

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MÔNICA CONTE

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRA-ESTRUTURAL DA
ESPERMATOGÊNESE DE *MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIoidES*
(HYMENOPTERA: APIDAE)”**

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

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C767c **Conte, Mônica**
Caracterização estrutural e ultra-estrutural da espermatogênese de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: apidae) / Mônica Conte. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Mary Anne Heidi Dolder

Co-orientador: José Lino Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Espermatogênese. 2. Abelha. 3. Hymenoptero. I. Dolder, Mary Anne Heidi.
II. Lino Neto, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 17 de fevereiro de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)

Assinatura

Profa.Dra. Irani Quagio-Grassiotto

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Nogueira Neto

Assinatura

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Assinatura

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, co-orientação do Prof. Dr. José Lino Neto, e com o patrocínio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICO ESTE TRABALHO
A MEUS MELHORES AMIGOS
ELENI E ANTONIO.

De tudo ficaram três coisas:
...A certeza de que estamos
sempre começando;
...A certeza de que é preciso continuar;
...A certeza de que podemos
ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção
um novo caminho;
Da queda
um passo de dança;
Do medo
uma escada;
Do sonho
uma ponte;
E da procura...
...Um encontro.

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Gustavo, pela cumplicidade, pelas palavras certas nas minhas horas difíceis, pelas nossas longas conversas ao telefone, nossos ótimos finais de semanas, sempre tão curtos... Enfim, pela infinita compreensão e amor.

Aos meus pais, meus anjos aqui na Terra, pelo incentivo absoluto, e principalmente pela total confiança e amor.

Nona: obrigada pelas conversas nos finais de semana acompanhada por muitos docinhos e mimos. Obrigada por se orgulhar e acreditar em mim.

Aos meus irmãos Márcio, Renato, Ana Paula e Regiane, pela companhia, almoços e telefonemas de incentivo. E obrigada Aline, minha amiguinha!

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado profa. Heidi, pela orientação, por tudo que aprendi com você, pela amizade, e principalmente pela paciência com minha falta de paciência.

Ao prof. Lino, pela co-orientação, e pela experiência e sabedoria que compartilhou comigo.

Aos professores e funcionários da UFV-MG, pela atenção e colaboração.

Ao prof. Dr. Paulo Nogueira Neto, pelas pupas cedidas de seus meliponários, e pela simpatia e atenção de todos os funcionários da Fazenda São Quirino.

À Antônia, Adriane, Loló e Cidinha, da microscopia eletrônica, pela atenção, conversa, chazinho no fim da tarde, enfim, pela grande ajuda com meus cortes, fotos...

A Karina, Adelina e Uyrá pelas dicas e ajuda neste trabalho.

Aos professores e alunos da Biologia Celular pela convivência.

Líliam, desde minha matrícula até minha defesa, obrigada por tudo!!

As minhas amigas Raquel, Luciana, Liliana, Kelly, Samantha, pelos nossos almoços na Química, e principalmente pelo apoio.

Aos meus amigos Sérgio, Naila, Chico, Estela, Paulo e André, pelas risadas, almoços no "bandex", bolos trufados da feirinha, pela conversa... Foi tudo de bom!!!

Ao meu amigo Laércio pelas longas conversas, desabafos, nossos cafés no Belo, e principalmente pela confiança.

A Fernanda, minha amiga, companheira e vizinha, por tudo que passamos juntas: o nosso "perrenque" (é assim que escreve?), academia, feirinha, almoços, jantares, centros, alegrias, tristezas, ansiedades... tudo compartilhado! Obrigada por essa grande amizade!!!

I-Resumo.....	10
II-Abstract.....	11
III-Introdução.....	12
1. MEIOSE.....	13
2. MEIOSE NOS HYMENOPTERA.....	14
3. ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATOZÓIDES DOS HYMENOPTERA.....	15
4. ESPERMATOZÓIDES DOS MELIPONÍDEOS.....	17
5. CONHECIMENTO DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES PARA ESTUDOS FILOGENÉTICOS EM HYMENOPTERA.....	18
IV-Objetivos.....	19
V-Material e métodos.....	20
1. MICROSCOPIA DE LUZ.....	20
2. MICROSCOPIA ELTRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	21
3. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS BÁSICAS.....	21
VI-Referências Bibliográficas.....	22
VII-Artigo.....	27
“SOME STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF <i>MELIPONA</i> <i>QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES</i> (HYMENOPTERA: APIDAE) SPERMATOGENESIS.”	
VIII-Artigo.....	46
"ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF MITOCHONDRIA AND CENTRIOLAR ADJUNCT IN EARLY SPERMIOGENESIS OF <i>MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES</i> (HYMENOPTERA: APIDAE)."	
IX-Conclusões.....	59

I- Resumo

Os Hymenoptera constituem uma das quatro maiores ordens de insetos. Na superfamília dos Aculeata (abelhas, formigas e vespas), as abelhas constituem o grupo mais importante de polinizadores, sendo essenciais à manutenção da diversidade das plantas angiospermas. Os machos dessa ordem são tipicamente haplóides, existindo uma modificação da divisão meiótica no testículo para formar espermatozóides funcionais. Nas abelhas, ao final da segunda divisão meiótica formam-se duas células haplóides com conteúdo citoplasmático desigual. Neste trabalho, o destino das células com quantidade reduzida de citoplasma e organelas foi investigado durante a espermatogênese, assim como foram caracterizados alguns aspectos da formação dos derivados mitocondriais e adjunto do centríolo nas espermátides de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, através das microscopias de luz e eletrônica de transmissão (MET) convencionais e utilizando técnicas citoquímicas como E-PTA e DAPI. Ultraestruturalmente, foi possível visualizar núcleos com cromatina condensada, indicando maior compactação, e portanto, núcleos aparentemente menos ativos que aqueles das células com citoplasma abundante. A observação de grande quantidade de núcleos E-PTA positivos em degeneração dentro das células císticas dos testículos é mais uma evidência a favor da hipótese da degeneração das células espermáticas com citoplasma residual, indicando que essas células não se tornarão espermatozóides. Durante este estudo, foi possível analisar o adjunto do centríolo no início de seu desenvolvimento quando é pouco compacto e E-PTA positivo, o que indica a presença de proteínas básicas. Os dois derivados mitocondriais presentes em *Melipona quadrifasciata anthidioides* são E-PTA negativos, e o desenvolvimento do derivado menor é retardado em relação ao maior, já que o derivado menor precisa ser deslocado para sua nova posição abaixo do adjunto do centríolo após seu desenvolvimento. Em seguida, o derivado mitocondrial menor se alonga e torna-se mais denso. Os dados deste trabalho deverão contribuir para a melhor compreensão da espermatogênese de meliponídeos e apídeos em geral.

II- Abstract

The Hymenoptera constitute one of the four largest orders of insects. In the super-family of the Aculeata, the bees are the most important group of angiosperm pollinators. The males of this order are haploid, and therefore changes have been made in the meiotic division, occurring in the testis, so as to form functional spermatozoa. In bees there is some doubt in relation to the development of the cells with a small amount of cytoplasm and organelles, and it has been suggested that spermatids without mitochondria and Golgi apparatus cannot develop into spermatozoa. In this study, the destiny of the cells with a reduced amount of cytoplasm and organelles was investigated during the spermatogenesis. Also, some aspects of the formation of mitochondrial derivatives and centriolar adjunct in the spermatids of *Melipona quadrifasciata anthidioides* were characterized, using light and electronic microscopes and using cytochemical methods such as E-PTA and DAPI. Ultrastructurally, condensed chromatin was observed, indicating a higher compaction and probably less active nuclei in the cells with very little cytoplasm when compared to other spermatids. The observation of many E-PTA positive nuclei in degeneration inside the cystic cells is another evidence supporting the hypothesis of degeneration of the spermatid cells with residual cytoplasm, indicating that these nuclei do not become spermatozoa. Some aspects of the formation of the centriolar adjunct and mitochondrial derivatives during spermatogenesis have been described by other authors. This study showed the centriolar adjunct as an initially loosely aggregated structure, positive to the E-PTA technique, which indicates the presence of basic proteins. This structure connects the nucleus, axoneme and the derivatives. Both mitochondrial derivatives, present in *Melipona quadrifasciata anthidioides*, are negative for E-PTA at this stage, and are found below the nucleus, parallel to the axoneme. The smaller derivative develops later, after the larger one, so that the smaller can be dislocated to a new position below the fully developed centriolar adjunct. The smaller derivative then elongates and condenses. The data of this study are a contribution to a better understanding of spermatogenesis in Meliponina and Apidae in general.

III- Introdução

Os Hymenoptera constituem uma das quatro maiores ordens de insetos. Eles são divididos nas subordens Symphyta e Apocrita (LaSalle & Gauld, 1992). Os Symphyta, incluem os chamados “sawflies” e “woodwasps” (Hanson & Gauld, 1995a). Os Apocrita contém a grande maioria das espécies e são, ainda, divididos em Aculeata e Parasitica. Em Aculeata encontram-se as abelhas, formigas e vespas, compreendendo 45% das espécies descritas (Gaston, 1991), e é considerada a subordem mais derivada entre os Hymenoptera. Nos Aculeata o ovipositor foi modificado em ferrão. A subordem Parasitica é definida como sendo formada por todos os Apocrita que não tiveram o ovipositor modificado em ferrão incluindo Stephanoidea, Trigonalioidea, Megalyroidea, Ceraphronoidea, Evanioidea, Ichneumonoidea, Proctotrupeoidea, Cynipoidea, e Chalcidoidea (Hanson & Gauld, 1995a). O comportamento social alcançou seu auge na ordem Hymenoptera. Nos insetos, com exceção dos Isoptera, a eusociabilidade está presente apenas nos Hymenoptera. Contudo, somente nesta ordem existem famílias (abelhas e vespas) que exibem todas as gradações de organização social, de solitária a eusocial avançada (Noll, 2002; Chavarría & Carpenter, 1994).

Dentre os Aculeata, as abelhas (subfamília Apinae) constituem o grupo mais importante de polinizadores, sendo absolutamente essenciais à manutenção da diversidade das plantas angiospermas (Hanson, & Gauld 1995b). Qualquer redução na diversidade destes insetos causará seguramente um impacto ambiental pelo desaparecimento de várias espécies vegetais. Entretanto, impacto mais direto ocorrerá sobre a alimentação humana, pois aproximadamente 30% desta depende direto ou indiretamente da polinização pelas abelhas (O’Toole, 1992).

Devido a todas essas importantes características, as abelhas estão entre os insetos mais bem estudados, quanto à sua fisiologia e comportamento. Entretanto, ainda há muito para se conhecer sobre estes insetos, até mesmo com respeito à sua biologia reprodutiva.

Atualmente a família dos Apidae curbiculados - chamados assim devido a uma estrutura denominada de curbícula, existente nas tíbias das fêmeas operárias com função de coleta de pólen - (Noll, 2000), está classificada na tribo Apini, a qual compreende Apina,

Meliponina, Euglossina e Bombina (<http://museums.org.za/bio/insects/hymenoptera/>; Noll, 2000; Hanson & Gauld, 1995a). As abelhas da tribo Meliponini são conhecidas por abelhas nativas sem ferrão, pois possuem o ferrão atrofiado (stingless bees) (Michener, 1990, 2000). Elas ocorrem na América do Sul, América Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África. As espécies do gênero *Melipona* são encontradas exclusivamente na América do Sul, Central e Ilhas do Caribe (<http://ufv.br/dgb/bee>).

As fêmeas da tribo Meliponini realizam a postura dos ovos, que darão origem às larvas que sofrem quatro mudas e se transformam em pupas, estas não se alimentam e ficam imóveis nas células de cria. Essas células são agrupadas formando os favos, que em *Melipona*, são dispostos em forma de discos empilhados e espiralados (<http://ufv.br/dgb/bee>; Nogueira-Neto, 1970). De um modo geral há uma tendência dos machos emergirem das células na região central dos favos e as rainhas das células da periferia dos favos (Bezerra, 1995). Os machos são produzidos em grande número em algumas épocas do ano, e realizam a função de fecundar a rainha durante o vôo nupcial. Normalmente, os machos são expulsos da colônia depois de terminado seu desenvolvimento (Michener, 1946 *apud* Kerr *et al.*, 1996).

1. Meiose

A reprodução sexuada que ocorre nos organismos eucariotos envolve uma forma especializada de divisão celular chamada de meiose, a qual, diferente da mitose, tem o número de cromossomos reduzido à metade nas células filhas (John, 1972). Esse processo consiste de duas divisões sucessivas do núcleo sem duplicação dos cromossomos entre elas, resultando em quatro células-filhas e na redução do número diplóide para haplóide. A meiose é importante para a formação dos gametas - haplóides - que se fundem e formam um zigoto diplóide com número de cromossomos igual à célula parental, mantendo o número de cromossomos da espécie (Farah, 2000).

2. Meiose nos Hymenoptera

Nos Hymenoptera o sexo é determinado pelo sistema haplo-diploidia e regulado por alelos sexuais. Segundo este modelo, os óvulos fertilizados e portanto diplóides, darão origem às fêmeas, enquanto que os não fertilizados, haplóides, aos machos. Estas características conceituam a partenogênese arrenótoca (Hanson & Gauld, 1995a). Portanto, a haploidia é a condição típica dos machos e em decorrência deste fato, existe uma grande alteração no processo de espermatogênese para que a ploidia não seja reduzida à metade na meiose, como ocorre tipicamente nos organismos diplóides (Cruz-Landim & Beig, 1980a). A espermatogênese em Hymenoptera, ou pelo menos alguns aspectos deste processo, foi descrita em *Scaptotrigona postica* (Cruz-Landim & Beig, 1980b), *Nasonia vitripennis* (Pteromalidae) (Hooge & King, 1975), *Apis mellifera* (Meves, 1903, 1907; Sanderson & Hall, 1948; Sharma, 1961), em vespas (Meves & Duesberg, 1908) e em machos diplóides de *Apis mellifera* (Woyke & Skowronek, 1974).

De um modo geral, a espermatogênese nos Hymenoptera é caracterizada por uma primeira divisão meiótica abortiva e pela segunda divisão, semelhante àquela que ocorre na meiose tradicional. Durante a primeira divisão meiótica anômala não ocorre a desorganização do envoltório nuclear e o fuso citoplasmático quando se forma, desloca o núcleo intacto, separando-o de uma região exclusiva de citoplasma. Nesta região, ocorre a formação de uma vesícula ou broto citoplasmático, que elimina pequeno conteúdo citoplasmático, enquanto que o material nuclear permanece duplicado (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b). Na segunda divisão meiótica, o envoltório nuclear é desestruturado e o fuso citoplasmático é formado, separando, em seguida, os cromossomos duplicados. Desta forma, tem-se uma divisão equivalente do conteúdo nuclear para as duas espermátides que são haplóides. Portanto, não ocorrendo a primeira divisão meiótica tradicional, a formação dos gametas fica precedida apenas da segunda divisão durante a qual o material genético é distribuído equitativamente para as duas células formadas. Entretanto, nas abelhas a distribuição do conteúdo citoplasmático é bastante desigual, de forma que uma das espermátides praticamente não possui esse material (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b). Cruz-Landim & Silva de Moraes (1980) e Cruz-Landim *et al.*, (1980) demonstraram, com

microscopia eletrônica, que a “célula menor geralmente possui apenas o núcleo e poucos ribossomos, faltando as demais organelas citoplasmáticas”.

Hachiohe & Onishi (1952) propuseram que essas células menores sejam inviáveis. Já Kerr & Silveira (1974), considerando o número de espermatozóides formados por cisto testicular, acreditaram que as duas espermátides originassem espermatozóides. Em abelhas, como na maioria dos insetos, todos os espermatozóides possuem dois longos derivados mitocondriais e o axonema no flagelo (Baccetti, 1972; Dallai, 1979; Lino-Neto & Dolder, 2001a; Wilkes & Lee, 1965; Zama *et al.*, 2001). Também, nos espermatozóides desses insetos, como na maioria dos animais, há uma grande transformação do núcleo com acrossomo anterior, cuja formação depende do retículo endoplasmático e complexo de Golgi presentes na espermátide. Portanto, a princípio, parece ser improvável que espermátides sem mitocôndrias e complexo de Golgi possam se diferenciar em espermatozóides típicos, como aqueles encontrados também nas abelhas.

3. Ultra-estrutura dos espermatozóides dos Hymenoptera

Na maioria dos insetos, o núcleo é unido ao flagelo pelo adjunto do centríolo (Lino-Neto & Dolder, 2002). Esta estrutura composta por substância difusa (Dallai, 2003), foi recentemente descrita em espermatozóides de Hymenoptera (Wheeler *et al.*, 1990; Newman & Quicke, 1998, 1999a,b; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a,b; Lino-Neto & Dolder, 2001a). Sua função não está bem estabelecida, mas foi considerado por Gatenby & Tahmisian (1959 *apud* Jamieson, 1987) que seria de fixar estruturas, como as extremidades anteriores dos derivados mitocondriais, e também para amortecer os movimentos flagelares. Sobre a sua origem, também pouco se sabe (Baccetti, 1972). Lino-Neto *et al.*, (2000a) observaram que o adjunto do centríolo no espermatozóide de *Apis mellifera* é longo, medindo cerca de 30 μm , e em preparações com E-PTA ele aparece eletrondenso.

O adjunto do centríolo foi chamado de corpo denso triangular (Jamieson, 1987). Vários outros autores como Cantacuzène (1970 *apud* Lino-Neto *et al.*, 2000b). Fawcett *et al.* (1970), Lindsey & Biesele (1974a, b *apud* Cruz-Landim *et al.*, 1981), Yasuzumi (1974, *apud* Cruz-Landim e Beig, 1980a) e Cruz-Landim *et al.* (1980, 1981) relacionaram o

destino de um material eletrondenso de origem nuclear à formação do adjunto do centríolo presente em alguns insetos. Lindsey & Biesele (1974a *apud* Cruz-Landim *et al.*, 1981) afirmaram ainda, que o adjunto do centríolo pode ser formado pela coalescência de ribossomos que se desprendem do retículo.

Uma outra estrutura - o derivado mitocondrial - também é bastante discutida por diversos autores. De acordo com Baccetti (1969) e Cruz-Landim & Silva de Moraes (1980), as mitocôndrias presentes no citoplasma das espermátides jovens se agregam próximo ao núcleo, formando uma única peça, chamada de Nebenkern, onde anéis de mitocôndrias são conectados formando um labirinto. As mudanças ocorridas durante a diferenciação do Nebenkern sugerem que há modificações qualitativas na estrutura submicroscópica, na composição química e/ou na fisiologia das mitocôndrias (Kaye, 1958 *apud* Baccetti, 1970). Numa fase posterior, essa estrutura se divide em duas porções, que se tornam alongadas e ladeiam o axonema ao longo do flagelo, e passam a ser chamadas de derivados mitocondriais (Cruz-landim & Beig, 1979a *apud* Jamieson, 1987).

Em abelhas, esses derivados mitocondriais possuem diâmetros desiguais e, em geral, apresentam material cristalizado em um dos derivados, provavelmente de natureza protéica (Cruz-Landim & Beig, 1979 *apud* Jamieson, 1987), diferente de alguns outros Hymenoptera em que os dois derivados têm praticamente diâmetros iguais, e há presença de material paracristalino em ambos derivados (Lino-Neto & Dolder, 2002). Em muitas espécies de vespas parasíticas, os dois derivados são de igual diâmetro, e normalmente não mostram material paracristalino (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001a).

De acordo com André (1965 *apud* Baccetti, 1970), o espermatozóide (com esse material paracristalino nos derivados mitocondriais) ainda é efetivo em transformar energia, uma vez que o conjunto de citocromos ainda está presente nesses derivados - dados obtidos por espectrofotometria. Atividades enzimáticas detectadas citoquimicamente foram mostradas por Anderson & Persone (1968 *apud* Baccetti, 1970).

4. O espermatozóide dos meliponídeos

Na maioria dos Aculeata, os espermatozóides têm de 150 a 240 μm de comprimento, são relativamente uniformes na aparência geral, apresentam cauda longa, cabeça claramente definida e um acrossomo (Quicke, 1992). Nos meliponídeos, a estrutura dos espermatozóides corresponde à descrição para a maioria dos Hymenoptera, entretanto apresentam várias modificações nos diferentes grupos, o que fornece características que podem ser úteis para estudos de taxonomia, sistemática, filogenia e biologia reprodutiva (Zama *et al.*, 2003). Nos Meliponina, de acordo com Zama *et al.* (2003), o comprimento do núcleo é, em média, 7,7 μm , o do acrossomo 1,6 μm e o comprimento total do espermatozóide varia de 80 a 300 μm .

Os primeiros trabalhos ultra-estruturais em Apidae descrevem os espermatozóides de *Apis mellifera lingustica* e *Apis mellifera adansonii*, e mostram a existência de dois derivados mitocondriais facilmente identificáveis, que acompanham paralelamente o axonema ao longo de quase todo o flagelo, com cerca de 200 μm e apresentam o acrossomo menos denso que o núcleo (Cruz Höfling *et al.*, 1970).

Em *Apis mellifera* o flagelo começa posterior ao núcleo (Cruz-Höfling *et al.*, 1970), e consiste no axonema, um adjunto do centríolo, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios, envolvidos pela membrana plasmática. O axonema segue um padrão para os insetos no típico arranjo 9+9+2 de microtúbulos, como foi visto em outros Hymenoptera (Lino-Neto *et al.*, 2000a).

5. Conhecimento da morfologia dos espermatozóides para estudos filogenéticos em Hymenoptera

Além de contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva, estudos dos espermatozóides têm sido usados como contribuição para estudos de filogenia (Lino-Neto & Dolder, 2001b). Controvérsias ainda existem sobre a sistemática evolutiva dos Hymenoptera, particularmente dos Aculeata (Rasnitsyn, 1988; Gauld & Bolton, 1988; Dowton & Austin, 1994; Dowton *et al.*, 1997; Ronquist *et al.*, 1999). É muito provável que algumas dessas dúvidas poderão ser resolvidas com análise conjunta de dados moleculares e morfológicos, incluindo nestes, novos caracteres, especialmente aqueles que são menos suscetíveis às alterações ambientais, como os espermatozóides. Portanto, características específicas de uma subordem como a divisão meiótica assimétrica que não ocorre em todos os Aculeata poderá constituir um ótimo indicador filogenético.

IV- Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral contribuir com novas informações a respeito da estrutura e ultraestrutura da espermatogênese da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* procurando aumentar os dados sobre o processo de formação dos seus gametas.

Os objetivos específicos foram verificar o destino das espermátides carentes de citoplasma resultantes do processo meiótico e caracterizar alguns aspectos da formação inicial dos derivados mitocondriais e do adjunto do centríolo, presentes nos espermatozóides.

V- Material e Métodos

Pupas de machos de *M. quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) foram obtidos a partir de ninhos mantidos no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, e dos meliponários da fazenda São Quirino em Campinas, São Paulo, mantidos pelo Prof. Dr. Paulo Nogueira Neto.

1. Microscopia de Luz:

1.1. Esmagamento para observação em contraste de fase

Testículos de pupas foram dissecados em solução fisiológica de Ringer e transferidos para orceína lacto-acética 1% por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, o material foi colocado sobre lâmina de vidro e dissociado em ácido acético 45% com auxílio de estiletes. Após a dissociação, o material foi coberto com lamínula, procedendo-se ao esmagamento a documentação em fotomicroscópio Olympus BX - 60, com contraste de fase.

1.2. Estrutura convencional

Cortes semi-finos foram obtidos dos blocos preparados para a microscopia eletrônica (ver item 2), e corados com azul de toluidina a 1% em NaCo₃ a 0,5% e fotografados em microscópio Olympus BX - 60

1.3. Fluorescência com DAPI

Para visualização de núcleos, os testículos foram fixados em etanol ácido acético (3:1) e etanol 70%, e em seguida submetidos ao esmagamento. As lâminas foram submetidas a 15 minutos de coloração com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml. Posteriormente foram lavadas com jato forte de água, e transferidas para tampão McIlvaine com pH 7,0 por 1 minuto. Após secarem foram montadas em sacarose 50%. Estas lâminas

foram examinadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60, equipado com filtro BP360-370 nm.

2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Testículos de pupas foram dissecados e fixados por 4 horas em solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2 acrescido de sacarose 1,5%, ácido pícrico 0,2% e cloreto de cálcio 5 mM. Após lavar por 1-2 h, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% no mesmo tampão cacodilato. A desidratação foi feita em uma série crescente de acetona e a inclusão em Epon 812. Os cortes ultrafinos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,2% em solução de hidróxido do sódio 1N, e analisados ao microscópio de transmissão Leo 906 - Carl Zeiss.

3. Detecção de proteínas básicas com EPTA

Para detecção de proteínas básicas, os testículos de pupas foram submetidos à primeira fixação em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M em pH 7,2 acrescido de sacarose 1,5%, ácido pícrico 0,2% e cloreto de cálcio 5mM. Procedeu-se à desidratação gradual em etanol e ao final desta foi adicionado 1% ácido fosfotúngstico em etanol 100% (EPTA) por duas horas. O material foi lavado em álcool, transferido para acetona, incluído em Epon 812, cortado e analisado ao MET Leo 906 - Carl Zeiss, sem contrastação.

VI- Referências Bibliográficas

- BACCETTI, B.; DALLAI, R.; ROSATI, F. The spermatozoon of Arthropoda III. The lowest holometabolic insects. J. Microsc., v.8, p.233-248. 1969.
- BACCETTI, B. Comparative Spermatology. Proceedings of the International Symposium, held in Rome e Siena. Accademia Nazionale dei Lincei, Rome. 1970.
- BACCETTI, B. Insect sperm cell. Adv. Ins. Physiol., v.9, p.315-397. 1972.
- BEZERRA, J.M.D. Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). in Tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 65pp.1995.
- BIODIVERSITY EXPLORER. **Order: Hymenoptera** (sawflies, wasps, bees and ants). <<http://museums.org.za/bio/insects/hymneoptera>> acesso em 09 de janeiro de 2004.
- CHAVARRÍA, G.; CARPENTER, J.M. "Total evidence" and the evolution of highly social bees. Cladistics, v.10, p.229-258. 1994.
- CRUZ-HÖFLING, M.A.; CRUZ-LANDIM, C.; KITAJIMA, E. W. The fine structure of spermatozoa from the honeybee. Anais Acad. Bras. Cien., v.42, p. 69-78. 1970.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M.; BEIG, D. Caracterização de material eletrondenso de origem nuclear, durante a espermiogênese de abelhas (Hymenoptera, Apidae). Rev. Bras. Biol., v.41, n.2, p.421-426. 1981.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M. Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. Cytobios, v.27, p. 167-175. 1980.
- CRUZ-LANDIM C.; BEIG, D.; SILVA DE MORAES, R.L.M. Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). Caryologia, v.33, n.1, p.1-15. 1980.
- CRUZ-LANDIM, C.; BEIG, D. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Intern. J. Invert. Reprod., v.2, p.271-283. 1980a.
- CRUZ-LANDIM, C.; BEIG, D. Meiose nos Hymenoptera. Cien. Cult., v. 33, p. 937-966. 1980b.

- DALLAI, R. An overview of atypical spermatozoa in insects. In the Spermatozoon, eds. W. Fawcett & Bedford, p. 253-256. Urban and Schwarzenberg, Baltimore. 1979.
- DALLAI, R.; BEANI, L.; KATHIRITHAMBY, P.; LUPETTI, P.; AFZELIUS, B.A. New findings on sperm ultrastructure of *Xenus vesparum* (Rossi) (Strepsiptera, Insecta). Tissue & Cell, v.35, p.19-27. 2003.
- DOWTON, M.; AUSTIN, A. D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 91, p. 9911-9915. 1994.
- DOWTON, M.; AUSTIN, A. D.; DILLON, N.; BARTOWSKY, E. Molecular phylogeny of the apocritan wasps: the Proctotrupomorpha and Evaniomorpha. System. Entomol., v. 22, p. 245-255.1997.
- FARAH, S.B. DNA: segredos e mistérios. Sarvier: São Paulo. 2000. 276pp.
- FAWCETT, D.W.; PHILLIPS, D.M. Recent observations on the ultrastructure and development of the mammalian spermatozoon. In: B. Baccetti, ed. Comparative spermatology. Academic Press, New York, p.13-28. 1970.
- GASTON, K. J. The magnitude of global insect species richness. Conserv. Biol., v.5, p. 283-296. 1991.
- GAULD, I. D.; BOLTON, B. The Hymenoptera. Oxford: Oxford University Press. 1988.
- HACHIOHE, K.; ONISHI, A. On the meiosis of the drone of honey bee (*Apis mellifera*). Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., G3, p.83-87. 1952.
- HANSON, P. E.; GAULD, I.D. The evolution, classification and identification of the Hymenoptera. In P.E. Hanson & I.D. Gauld (Eds) The Hymenoptera of Costa Rica, p.138-156. New York: Oxford University Press. 1995a.
- HANSON, P.E.; GAULD, I.D. Economic importance of Hymenoptera. In P.E. Hanson & I.D. Gauld (Eds) The Hymenoptera of Costa Rica, p. 89-100. New York: Oxford University Press. 1995b.
- HOGGE, M.A.F.; KING, P.E. The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Submi. Cytol., v.7, p.81-96. 1975.
- JAMIESON, B.G.M. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press. Cambridge. 1987.
- JOHN, B. Meiosis. Developmental and Cell Biology. Cambridge University Press: New York, Australia.1972. 396pp.

- KERR, W.E.; SILVEIRA, V. A note on the formation of honeybee spermatozoa. J. Apicul. Res., v.13, p. 121-126. 1974.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. Abelha Uruçu - Biologia, manejo e conservação. Coleção Manejo da vida silvestre. n.2. Fundação Acungau, Belo Horizonte. 144pp. 1996.
- LASALLE, J.; GAULD, I. D. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In Hymenoptera and Biodiversity, eds. J. LaSalle and I.D. Gauld, p. 1-26. C.A.B International, UK. 1992.
- LINO-NETO, J.; BÃO, S.N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). Int. J. Insect. Morphol. Embryol., v.28, p.253-259. 1999.
- LINO-NETO, J.; BÃO, S.N.; DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. Tissue & Cell, v.32, p.322-327. 2000a.
- LINO-NETO, J.; BÃO, S.N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Acta Zool. (Stockh.), v.81, p.205-211. 2000b.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). Acta Zool. (Stockh.), v. 82, p.159-164. 2001a.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. Zool. Scr., v.30, n.1, p.89-96. 2001b.
- LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). Tissue & Cell, v.34, n.2, p.124-128. 2002.
- MEVES, F. Über "Richtungskörper bildung" in Hoden von Hymenoptera. Anat. Anz., v.24, n.1, p.29-32. 1903.
- MEVES, F. Die Spermatocyteilungen bei der Honigbiene, *Apis mellifera* L., nebst Bemerkungen über Chromatinreduction. Arch. Mikros. Anat., v.70, n.3, and p.414-419. 1907.
- MEVES, F.; DUESBERG, J. Die Spermatocyteilungen bei der Hornisse *Vespa crabro*. Arch. Mikros. Anat., v.71, p.571-587. 1908.

- MICHENER, C.D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). Univ. Kans. Sci. Bull., v.54, p.75-164. 1990.
- MICHENER, C.D. The bees of the world. Johns Hopkins Univ. press, Baltimore, MA. 2000.
- NEWMAN, T.M.; QUICKE, D. L. J. Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). J. Hym. Res., v.7, p.25-37. 1998.
- NEWMAN, T.M.; QUICKE, D. L. J. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). J. Hym. Res., v.8, p.35-47. 1999a.
- NEWMAN, T.M.; QUICKE, D. L. J. Ultrastructure of spermatozoa in Leptopilina (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). J. Hym. Res., v.8, p.197-203. 1999b.
- NOGUEIRA-NETO, P. A criação de abelhas indígenas sem ferrão: (Meliponinae). Chácara e quintais: São Paulo. 365pp. 1970.
- NOLL, F.B. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera: Apinae), with special reference to social behavior. Cladistics, v.18, p.137-153. 2002.
- O'TOOLE, C. Diversity of native bees and agroecosystems. In Hymenoptera and Biodiversity, eds. J. LaSalle and I.D. Gauld, C.A.B International, UK, p. 277-293. 1992.
- QUICKE, D.L.J.; INGRAM, S.N.; BAILLIE, H.S.; GAITENS, P.V. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). Zool. Scr., v.21, p.381-402. 1992.
- RASNITSYN, A. P. An outline of evolution of the hymenopterous insects (Order Vespida). Orien. Ins., v.22, p.115-145. 1988.
- RONQUIST, F.; RASNITSYN, A.P.; ROY, A.; ERIKSSON, K.; LINDGREN, M. Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. Zool. Scr., v. 28, p.13-50. 1999.
- SANDERSON, A. R.; HALL, D.W. The cytology of honeybee *Apis mellifera* L. Nature, v.162 (4105), p. 34-35. 1948.
- SHARMA, G. P.; GUPTA, B.L.; KUMBKARNI, C. G. Cytology of spermatogenesis in the honey bee, *Apis mellifera* (F.). J. Royal Micros., v.79, p.337-351. 1961.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Apiário Central.** Abelhas sem ferrão: Biologia/características gerais. < <http://ufv.br/Dgb/bee>> acesso em 07 de agosto de 2003.

- WHEELER, D. E.; CRICHTON, E.D.; KRUTZSCH, P.H. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). J. Morph., v.206,p.343-350. 1990.
- WILKES, A.; LEE P. E. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in hymenopteran *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). Can. J. Gen. Cytol., v.7, p.609-619. 1965.
- WOYKE, J.; SKOWRONEK, W. Spermatogenesis in diploid drones of the honey bee. J. Apic. Res., v. 13, n.3, p.183-190. 1974.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droryana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J. Hym. Res., v.10, p. 261-270. 2001.
- ZAMA, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H. Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (Stingless Bees) (Hymenoptera: Apidae). Tissue & Cell, 2003. (*In press*).

VII- Artigo a ser submetido para a publicação

“SOME STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF *MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES* (HYMENOPTERA: APIDAE) SPERMATOGENESIS.”

Mônica Conte^a,
Mary Anne Heidi Dolder^a,
José Lino-Neto^b

^a Departamento de Biologia Celular Universidade Estadual de Campinas (Unicamp),
Campinas, São Paulo, 13083-864, Brasil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas
Gerais, 36571-000, Brasil

Running title: Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides*

Keywords: Spermatogenesis, Hymenoptera, stingless bee

Acknowledgements: CAPES supported this work

Correspondence to:

Mary Anne Heidi Dolder - Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP), 13084-971, Campinas, São Paulo, Brasil. Tel: +55-19- 37886114,
Fax: +55- 19- 37886111, E-mail: heidi@unicamp.br (M.A.H., Dolder)

Abstract

The unequal distribution of cytoplasmic content, which results in one of the spermatids having practically no cytoplasm, has been studied in bees by various authors with no clear consensus as to the fate of these smaller cells. These cells were observed with electron and light microscopy, including the squash method that shows whole, unsectioned cells. Routine preparations for electron microscopy revealed nuclei in degeneration within expanded cystic cells, which are also identified by the E-PTA method for basic protein. These smaller cells are no longer found at later stages, suggesting that they are removed from the cysts at an early stage and do not develop into mature spermatozoa.

1. Introduction

The Hymenoptera constitute one of the four largest orders of insects (La Salle *et al.*, 1992) and bees (Aculeata), mainly the native ones, are the most important group of angiosperm pollinators (Hanson & Gauld, 1995). The spermiogenetic process of *Melipona quadrifasciata anthidioides* has been previously described (Cruz-Landim and Silva de Moraes, 1980), but it is not completely understood.

In Hymenoptera, the sex is determined by the haplo-diploidy system and is regulated by sexual alleles. Males are originated from unfertilized eggs and are haploid, while females are developed from fertilized eggs and are diploid. Therefore, the typical condition for males is haploidy and this results in an unusual process during spermatogenesis where the ploidy is not reduced by half with each division, as occurs in the typical meiosis of diploid organisms (Cruz-Landim and Beig, 1980a). Some aspects of spermatogenesis in Hymenoptera have been described for *Melipona quadrifasciata*

anthidioides (Cruz-Landim and Silva de Moraes, 1980), *Scaptotrigona postica* (Cruz-Landim and Beig, 1980b), *Nasonia vitripennis* (Pteromalidae) (Hooge and King, 1975), *Apis mellifera* (Meves, 1903, 1907; Sanderson and Hall, 1948; Sharma, 1961), the wasp (Meves and Duesberg, 1908) and in diploid males of *Apis mellifera* (Woyke and Skowronek, 1974).

Generally, the spermatogenesis of Hymenoptera is characterized by a first abortive meiotic division, due to the unfavorable position of the centrioles and no spindle formation, followed by a second division similar to the common meiosis (Cruz-Landim and Beig, 1980a, b). During the first anomalous meiotic division there is no disorganization of the nuclear envelope and the cytoplasmatic spindle, when it is formed, moves the intact nucleus apart from an exclusive cytoplasmic region. In this region, the formation of a cytoplasmatic bud or vesicle, removes a small amount of cytoplasm, while the nuclear contents remains duplicated (Cruz-Landim and Beig, 1980a, b). This abortive division is responsible for the maintenance of the chromosome number in bees (Kerr, 1969). In the second meiotic division, the nuclear envelope is broken, the cytoplasmic spindle is formed and later separates the duplicated chromosomes. This second division leads to an equal division of the nuclear contents to both haploid spermatids. Therefore, the first meiotic division does not really occur and gametes result only from the second division, where the genetic contents are divided equally between the two cells.

In bees, however, the cytoplasmic contents are unequally distributed, so that one of the spermatids is practically without any cytoplasm (Cruz-Landim and Beig, 1980a, b). Cruz-Landim and Silva de Moraes (1980) and Cruz-Landim *et al.* (1980) showed, with

electron microscopy, that the smaller cells generally contain only the nucleus and a thin layer of cytoplasm with a few ribosomes, lacking the other cytoplasmic organelles.

The destiny of these spermatids with little cytoplasm was still uncertain (Cruz-Landim, 2001). This study, using light and electron microscopy, was carried out to observe the final destiny of these cells.

2. Material and methods

2.1. Electron Microscopy

To observe the basic ultrastructure, male pupae in different developmental stages classified according to their eye color: pink, brown, dark brown, and black eyed pupae, were dissected, the testis removed and fixed in a 3% solution of glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 3 h, to which 1.5% sucrose, 0.2% picric acid, and 5 mM calcium chloride were added. Tissues were then washed in the same buffer and subsequently fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide, for 1 to 2 h. An increasingly more concentrated acetone series was used for dehydration. The samples were embedded in Epon 812. Ultrathin sections were observed with a Carl Zeiss, Leo 906 transmission electron microscope, after routine uranyl acetate and lead citrate staining.

For the detection of basic proteins, the fixative was initially the same but the tissues were not post-fixed and dehydration was carried out in an ethanol series, with 1% phosphotungstic acid (E-PTA) added to the absolute ethanol. No section staining was used.

2.2. *Light Microscopy*

To observe the spermatocytes, male pupae in different developmental stages classified according to their eye color were dissected in Ringer solution and transferred to lacto-acetic orcein for 20 minutes, then squashed.

In DAPI preparations, the testes were fixed in acetic ethanol, then 70% ethanol, and squashed. The slides were stained with DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0.2µm/ml. It were washed and transferred to McIlvaine buffer, pH 7.0 for 1 minute. This material was photographed in the Olympus BX-60 microscope, with a BP360-370nm filter.

Thin sections obtained from the material prepared for electron microscopy were stained with toluidine blue and photographed with the Olympus BX-60 microscope.

3. Results

3.1. *Light microcopy*

Semi-thin sections showed each testis to divide into of the cysts. In the first stages of spermiogenesis, the cysts contained round spermatids (Fig 1, a pale pink-eyed pupa) and recently divided spermatids, still joined by cytoplasmic bridges. The squash method was used to observe whole cells, thus complementing the electron microscopy observations. In figure 2, stained with lacto-acetic orcein (pink-eyed pupa), spermatid cells in metaphase and telophase can be observed. Spermatids with very different amounts of cytoplasm can be seen. Squashed testis treated with DAPI reinforced the observation of spermatid cells with very little cytoplasm. Notice in figure 3 (pink eyed pupae), that there are more condensed nuclei with only a thin layer of cytoplasm still joined to their sister cells with a large

amount of cytoplasm. The cystic cells are thicker in some regions, with closely associated nuclei, suggesting an intimate interaction, such as reabsorption (Figure 4, pink eyed pupa). In the early phases of spermiogenesis (Figure 5 - brown-eyed pupa) the cystic cells are thickened in specific regions that contain vacuoles and vesicles, suggesting an advanced stage of phagocytosis. In the semi-thin, toluidine-blue stained section, notice the difference between early spermatids, having a mitochondrial complex and a large amount cytoplasm, while others have very little (figure 6 - light brown-eyed pupa). Figure 7 (brown eyed pupa) shows cysts where the spermatids already beginning to elongate. It is possible to identify the mitochondrial complex near the nucleus. In the later phase, spermatids are already elongated and show a mitochondrial derivative and a nucleus. It is no longer possible to find cells with very little cytoplasm (Fig 8 - brown-eyed pupa). In figure 9, it is possible to visualize a typically narrow cystic cell with a prolongation extending between the spermatid cells. The flagella with modified mitochondria indicate that these are elongating spermatids.

In black-eyed pupae and those with a yellow body (Fig 10) cyst elongation has advanced and all cells are developing in to typical spermatids. Elongated spermatids are arranged in a spermatodesm which includes a dense cap covering the anterior extremity of the sperm bundle.

3.2. Transmission Electron microscopy

The presence of cells with little cytoplasm was observed in cysts of dark brown-eyed pupae, generally concentrated near the cystic cells, but still close to developing cells with the typical amount of cytoplasm (Fig 11). Is interesting to note that the nuclei of these

cells with less cytoplasm are more E-PTA positive than those of other nuclei. The presence of the mitochondrial complex or Nebenkern in this cyst identifies these cells as very early spermatids.

In the figure 12, slightly more advanced spermatids are beginning to develop their flagellar structures but some nuclei with little cytoplasm are still found. Notice cystic cell prolongations, containing many typical mitochondria, seen extending between the spermatids.

Large vesicles with a filamentous content are probable nuclei surrounded by expansions of the cystic cell. They are apparently following a process of degeneration, but still stain strongly with E-PTA (Fig 13, dark brown-eyed pupa). The adjacent cyst has normally developing cells with condensing nuclei (see inset). The same process can be seen in Fig 14, where there is nuclear "debris" in various stages of degeneration inside a very well developed cystic cell. In the next micrograph (Fig 15) the cystic cell has a greater width including the degenerated nuclei and apparent vacuoles, separating spermatids. In this E-PTA treated cells the membranes cannot be clearly defined due to the omission of osmium tetroxide.

In the figure 16, a cell with a nucleus and small amount of cytoplasm is near a typical spermatid, and a typical cystic cell. Figure 17 shows elongated spermatids within the thin wall of a cystic cell, which emits prolongations containing mitochondria that penetrate between the spermatids of the cyst. Notice the varied shapes of the condensing nuclei.

Large degenerating structures are strongly positive for E-PTA, and probably are the nuclei of cells that received little cytoplasm and do not become mature spermatozoa. The degenerating nuclei are clearly different from the nucleus (cn) that has a loose fibrillar content and irregular, folding borders, typical of cystic cells (Fig 18). The nuclear origin of these vesicles of irregular degenerating material can be confirmed in figure 19, which was fixed with osmium, permitting the identification of the double membranes of a typical nuclear envelope.

Figure 20 (E-PTA staining), shows a secondary spermatocyte still attached to the cytoplasmic vesicle with centrioles in close association but no nuclear material. Figure 21 shows a later spermatid with microtubules parallel to the centriolar adjunct and the larger mitochondrial derivative. The microtubule pattern of the axoneme is typical for insects: 9+9+2.

In the next micrograph, it is possible to see the nuclei of late spermatids with highly condensed chromatin (Fig. 22). The larger mitochondrial derivative and the centriolar adjunct are in close contact with the nuclear base.

4. Discussion

The characteristic spermatogenesis of bees results in an unequal division of the cytoplasm, and many authors have discussed the destiny of the cells with a little cytoplasm and almost without organelles, including Mark and Copeland, (1907); Cruz-Landim and Beig, (1980a, b); Cruz-Landim and Silva de Moraes (1980) and Cruz-Landim *et al.* (1980). Hachiohe and Onishi (1952) proposed that these smaller cells were unviable.

However, Kerr and Silveira (1974), taking into account the number of spermatozoa per testicular cyst, proposed that both types of spermatids develop into spermatozoa.

In bees, as in most of insect, all the spermatozoa have two long mitochondrial derivatives in their flagellum (Baccetti, 1972; Cruz-Landim, 2001; Dallai, 1979; Lino-Neto & Dolder, H., 2001; Wilkes and Lee, 1965; Zama *et al.*, 2001); and many authors have shown that the derivatives are the result of the fusion of all or almost all mitochondria that exist in the spermatids (Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Hoage and Kessel, 1968; Lino-Neto *et al.*, 2000; Woyke and Skowronek, 1974). Also, the spermatozoa of these insects, as in most animals, have an acrosome above the nucleus, which is formed by the endoplasmic reticulum and the Golgi complex found in the spermatids. Therefore, it appears to be unlikely for spermatids without mitochondria and a Golgi complex to develop into spermatozoa.

The positive E-PTA reaction demonstrates the presence of basic proteins, characteristics of nuclei. The fact that the nuclei of cells with little cytoplasm stain more strongly could be due to their more condensed chromatin, typical of inactive cells, or even indicate a larger amount of basic proteins in these nuclei.

In this study, degenerating structures were observed within the expanded cystic cells, during an early phase of spermatic development. The strongly positive reaction observed for E-PTA suggests that this vesicle containing large amounts of basic protein should be the nucleus of the cells that received little cytoplasm.

Phagocytosis of the small cells appears to occur early, as suggested by the peripheral arrangement of these cells and the partial engulfing seen in figure 12. The degenerated nuclei are found near the nucleus of the cystic cells, which is clearly identified

by its typically irregular shape and is not affected by the process of nuclear degradation (Figures 15 and 16). Figure 4 shows regions of greater thickness of the cystic cells and some associated nuclei that are being phagocytized. Figure 5 appears to be a more advanced cyst, in which the cystic cell is still thickened but degenerating nuclei are not observed, only a large amount of vacuoles and vesicles. Only typical spermatids with Nebenkern, which will become spermatozoa are seen within the cyst. As a rule, cystic cells, whether surrounding very early spermatids (Figs. 1 and 4) or those with intermediate and late spermatids (Figs. 7 and 8) are typically reduced to very narrow enclosing cells, with little phagocytic activity. This contrast between cysts in intense phagocytic activity and those in ordinary activity can be seen in figures 13, 14 and 15.

Branching prolongations of the cystic cells in all stages were observed extending into the cysts, between spermatid cells. These mitochondria filled expansions may be important for maintaining the nutrition of spermatids and the reabsorption of cellular "debris".

This research also confirmed the abortive meiosis in spermatocytes, as described by Cruz Landim & Beig (1980a, b). A flagellar section near the nuclear base of a more advanced spermatid confirms the location of the centriolar adjunct beside the larger mitochondrial derivative, both following parallel to the axoneme which shows the typical microtubule pattern for insects: 9+9+2 as described by Lino-Neto *et al.* (2000). Late spermatids show an unusual pattern of chromatin condensation, in the form of dense parallel lamellae, which has not been previously described. These advanced spermatids developed from early spermatids with the regular amount of cytoplasm, since the ones with very little cytoplasm would have degenerated by the time the cyst enters this stage.

The classification according to eye color was found to be only an approximate guide for the structural development of spermatid cysts, because these are not synchronous, and various different phases may be found in the same pupa.

References

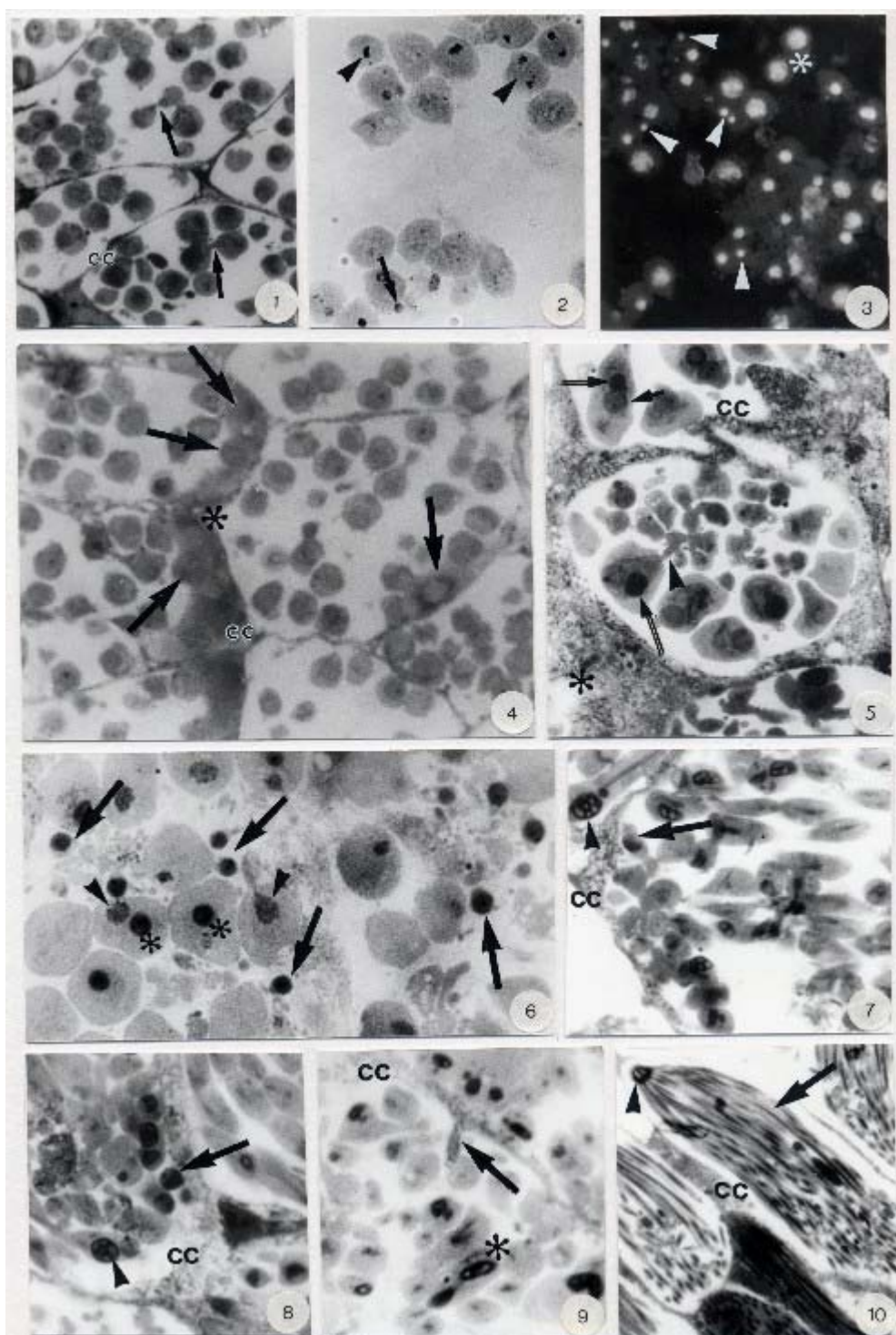
- Baccetti, B., 1972. Insect sperm cell. *Adv. Insect. Physiol.*, 9, 315-397.
- Cruz-Höfling, M.A.; Cruz-Landim, C.; Kitajima, E.W., 1970. The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *An. Acad. Bras. Ciên.*, 42, 69-78.
- Cruz-Landim, C., Beig, D., 1980a. Meiose nos Hymenoptera. *Ciê. Cult.*, 33, 937-966.
- Cruz-Landim, C.; Beig, D., 1980b. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Invert. Reprod.*, 2, 271-283.
- Cruz-Landim, C.; Silva De Moraes, R.L.M., 1980. Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, 27, 167-175.
- Cruz-Landim C.; Beig, D.; Silva De Moraes, R.L.M., 1980. Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia*, 33, 1, 1-15.
- Cruz-Landim, C., 2001. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia*, 91, 183-189.
- Dallai, R., 1979. An overview of atypical spermatozoa in insects. In: *The spermatozoon*, eds. W. Fawcett & Bedford, 253-256. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

- Hachiohe, K.; Onishi, A., 1952. On the meiosis of the drone of honey bee (*Apis mellifera*).
Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., G3, 83-87.
- Hanson, P. E.; Gauld, I.D. 1995. Economic importance of Hymenoptera. In P. E. Hanson &
I. D. Gauld (Eds). The Hymenoptera of Costa Rica, 89-100. New York: Oxford
University Press.
- Hoage, T.R.; Kessel, R.G., 1968. Na electron microscope study of the process of
differentiation during spermatogenesis in the drone honeybee (*Apis mellifera* L.) with
special reference to centriole replication and elimination. J. Ultrast. Res., 24, 6-32.
- Hogge, M.A.F.; King, P.E., 1975. The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasomia*
vitripennis (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Submicr. Cytol., 7, 81-96.
- Kerr, W.E., 1969. Some aspects of the evolution of social bee (Apidae). Evol. Biol., 3, 119.
- Kerr, W.E.; Silveira, V., 1974. A note on the formation of honeybee spermatozoa. J.
Apicult. Res., 13, 121-126.
- LaSalle, J.; Gauld, I.D., 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the
diversity of others organisms. In J. LaSalle & I.D. Gauld (eds). Hymenoptera and
Biodiversity. C.A.B. International, UK, 1-26.
- Lino-Neto, J.; B  o, S.N.; Dolder, H., 2000. 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., 2001. Redescription of sperm structure and ultrastructure of
Trichogramma dendrolimi (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). Acta.
Zool., 82, 159-164.

- Mark, E.L.; Copeland, M. 1907. Maturation stages in the spermatogenesis of *Vespa*. Proc. Ammer. Acad., 43, 69-74.
- Meves, F., 1903. Über "Richtungskörper bildung" in Hoden von Hymenoptera. Anat. Anz., 24, 1, 29-32.
- Meves, F., 1907. Die spermatocytenteilungen bei der honigbiene, *Apis mellifera* L., nebst Bemerkungen über. Chromatinreduction. Arch. Mikrosk. Anat, 70, 3, 414-419.
- Meves, F.; Duesberg, J., 1908. Die spermatocytenteilungen bei der Hornisse *Vespa crabo*. Arch. Mikrosk. Anat., 71, 571-587.
- Sanderson, A. R.; Hall, D.W., 1948. The cytology of honeybee *Apis mellifera* L. Nature, 162 (4105), 34-35.
- Sharma, G. P.; Gupta, B.L.; Kumbkarni, C. G., 1961. Cytology of spermatogenesis in the honeybee, *Apis mellifera* (F.). J. Royal Micros., 79, 337-351.
- Wilkes, A.; Lee, P.E., 1965. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in hymenopteran *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). Canad. J. Genet. Cytol., 7, 609-619.
- Woyke, J.; Skowronek, W., 1974. Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee. J. Apic. Res., 13,3,183-190.
- Zama, U., Lino-Neto, J.; Dolder, H., 2001. Ultrastructure of Spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droryana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). J. Hym. Res., 10, 261-270.

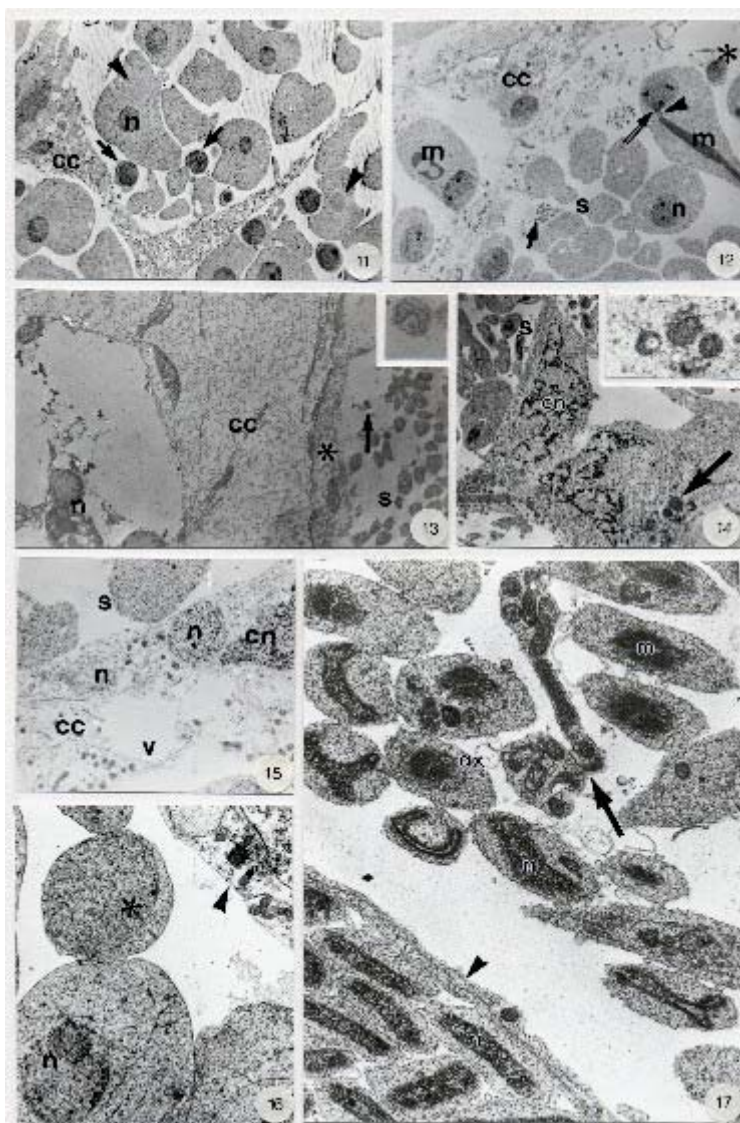
Legends - figures 1- 10

Figs. **1-10** - Light microscopy. **1-** Cystic cells surround the recently divided spermatids connected by cytoplasmatic bridges (arrows). A pale pink-eyed pupa. 590x. **2** - Metaphase and telophase spermatocytes (arrowheads) and a nucleus with a small amount of cytoplasm (arrow). Pink-eyed pupa. 1.500x. **3** - In the squashed testis treated with DAPI, nuclei of spermatids with very little cytoplasm (arrowheads) can be found. Spermatocytes (asterisk). Pink eyed pupae. 1.400x. **4** - Cystic cells (cc), with thicker portions (asterisk) and associated nuclei (arrows). Pink eyed pupae. 680x. **5-** Cystic cell (cc) with thicker portions (asterisk) containing granular cytoplasm and vesicles. Typical spermatids are connected by bridges (arrowhead). Notice the nucleus (arrow) and the Nebenkern (double-arrow). 1.300x. **6** - Recently divided cells show the difference between spermatids with a large amount cytoplasm and others with very little (arrows). Mitochondrial complex (arrowhead) and nucleus (asterisk) in spermatids with a regular amount of cytoplasm. Light brown-eyed pupa. 1.600x. **7** - Elongating flagella show an axoneme and mitochondrial derivatives (arrowhead) with their round nuclei in initial condensation (arrow). Black-eyed pupa. 600x. **8** - The nucleus (arrow) and mitochondrial derivative (arrowhead) are seen in elongated spermatids. Dark brown-eyed pupa. 500x. **9** - Cystic cells (cc) with a prolongation (arrow) that reaches into the cyst. Smaller mitochondrial derivative (asterisk). Brown eyed pupa. 670x. **10** - Elongated spermatids (arrow) arranged in spermatodesmata covered by a dense cap on the anterior extremity of the sperm bundle (arrowhead). Yellow body pupa. 300x.



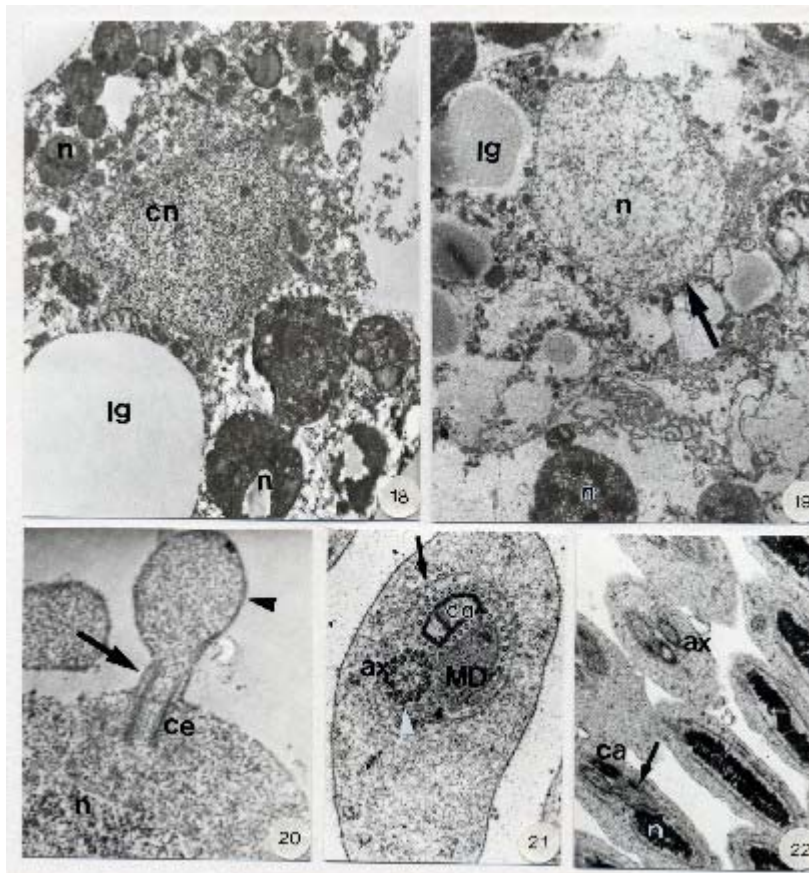
Legends - figure 11 - 17

Fig. **11- 15** - Spermatids treated with E-PTA. Fig. **11-** Spermatids show the cystic cells (cc), nucleus (n) and mitochondrial complex (arrowhead) of a typical cell and nuclei with little cytoplasm (arrows). 2.500x. Fig. **12-** Cystic cell (cc) prolongation with many mitochondria (arrow); typical spermatids (s) with the nucleus (n), mitochondrial derivative (m), axoneme (arrowhead) and centriolar adjunct (double arrow). Nucleus with little cytoplasm (asterisk). 4.000x. Fig. **13-** A narrow cystic cell (asterisk) separates typical spermatids (s) (arrow and inset) while an enlarged cystic cell (cc) has engulfed degenerating nuclei (n). 2.000x, and 6.000x. Fig. **14-** Cystic cell nucleus (cn) near a degenerating nucleus (arrow and inset). Typical spermatids (s). 2.500x and 9.800x. Fig. **15-** Cystic cell (cc) containing degenerated nuclei (n), vacuoles (v), and its nucleus (cn), separating spermatids (s) of two cysts. 6500x. Fig. **16-** Spermatids treated with a routine fixation, showing the cystic cell (arrowhead), the nucleus of a typical spermatid (n), and the nucleus of a spermatid with little cytoplasm (asterisk). 8.400x. Fig. **17-** Cystic cell (arrowhead), cystic cell prolongation containing many mitochondria (arrow). Condensing nuclei (n), axoneme (ax), mitochondrial derivatives (m). 12.600x.



Legends - figure 18 - 22

Fig. **18** - E-PTA preparation and **19** (routine fixation) show the cystic cell with degenerating spermatid nuclei (n) and the double membrane (arrow). Lipid globules (lg). Cystic cell nucleus (cn). 19 - 8.300x and 20 - 7.900x. Fig. **20** - Spermatocyte submitted to E-PTA treatment shows the cytoplasmatic vesicle (arrow-head), centriolar microtubules (arrow), nucleus (n) and centriole (ce) 36.700x. Fig. **21** - Later spermatids with a 9+9+2 axoneme pattern. Larger mitochondrial derivative (MD), axoneme (ax), accessory microtubules (arrowhead), centriole adjunct (ca), cytoplasmic microtubules (arrow). 36.600x. Fig. **22** – Elongating spermatids with nuclei containing highly condensed chromatin (n). The larger mitochondrial derivative (arrow) contacts the nuclear base. 10.200x.



VIII - Artigo a ser submetido

**Ultrastructural analysis of the mitochondria and centriolar adjunct in early
spermiogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides*
(Hymenoptera: Apidae)**

Mônica Conte^a,
Mary Anne Heidi Dolder^a,
José Lino-Neto^b

^aDepartamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, 13083-864, Brasil

^bDepartamento de Biologia Celular, Universidade Federal de Viçosa, (UFV), 36571-000,
Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Correspondence to:

Mary Anne Heidi Dolder - Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de
Campinas, (UNICAMP), 13084-971, Campinas, São Paulo, Brasil, Tel: +55-19- 37886114,
Fax: +55- 19- 37886111, E-mail: heidi@unicamp.br (M.A.H., Dolder)

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIA AND CENTRIOLAR ADJUNCT IN

EARLY SPERMIOGENESIS OF *MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES*

(Hymenoptera: Apidae)

Mônica Conte,
Mary Anne Heidi Dolder,
José Lino-Neto

Abstract

In *Melipona quadrifasciata anthidioides*, the spermiogenetic process has been described, but is not totally understood, making this study another contribution to the spermiogenesis of the *Melipona*, focusing on the formation of the centriolar adjunct and the mitochondrial derivatives during early spermiogenesis. With light and electron microscopy it was possible to visualize the position these structures and their development. In E-PTA preparations, the centriolar adjunct was observed as being positive for basic proteins, contrasting with the mitochondrial derivatives. Its position is at the nuclear base, beside the centriole, and its initial ultrastructural appearance shows "holes" similar to the cytoplasmic "islands" of early mitochondrial derivatives. Routine fixation showed the development of the mitochondrial complex as it is transformed into a smaller mitochondrial derivative and a larger one, showing the structural difference between them that occurs in this stage.

Introduction

Melipona quadrifasciata anthidioides (Hymenoptera: Apidae) belongs to an important pollinating group (Hanson and Gauld, 1995). Its spermiogenesis was described by Cruz-Landim and Silva de Moraes (1980) although some questions about spermiogenesis remain unanswered.

The centriolar adjunct is a dense structure that connects the nucleus and flagellum, being located in bees, between the nuclear base and the anterior tip of one of the mitochondrial derivatives (Lino-Neto *et al.*, 2000a; Zama *et al.*, 2001). In *Apis mellifera*, Lino-Neto *et al.* (2000a) has observed that this structure has 30µm length and with E-PTA treatment it appears electron dense. For most insects, the nucleus is joined to the flagellum by the centriolar adjunct (Jamieson, 1987; Lino-Neto and Dolder, 2002). The centriolar adjunct was recently described as a more compact structure in spermatozoa of Hymenoptera (Wheeler *et al.*, 1990; Newman & Quicke, 1998, 1999a,b; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a,b; Lino-Neto and Dolder, 2001). In some insects, the centriolar adjunct disappears before maturity (Jamieson, 1987). The function of the centriolar adjunct has not been clearly explained, but was considered by Gatenby & Tahmisian (1959 *apud* Jamieson, 1987) to be a connecting structure between the nucleus and the anterior extremity of the mitochondrial derivative, and to soften the flagellar movement.

The mitochondria present in the cytoplasm of young spermatids aggregate close to the nucleus, and fuse to form a structure called the Nebenkern (Baccetti, 1969; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980). In the next phase, this structure divides, becoming elongated and following the axoneme, whereupon these structures are called mitochondrial derivatives (Cruz-Landim & Beig, 1979 *apud* Jamieson, 1987). The changes that occur

during the Nebenkern differentiation suggest qualitative modifications of the submicroscopic structure of mitochondria, of their chemical composition and physiology (Kaye, 1958 *apud* Baccetti, 1970).

This study is another contribution to the spermiogenesis of the *Melipona*, focusing on the formation of the centriolar adjunct and both mitochondrial derivatives during early spermiogenesis.

Materials and methods

Male pupae in different developmental stages are classified according to their eye color: pink, brown, dark brown, and black eyed pupae, were dissected and the testis removed to a 3% solution of glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, for 3 h, to which was added 1.5% sucrose, 0.2% picric acid, and 5 mM calcium chloride. Tissues were then washed in the same buffer and subsequently post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide, for 1 to 2 h. to observe the basic ultrastructure. Dehydration was in increasingly more concentrated acetone series. The thin sections were stained with toluidine blue and were photographed in Olympus BX-60 microscope. For the detection of basic proteins, the fixative was initially the same but the tissues were not post-fixed and dehydration was in an ethanol series, with 1% phosphotungstic acid (E-PTA) added to the absolute ethanol. Both samples were embedded in Epon 812 and the ultrathin sections were observed with a Carl Zeiss Leo 906 transmission electron microscope.

Results

In the figure 1, thin sections stained with toluidine blue, is possible to note the larger and the smaller mitochondrial derivative, enclosed by the cystic cell. The larger derivative has already extended along the flagellum and has consequently a smaller diameter. The smaller one is short but has a larger diameter, and maintains the cytoplasmic "islands". In E-PTA stained preparations, a strongly E-PTA positive structure was observed, located at the nuclear base, surrounding the centriole which was interpreted as being the early centriolar adjunct (See Fig. 2, 3, pink-eyed pupa and brown-eyed pupa). Observe also in both figures the mitochondrial derivatives, which are not positive for E-PTA. Later stages (dark-brown eyed pupa) treated with E-PTA and sectioned at different levels show the centriolar adjunct as a very dense structure that is not compacted, and the both mitochondrial derivatives can be found (Fig. 4). A lower section shows the axoneme, the larger mitochondrial derivative and the centriolar adjunct, which is surrounded by a layer of microtubules (Fig. 5). In the figure 6, note the initial condensation of the chromatin in the form of thick fibers, and the distal end of centriolar adjunct. In the fig 7, pink-eyed pupae, it is possible to notice the centriolar adjunct, at the nuclear base and in contact with the axoneme. Notice the acrosomic vesicle on the opposite pole of the nucleus. Notice the lack of membrane staining with this method.

Preparations using the routine fixatives, a pink eyed pupa (Fig 8) has the mitochondria organized into a mitochondrial complex or Nebenkern early mitochondrial derivatives show double membranes, cristae and "islands" of cytoplasm. The mitochondrial complex has fused into two mitochondria that are separating near the axoneme (Fig 9, brown eyed pupa). As the derivatives separate, they develop differentially and it is possible

to distinguish the smaller derivative from the larger (Fig 10 to 12 - brown to black-eyed pupae). Notice the presence of endoplasmatic reticulum cisternae enfolding the derivatives. Fig. 11 represents an intermediary stage between figs 9 and 10 and the small deposits near the centriole could be the first stages of the centriolar adjunct. The elongation process of the larger derivative leads to the initial simplification of this structure, which loses its cytoplasmic "islands".

Discussion

The origin of centriolar adjunct is not well understood (Baccetti, 1972). Many authors, including Cantacuzène (1970 *apud* Lino-Neto and Dolder, 2000a); Fawcett *et al.*, 1970; Lindsey and Bieseke (1974a,b *apud* Cruz-Landim *et al.* 1981); Yasuzumi (1974 *apud* Cruz-Landim *et al.*, 1980); Cruz-Landim *et al.*, (1980, 1981) and Cruz-Landim and Beig, (1980), describe the high-density material as originating from the nucleus to contribute to the centriolar adjunct or deltoid bodies (today called accessory bodies) of some insects. Lindsey and Bieseke (1974a *apud* Cruz-Landim *et al.*, 1981) report that the centriolar adjunct may be made up of coalescing ribosomes, freed from the reticulum. In accordance with Cruz-Landim *et al.* (1980), and Cruz-Landim and Beig (1979a *apud* Jamieson, 1987), dense nuclear granules can also contribute to the deltoid bodies, during spermatid differentiation, making up the chromatoid body, which, in turn, will contribute to the formation of the centriolar adjunct and deltoid bodies of the spermatozoa.

In the results of the present study it is possible to note the positive staining of the centriolar adjunct; this fact is due the basic proteins present in this structure. In the spermatozoa, the centriolar adjunct has different reactions for the E-PTA technique. In

accordance with Zama (2003, *in press*), for the Bombini e Apini, the centriolar adjunct is positive to this technique, and for the Meliponini and Euglossini it is negative to E-PTA.

Rather than a change in its basic contents, this change in staining is most likely due to the high condensation of the centriolar adjunct in spermatozoa, which does not permit the penetration of the stain into this compacted structure, or there may be a lack of radicals available to bind the stain.

The retarded development of the smaller mitochondrial derivative may be related to the fact that it must migrate to a new position below the centriolar adjunct after this structure elongates and condenses. This new possibility must be investigated to determine the step-by-step modifications of the flagellar structures in these cells.

Acknowledgements: CAPES supported this work

Literature cited

- Baccetti, B.; Dallai, R.; Rosati, F. 1969. The spermatozoon of Arthropoda. III. The lowest holometabolic Insects. *J. Microsc.*, 8, (2): 233-248.
- Baccetti, B. 1970. Comparative Spermatology. Proceedings of the *International Symposium*, held in Rome e Siena. Accademia Nazionale dei Lincei, Rome.

- Baccetti, B. 1972. Insect sperm cell. *Adv. Insect. Physiol.*, 9:315-397.
- Cruz-Landim, C.; Silva De Moraes, R.L.M. 1980. Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifaciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, 27: 167-175.
- Cruz-Landim C.; Beig, D.; Silva De Moraes, R.L.M. 1980. Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia*, 33, (1): 1-15.
- Cruz-Landim, C.; Beig, D. 1980. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Intern. J. Invert. Reprod.*, 2:271-283.
- Cruz-Landim, C.; Silva De Moraes, R.L.M.; Beig, D. 1981. Caracterização de material eltrondenso de origem nuclear, durante a espermiogênese de abelhas (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Biol.*, 41(2):421-426.
- Fawcett, D.W.; Phillips, D.M. 1970. Recent observations on the ultrastructure and development of the mammalian spermatozoon. In: B. Baccetti, ed. *Comparative spermatology*. Academic Press, New York, p.13-28.
- Hanson, P. E.; Gauld, I.D. 1995. Economic importance of Hymenoptera. In P.E. Hanson & I.D. Gauld (Eds) *The Hymenoptera of Costa Rica*, p.89-100. New York: Oxford University Press.
- Jamieson, B.G.M. 1987. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. *Cambridge University Press. Cambridge*. 320pp.

- 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. Embryol.*, 28: 253-259.
- Lino-Neto, J.; Báo, S.N.; Dolder, H. 2000a. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue & Cell*, 32:322-327.
- Lino-Neto, J.; Báo, S.N.; Dolder, H. 2000b. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool. (Stockh)*, 81:205-211.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H. 2001. Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: 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(2): 124-128. 2002.
- Newman, T.M.; Quicke, D.L.J. 1998. Sperm development in the imaginal testes of *Aleiodes coxalis* (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae). *J. Hym. Res.*, 7:25-37.
- Newman, T.M.; Quicke, D.L.J. 1999a. Ultrastructure of imaginal spermatozoa of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.*, 8:35-47.
- Newman, T.M.; Quicke, D.L.J. 1999b. Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.*, 8:197-203.

Wheeler, D.E.; Crichton, E.D.; Kruttsch, P.H. 1990. Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae:Hymenoptera). *J. Morphol.*, 206:343-350.

Zama, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droryana* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). *J. Hym. Res.*, 10: 261-270.

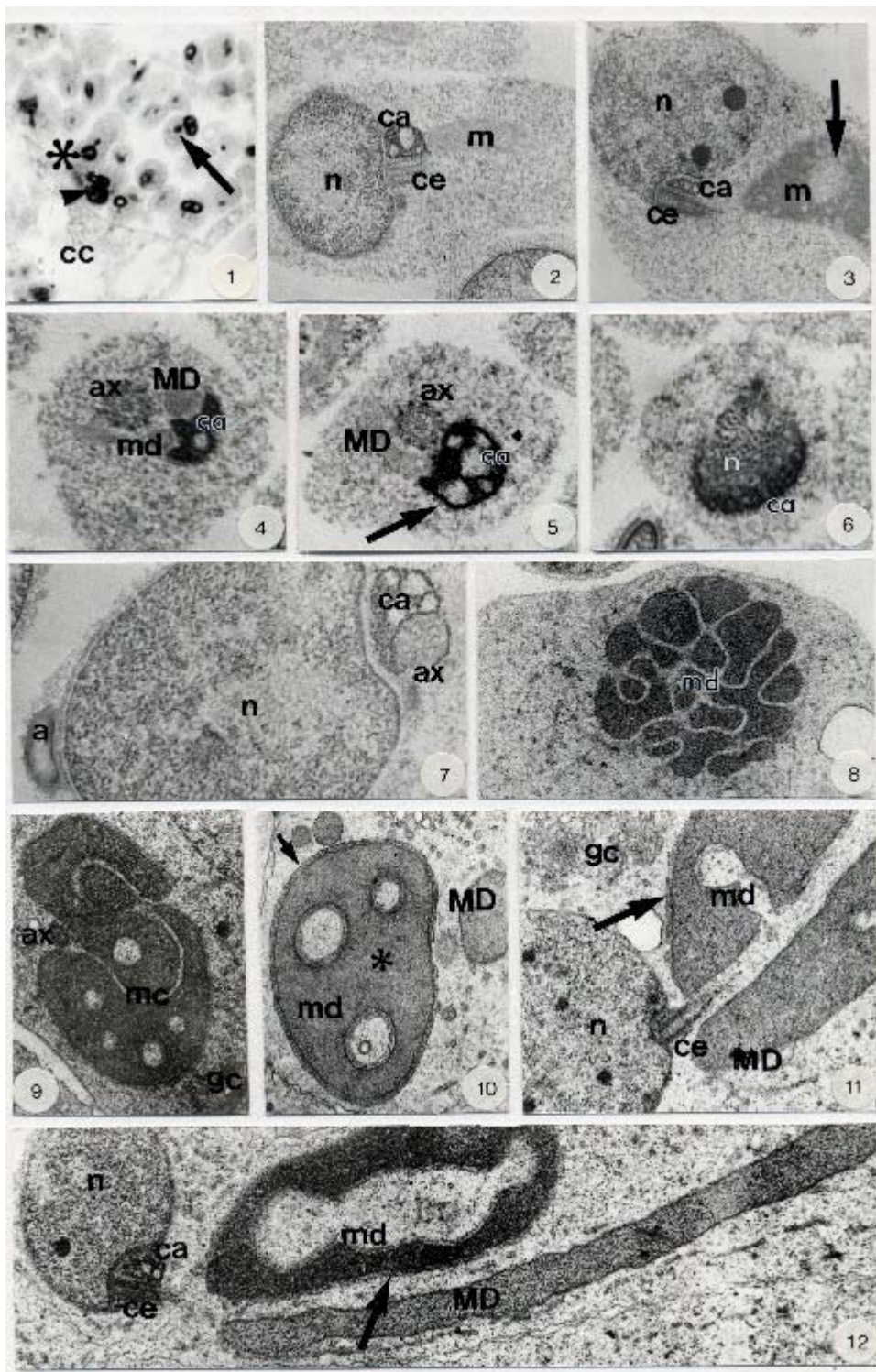
Zama, U.; Lino-Neto, J.; Dolder, H. 2003. Structure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) Hymenoptera: Apidae). *Tissue & Cell*, (In press).

Legends - figure 1 - 12

Fig. 1. Light microscopy. The larger mitochondrial derivatives have extended along the flagellum and therefore become very narrow (arrow), while the smaller ones (asterisk) are still short, wide and have cytoplasmic "islands" (arrowhead). 589x.

Figs. 2-7. EPTA treated spermatids. 2 - Longitudinal section shows the centriole (ce) beside the developing centriolar adjunct (ca) and one of the mitochondrial derivatives (m), at the nuclear base. Nucleus (n). 18.000x. 3 - A similar section in which the centriole (ce) is still lateral to the nucleus (n) and next to the centriolar adjunct (ca); the mitochondrial derivative (m) has a cytoplasmic "island" (arrow). 27.000x. 4 - Flagellum cross-sectioned at the base of the centriolar adjunct (ca), where both mitochondrial derivatives (MD, md) can be identified. Axoneme (ax). 3.170x. 5 - A similar section closer to the nucleus shows only the larger mitochondrial derivative (MD). Notice the microtubules (arrow) surrounding both the centriolar adjunct and the derivative. Axoneme (ax). 3.170x. 6 - The nucleus (n) with chromatin arranged in thick filaments has been sectioned at its base in contact with the centriolar adjunct (ca). 3.170x. 7 - The centriolar adjunct (ca) is seen encircling the axoneme. Notice the acrosomic vesicle (a) at the opposite pole of the spermatid. Nucleus (n). 32.340x. Fig. 8-12. Routinely fixed spermatids. 8- In an early spermatid, the mitochondrial complex (mc) is labyrinth-like. 6.500x. 9- A later spermatid has its mitochondrial complex (mc) reduced, by fusion, to two entwined structures close the axoneme (ax). Golgi apparatus (gc). 15.000x. 10- In the next phase, the spermatid shows the two mitochondrial derivatives: the larger derivative (MD) and the smaller derivative (md) surrounding the axoneme (ax). The smaller mitochondrial derivative, which develops later, still is covered by endoplasmatic reticulum (arrow), even in the cytoplasmic "islands". An asterisk marks the cristae. 18.100x. 11- An initial differentiation can be seen in the two mitochondrial derivatives. The smaller derivative (md) has cisternae of the endoplasmatic reticulum still associated (arrow). The larger derivative (MD) is positioned closer to the

nuclear base. Nucleus (n), Golgi complex (gc), centriole (ce). 18.100x. **12-** Longitudinal section showing the differentiated mitochondrial derivatives. The smaller mitochondrial derivative (md) is less developed, with cytoplasmic "islands" and surrounding endoplasmatic reticulum (arrow) while the larger (MD) is more compact. 20.100x.



IX- Conclusões

A espermatogênese de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) é semelhante à de outros apídeos já relatados na literatura.

A observação de grande número de núcleos em degeneração dentro das células císticas dos testículos de pupas de olho vinho a marrom claro é mais uma evidência a favor da hipótese da degeneração das células espermáticas com citoplasma residual.

Os núcleos das células com pouco citoplasma são mais condensados ou possuem maior quantidade de proteínas básicas do que das células típicas, demonstrados pela técnica de E-PTA.

Prolongamentos das células císticas com muitas mitocôndrias penetram por entre as espermátides, sendo possivelmente importantes para a nutrição das espermátides e reabsorção dos restos das células.

Há diferenças estruturais e de desenvolvimento entre os dois derivados mitocondriais das espermátides nas primeiras fases de desenvolvimento das espermátides.

O derivado mitocondrial menor desenvolve-se depois do derivado maior devido ao seu deslocamento para uma nova posição abaixo do adjunto do centríolo, e em seguida irá alongar e condensar.

A classificação em estágios de acordo com as cores dos olhos não é um guia perfeito para o desenvolvimento estrutural dos cistos, pois estes não são sincrônicos, existindo diferentes fases na mesma pupa.