados mitocondriais são geralmente ovais e apresentam diâmetros semelhantes (Quicke *et al.*, 1992; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a, Fiorillo *et al.*, 2008), no entanto, podem ainda apresentar diâmetros diferentes (Brito *et al.*, 2009); neste caso o derivado mitocondrial com área maior apresenta uma constrição que o divide

em duas porções, ficando a menor mais próxima ao axonema. Em outros Hymenoptera é comum os derivados mitocondriais apresentarem tamanhos diferentes (Höfling *et al.*, 1970; Newman & Quicke, 1999a; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a,b; Báó *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2006, 2009; Gracielle *et al.*, 2009).

Em vespas *Idarnes* os derivados mitocondriais iniciam-se juntos e em contato com a base do núcleo, envolvendo completamente o adjunto do centríolo. Estas características os diferem dos outros Chalcidoidea, cujos derivados, embora se iniciem juntos, localizam-se a uma pequena distância do núcleo, abaixo do adjunto do centríolo com formato discóide (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a). Em alguns himenópteros tem-se observado que os derivados mitocondriais iniciam um após o outro, com o primeiro, geralmente o maior, surgindo próximo a base do núcleo e o segundo, com diâmetro menor, próximo ao adjunto do centríolo (Newman & Quicke 1999a; Zama *et al.*, 2001, 2005a,b; Báó *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005; Gracielle *et al.*, 2009; Mancini *et al.*, 2009).

No final do flagelo, estas estruturas podem tanto terminar junto com o axonema, quanto antes dele, em níveis diferentes. Nos casos em que apresentam diâmetros diferentes os derivados de menor área podem terminar primeiro (Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a), ou por último, neste caso, depois que os derivados de maior área terminarem (Brito *et al.*, 2009).

Embora a presença dos corpos acessórios seja considerada uma característica típica dos espermatozóides de Hymenoptera, localizados entre o axonema e os derivados mitocondriais (Wheeler *et al.*, 1990; Newman & Quicke *et al.*, 1999a,b; Zama *et al.*, 2001, 2004, 2005a, 2007; Báó *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Fiorillo *et al.*, 2005; Lino-Neto *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009; Gracielle *et al.*, 2009; Mancini *et al.*, 2009), esta estrutura não ficou evidenciada em vespas *Idarnes*. Assim como nos outros Chalcidoidea, sua presença também não foi relatada em Trichogrammatidae (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a), Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001b), Agaonidae (Fiorillo *et al.*, 2008), Eulophidae (Brito *et al.*, 2009).

6. Conclusões

As análises ultraestruturais dos espermatozóides de *Idarnes* possibilitam concluir que, apesar de apresentarem características básicas observadas para outros Chalcidoidea, tais como o formato contorcido do núcleo e flagelo, também apresentam diferenças significativas, não apenas entre as três espécies (*Idarnes* sp. 1, *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) e *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*), mas também em relação à superfamília a qual pertencem.

(1) O acrossoma com *perforatorium* evidente foi observado apenas em uma espécie, *Idarnes* sp. 3 (grupo *flavicollis*), cujo formato cônico assemelha-se a apenas uma espécie chalcidoide já descrita, *Bephratelloides pomorum*; enquanto que esta estrutura não foi claramente distinguida nas espécies de *Idarnes* sp. 1 e *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*), assim como na maioria dos outros Chalcidoidea;

(2) Outra diferença marcante entre as três espécies estudadas está no revestimento extracelular, uma vez que apenas *Idarnes* sp. 2 (grupo *carne*) apresentou-a. Entretanto, tal estrutura difere dos outros Chalcidoidea tanto no seu comprimento, pois estende-se à região anterior do flagelo, quanto nos filamentos que irradiam-se a partir dele, que não foram observados nesta espécie de *Idarnes*;

(3) O formato alongado do adjunto do centríolo e sua localização entre os derivados mitocondriais são semelhantes para as três espécies analisadas, no entanto, difere grandemente dos outros Chalcidoidea, que apresentam esta estrutura em formato discóide, localizado entre o núcleo e o axonema;

(4) O axonema nas espécies de *Idarnes* inicia-se distante do núcleo, devido ao longo adjunto do centríolo, diferindo das outras espécies chalcidoides, cuja estrutura inicia-se logo abaixo do núcleo, após o curto adjunto do centríolo, discóide;

(5) Os derivados mitocondriais diferem não apenas entre as três espécies, com formatos triangulares e alongados/achatados, como também entre os outros Chalcidoidea que são ovais e apresentam diâmetros diferentes. Outra diferença encontrada nesta estrutura reside no seu início, ou seja, em *Idarnes* os derivados iniciam-se juntos, em contato com a base do núcleo e envolvem completamente o adjunto do centríolo, enquanto que nos outros Chalcidoidea seu início acontece abaixo do adjunto do centríolo, distante do núcleo.

Estas diferenças observadas tanto em nível específico quanto em nível de família, podem fornecer dados que poderão ser utilizados para elucidar dúvidas de taxonomia e filogenia da subfamília Sycophaginae, que ainda é considerada *incerta sedis*. Um estudo filogenético mais detalhado pode posicioná-la em alguma família, ou, ainda, propor uma nova família. Mas, para isto, faz-se necessário o estudo das características espermáticas de outros grupos de vespas de figo, ampliando o número de grupos estudados a fim de compará-los e, assim ajudar a estabelecer relações filogenéticas entre elas.

7. Referências Bibliográficas

- ABDURAHIMAN, U. C. & JOSEPH, K. J. 1978.** Cleptoparasitism of the fig wasps (Torymidae: Chalcidoidea) in *Ficus hispida*. **Entomon**, **3**: 181-186.
- ARAÚJO, V. A.; MOREIRA, J. & LINO-NETO, J. 2009.** Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). **Micron**, **40**: 719-723.
- ARAÚJO, V. A.; ZAMA, U.; DOLDER, H. & LINO-NETO, J. 2005.** Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* MOURE (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, **22**: 137-141.
- ASHMEAD, W. H. 1899.** Classification of the old family Chalcididae. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, **4**: 242-249.
- ASHMEAD, W. H. 1904.** Classification of the chalcid flies. **Memoirs of the Carnegie Museum**, **1**: 225-555.
- BACCETTI, B. 1972.** Insect sperm cell. **Advances in insect physiology**, **9**: 315-397
- BÁO, S. N. 1996.** Spermiogenesis in *Coelomera lanio* (Chrysomelidae: Gallerucinae): ultrastructural and cytochemical studies. In.: JOLIVET, P. H. A & COX, M. L. Chrysomelidae Biology, **General Studies**, **3**: 119-132.
- 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 Submicroscopic Cytology and Pathology**, **36**: 23-28.
- BERG, C. C. 1989.** Classification and distribution of *Ficus*. **Experientia**, **45**: 605-611.
- BOUČEK, Z. 1988.** Australasian Chalcidoidea (Hymenoptera). A Biosystematic Revision of Genera of Fourteen Families, with a Reclassification of Species. CAB International Institute of Entomology. 832p.
- BOUČEK, Z. 1993.** The genera of chalcidoid wasps from *Ficus* fruit in the new world. **Journal of Natural History**, **27**: 173-217.

- BRITO, P., LINO-NETO, J. & DOLDER, H. 2009.** Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). **Tissue and Cell**, **41**: 113-117.
- BRONSTEIN, J. L. 1992.** Seed predator as mutualists: Ecology and evolution of the fig pollinator interaction. In: BERNAYS, E. Insect-Plant Interactions., Ed. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 1-43.
- BUTCHER, F. G. 1964.** The Florida fig wasp, *Secundeisenia Mexicana* (Ashm.), and some of its hymenopterous symbionts. **Florida Ent**, **47**: 235-238.
- CARAUTA, J. P. P. & DIAZ, B. E. 2002.** Figueiras no Brasil. Editora UFRJ, Rio de Janeiro. 211p.
- CARCUPINO, M., PROFILI, G, KATHIRITHAMBY, J. & MAZZINI, M. 1995.** Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). **Mémoires Du Muséum National d'Histoire Naturelle**, **166**: 291-296.
- CONTE, M. ; LINO-NETO, J. ; DOLDER, H.** Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae): fate of the atypical spermatids. *Cariology*, 2005.
- COOK, J. M. & RASPLUS, J. Y. 2003.** Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. **Trends in Ecology and Evolution**, **18**: 241-248.
- DALLAI, R., LOMBARDO B. M., MERCATI D., VANIN S. & LUPETTI P. 2008.** Sperm structure of Limoniidae and their phylogenetic relationship with Tipulidae (Diptera, Nematocera). **Arthropod Structure & Development**, **37**: 81-92.
- ELIAS, L. G. 2005.** Modo de colonização em vespas parasitas do mutualismo figueiras-vespas de figo, com ênfase em espécies do gênero *Idarnes* Walker (Hymenoptera: Chalcidoidea). Monografia, 40p. Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.
- ELIAS, L. G. 2008.** Estratégias de utilização de recursos em vespas parasitas do mutualismo figueira-vespas de figo. Dissertação de Mestrado, 43p. Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

- ELIAS, L. G.; MENEZES JR., A. O. & PEREIRA, R. A. S. 2008.** Colonization sequence of non-pollinating fig wasps associated with *Ficus citrifolia* in Brazil. **Symbiosis**, **45**: 107-111.
- FERREIRA, A. & DOLDER, H. 2003a.** Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia: Squamata). **Acta Histochemica**, **105**: 339-352.
- FERREIRA, A. & DOLDER, H. 2003b.** Sperm ultrastructure and spermatogenesis in the lizard, *Tropidurus itambere*. **Biocell**, **27**: 353-362.
- FIORILLO, B.; COELHO, A. A. M.; LINO-NETO, J. & BÁO, S. N. 2005.** Structure and ultrastructure of the spermatozoa of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). **Journal Submicroscopic Cytology and Pathology**, **37**: 75-81.
- FIORILLO, B. S., LINO-NETO, J. & BÁO, S. N. 2008.** Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). **Micron**, **39**: 1271-1280.
- GORDH, G. 1975.** The comparative external morphology and systematic of the Neotropical parasitic fig wasp genus *Idarnes* (Hymenoptera: Torymidae). **The University of Kansas Science Bulletin**, **50**: 389-455.
- GRACIELLE, I. M. S.; FIORILLO, B. S.; LINO-NETO, J. & BÁO, S. N. 2009.** Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). **Micron**, **40**: 419-425.
- HAMILTON, W. D. 1979.** Wingless and fighting males in fig wasps and other insects. In: BLUM, M. S. & BLUM, N. A. Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects. Eds. London: Academic Press, pp. 167-220.
- HANSON, P. E. & RAMIREZ, W. 1995.** Agaonidae, pp. 273 – 282. In: Hanson, P.E & Gauld, I.D. (eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford Science Publications, Oxford. 898p.
- HÖFLING, M. A. C.; CRUZ LANDIM, C. & KITAJIMA, E. 1970.** The fine structure of spermatozoa from the honeybee. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **42**: 69-78.

- HOGGE, M. A. F. & KING, P. E. 1975.** The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Submicroscopic Cytology**, 7: 81-96.
- JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R. & AFZELIUS, B. A. 1999.** Insects: their spermatozoa and phylogeny. Science publishers, Enfield, New Hampshire, USA. 555p.
- KERDELHUÉ, C. & RASPLUS, J. Y. 1996.** Non-pollinating Afrotropical fig wasps affect the fig-pollinator mutualism in *Ficus* within the subgenus *Sycomorus*. **Oikos**, 75: 3-14.
- KJELLBERG, F.; JOUSSELIN, E.; HOSSAERT-MCKEY, M. & RASPLUS, J. Y. 2005.** Biology, ecology and evolution of fig-pollinating wasps (Chalcidoidea, Agaonidae). In: RAMAN, A.; SCHAEFER, C. W. & WITHERS, T. M. eds. Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Arthropods. Science Publishers Inc., NY, USA, pp. 539-571.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. & DOLDER, H. 1999.** Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, 28: 253-259.
- LINO-NETO, J.; BÁO, S. N. & DOLDER, H. 2000a.** Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatma and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Zoologica**, 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.
- LINO-NETO, J. & DOLDER, H. 2001a.** Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). **Acta Zoologica**, 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.; DOLDER, H.; MANCINI, K.; MERCATI, D. & DALLAI, R. 2008.** The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: Symphyta). **Tissue & Cell, 40:** 185-193.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L. A. O & DOLDER, H. 2006.** Sperm ultrastructure of the wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). **Insects Sociaux, 53:** 333-338.
- MANCINI, K.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. & DALLAI, R. 2009.** Sperm ultrastructure of the European hornet *Vespa crabro* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Vespidae). **Arthropod Structure & Development, 38:** 54-59.
- MAYR, G. 1885.** Feigeninsekten [Hymenoptera]. **Verhandlungender k. k. zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien, 35:** 147-250.
- MÜLLER, F. 1886.** Notes on fig insects. **Transactions of the Entomological Society (London).** p. x-xiii.
- NEWMAN, T. M. & QUICKE, D. L. J. 1998.** Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). **Journal of Hymenoptera Research, 7:** 25-37.
- NEWMAN, T. M. & QUICKE, D. L. J. 1999a.** Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). **Journal of Hymenoptera Research, 8:** 197-203.
- NEWMAN, T. M. & QUICKE, D. L. J. 1999b.** Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). **Journal of Hymenoptera Research, 8:** 35-47.
- PEREIRA, R. A. S., LINO-NETO J. & PRADO A. P. 2008.** Sperm morphology: A novel way to associate female-males of highly sexual dimorphic fig wasp species. **Symbiosis (Philadelphia), 45:** 143-147.

- PEREIRA, R. A. S. & PRADO, A. P. 2005.** Recognition of competitive asymmetries reduces the severity of fighting in male *Idarnes* fig wasps. **Animal Behaviour**, **70**: 249-256.
- PEREIRA, R. A. S.; SEMIR J. & MENEZES JR., A. O. 2000.** Pollination and other biotic interactions in figs of *Ficus eximia* Schott (Moraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, **23**: 217-224.
- PEREIRA, R. A. S.; TEIXEIRA, S. P. & KJELLBERG, F. 2007.** An inquiline fig-wasp using seeds as a resource for small male production: a potential first step for the evolution of new feeding habits?. **Biological Journal of the Linnean Society**, **92**: 9-17.
- 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.
- RASPLUS, J-Y.; KERDELHUÉ, C.; LE CLAINCHE, I.; MONDOR, G. 1998.** Molecular phylogeny of fig wasps Agaonidae are not monophyletic. **Academy of Sciences of the Czech Republic**, **321**: 517 – 527.
- SCHIFFLER, G. 2002.** Fig Wasps (Hymenoptera, Agaonidae) Associated to *Ficus mexiae* Standl (Moraceae) in Lavras, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, **31**: 653-655.
- TAFFAREL, M. & ESPONDA, P. 1980.** Fine structural cytochemistry of the centriolar adjunct in Grasshopper spermatids. **Mikroskope (Wien)** **36**: 35 – 42.
- VERKERKE, W. 1989.** Structure and function of the fig. **Experientia**, **45**: 612-622.
- WEIBLEN, G. D. 2002.** How to be a fig wasp. **Annual Review of Entomology**, **47**: 299-330.
- WEST, S. A.; HERRE, E. A.; WINDSOR, D. M. & GREEN, P. R. S. 1996.** The ecology and evolution of the New World non-pollinating fig wasp communities. **Journal of Biogeography**, **23**: 447-458.

- 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 Hymenoptera *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, **7**: 609-619.
- WOLCOTT, G. N. 1951.** The insects of Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, **32**: 749-882.
- YU, D. W. 2001.** Parasites of mutualisms. **Biological Journal of the Linnean Society**, **72**: 529-546.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J. & DOLDER, H. 2001.** Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). **Journal of Hymenoptera Research**, **10**: 261-270.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J. & DOLDER, H. 2004.** 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). **Insects 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 Submicroscopic 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. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. **Arthropod Structure & Development**, **36**: 304-316.