
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Evolução do Sistema Reprodutivo de Formigas da Tribo Attini (Hymenoptera: Myrmicinae): Análise das Espermatecas.

GABRIELA ORTIZ

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto - 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Evolução do Sistema Reprodutivo de Formigas da Tribo Attini (Hymenoptera: Myrmicinae): Análise das Espermatecas.

GABRIELA ORTIZ

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Co-Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Jr.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto - 2007

595.796 Ortiz, Gabriela

O77ev Evolução do sistema reprodutivo de formigas da tribo
Attini (Hymenoptera:Myrmicinae) : análise das espermatecas
/ Gabriela Ortiz. – Rio Claro : [s.n.], 2007
130 f. : il., tabs, figs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

Co-orientador: Maurício Bacci Júnior

1. Formiga. 2. Histologia. 3. Histoquímica. 4. Glândula
espermatecal. 5. Biologia molecular. I. Título.

À minha mãe Aparecida N. Ortiz, que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade, iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e com muita esperança. À você, que se deu por inteira e que muitas vezes renunciou aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Amo você!

Dedico esta tese.

*“Às vezes sou grande;
Às vezes sou pequena;
Tão pequena sou que...
Às vezes ele é pequeno;
Às vezes ele é grande,
Tão grande o mundo que
aos poucos percebo que
crescer me torna pequena”.*

(Lígia Calconi Tayar)

*”Ninguém é tão grande que não possa aprender e
nem tão pequeno que não possa ensinar”.*

(Píndaro, poeta grego)

*“Não há limites para o homem que possui a
capacidade de sonhar e a determinação, em
transformar em realidade o sonho”.*

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho (Processo nº 03/05485-0).

À minha orientadora e amiga, Bel, a quem devo meu progresso científico e aprendizado de como se deve fazer ciência, de quem vou guardar os preciosos ensinamentos pelo resto da vida. Você conquistou toda minha estima, respeito e admiração. Agradeço de forma muito especial por me orientar e lutar comigo para conseguirmos realizar nossos objetivos.

Agradeço também de modo muito especial ao Prof. Dr. Maurício Bacci Jr., pela sua co-orientação, sabedoria, incentivo e exemplo de coragem e trabalho.

À minha mãe Cida, que sempre está ao meu lado, que torce por mim como ninguém, que me ampara e que me ensina a lutar muito por todos os meus sonhos, que é simplesmente tudo na minha vida. Meu eterno obrigado!!!

Ao meu pai Aparecido C. Ortiz, que eu tenho certeza que está sempre presente em todos os momentos da minha vida. Dedico meu amor eterno!

Ao meu irmão Leonardo e ao meu padrasto Antônio de Lucca, que estiveram sempre ao meu lado, pelo apoio e carinho durante todos estes anos...

Ao meu amor Andre Lorenzon pela compreensão e apoio nos momentos difíceis, por compartilhar comigo os momentos de alegria e realizações e, acima de tudo, pelo amor que vejo em seu olhar e que me faz mais feliz a cada dia. Eu te amo!

Aos meus futuros sogros, Antônio e Wanda Lorenzon por terem me recebido tão bem nesta “nova família”.

À todos os docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas e pelo carinho que sempre me transmitiram.

Aos técnicos de laboratório Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte e Rogilene Aparecida Prado pelos serviços técnicos prestados, além da grande amizade construída durante todos estes anos.

À secretária Lucila de Lourdes Segalla Franco pela atenção e ajuda dispensada e, em especial, à desenhista Cristiane Marcia Miléo, pelo auxílio na confecção de imagens, pela sua disposição e acima de tudo pela sua amizade.

Ao João, pela ajuda nas coletas de campo das minhas amigas formiguinhas, pelas tardes no sol escavando ninhos e mais ninhos...

À todos os funcionários do Departamento de Biologia, Seção de Pós-Graduação e Biblioteca pela ajuda concedida.

À todos os meus amigos de pós-graduação e de orientação, companheiros de todas as horas, pela grande amizade construída durante todos estes anos, Pablo, Érika, Juliana, Lorena, Patrícia, Giovana mãe do Guilherme e, em especial, às queridas amigas Giselly, Gislaine, Fernanda, Sandra, Débora e Karim, pela confiança, dedicação e atenção, pelo companheirismo e carinho, por dividirem comigo suas alegrias e tristezas e por saberem dar o verdadeiro significado à palavra amizade!!!. “Melhor do que fazer novos amigos é conservar os velhos pra sempre”.

À uma amiga muito especial, que está ao meu lado há muitos anos, que sempre me aconselhou nos momentos difíceis, sempre levantou o meu astral quando estava triste, com quem sempre poderei contar.....Sabrina Jóia.

À minha amiga Débora (Mogi Mirim), que mesmo distante continua demonstrando carinho pela nossa amizade.

Aos orientados do Prof. Dr. Maurício Bacci Jr., Joaquim, Marcelo e Giovana, pela ajuda no laboratório de biologia molecular, área que foi novidade pra mim e onde aprendi muito graças à disposição e paciência de vocês.

À Deus, pela oportunidade de finalizar mais uma etapa em meu caminho. Pelas inúmeras vezes que segurou em minha mão, me levantou, guiou e fortaleceu. Por suas bênçãos, pelo abrigo, proteção e pela luz em todos os momentos.

E às pessoas fantásticas que passaram em meu caminho nestes anos, que deixaram muitas coisas e àquelas que passaram rápido, mas que não deixaram de ser importantes. Meu muito obrigado!

ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
II. OBJETIVOS	19
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
II.1. MATERIAL	21
III.2. MÉTODOS	22
III.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ.....	22
III.2.1.1. Análises Morfológicas:	22
III.2.1.1.1. Técnica da Hematoxilina de Harris - Eosina Aquosa.....	22
III.2.1.2. Análises Histoquímicas:	23
III.2.1.2.1. Azul do Nilo para detecção de lipídios.....	23
III. 2.1.2.2. Sudan Black B para detecção de lipídios.....	23
III.2.1.2.3. PAS/Alcian Blue para detecção de polissacarídeos.....	24
III.2.1.2.4. Azul de Bromofenol para detecção de proteínas	24
III.2.1.2.5. Ninhidrina Schiff para detecção de proteínas	25
III.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	25
III.2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	25
III.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	26
III.2.3. ANÁLISES MOLECULARES.....	26
III.2.3.1. Extração de DNA com TNES.....	26
III. 2.3.1.1. Lise	26
III. 2.3.1.2. Tratamento com RNase A	27
III. 2.3.1.3. Precipitação de Proteínas.....	27
III. 2.3.1.4. Precipitação de DNA	27
III. 2.3.1.5. Hidratação do DNA	28
III. 2.3.1.6. Eletroforese em Gel de Agarose.....	28

III.2.3.2. Amplificação da Região Mitocondrial.....	28
III.2.3.3. Purificação e Sequenciamento de DNA.....	29
III.2.3.4. Análises Filogenéticas.....	29
IV. RESULTADOS.....	31
CAPÍTULO 1: Spermatheca of four species of ants of the tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological specialization. <i>Research Journal of Biological Sciences.</i> , V. 2, P. 5-12, 2007.....	33
CAPÍTULO 2: Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae). <i>American Journal of Agricultural and Biological Science.</i> , v. 1, p. 58-65, 2006.....	36
CAPÍTULO 3: Phylogenetic study on attines ants based on the results of morphology of spermathecae and molecular biology (Hymenoptera: Myrmicinae). Submetido ao periódico <i>Journal of Morphology</i> (2007).....	40
CAPÍTULO 4: Virgin queens (gynes) of <i>Atta capiguara</i> (Hymenoptera: Myrmicinae): A morphological study regarding the phylogeny of the spermathecae. Submetido ao periódico <i>Acta Zoologica</i> (2007).....	65
V. DISCUSSÃO GERAL.....	95
VI. CONCLUSÕES.....	117
VII. REFERÊNCIAS.....	121

RESUMO

A espermateca dos insetos estoca os espermatozoides desde a cópula até a fecundação dos ovos, e consiste de uma bolsa que freqüentemente possui glândulas associadas. Considerações sobre a anatomia, histologia e ultra-estrutura de espermatecas tornam-se muito mais complexas quando são considerados os insetos sociais, que apresentam diferenças no tamanho e na forma entre rainhas e operárias, e ainda, entre as espécies. Apesar desta complexidade, os resultados morfológicos, histoquímicos e ultra-estruturais aqui obtidos mostraram as diferenças entre as espermatecas das espécies: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*. As espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* apresentaram apenas a glândula espermatecal (porção secretora externa à espermateca). *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani* apresentaram tanto a glândula espermatecal como um epitélio secretor interno. *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, no entanto, apresentaram apenas epitélio secretor interno, sugerindo que nestas espécies a espermateca seja mais independente na manutenção dos espermatozoides.

As formigas cortadeiras vêm sendo cada vez mais estudadas do ponto de vista filogenético, tendo como principal marcador o DNA mitocondrial. Estabelecer a filogenia das formigas atines auxiliaria na resposta de algumas questões evolutivas sobre a relação destas com seus fungos. Realizou-se aqui a correlação das informações obtidas através das seqüências de DNA e do estudo morfológico das espermatecas de rainhas *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*.

O seqüenciamento da região do genoma mitocondrial correspondente aos genes Citocromo Oxidase I (COI), Espaçador Intergênico (IGS), RNA transportador de Leucina (Leu-tRNA) e Citocromo Oxidase II (COII) destas espécies mostrou uma predominância de nucleotídeos A/T, assim como esperado para DNA mitocondrial e

particularmente para os Hymenoptera em geral. A região do espaçador intergênico (IGS) apresentou grande variação e foi caracterizada pelo maior conteúdo de A/T e o menor índice de homoplasia nas espécies aqui estudadas. As regiões do COI e COII, assim como a região do Leu-tRNA mostraram-se altamente conservadas, facilitando o alinhamento das seqüências entre si.

As análises filogenéticas deste estudo geraram uma árvore mais parcimoniosa, onde foi verificado que *Cyphomyrmex muelleri*, espécie que possui a espermateca apenas com glândula espermatecal (porção secretora externa), seria a mais basal entre as atines estudadas, seguida por *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*, respectivamente. As espécies dos gêneros *Atta*: *Atta laevigata* e *Atta sexdens rubropilosa*, que possuem apenas glândula espermatecal, *Atta sexdens sexdens* e *Atta capiguara*, que possuem tanto glândula espermatecal (externa) como epitélio secretor interno e *Atta sexdens piriventris*, que possui apenas epitélio secretor interno, e *Acromyrmex*: *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, que possuem apenas epitélio secretor interno, destacaram-se como as mais derivadas dentro do grupo.

Os dados morfológicos e moleculares das espermatecas para as espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Cyphomyrmex muelleri*, não permitiram ainda afirmar, que a evolução tivesse substituído as células secretoras externas (glândula espermatecal) pelas internas, e nem que tenha ocorrido o contrário, pois tanto a espermateca da espécie *Cyphomyrmex muelleri* (mais basal), quanto as de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* (mais derivadas), apresentaram glândula espermatecal. E ainda, dentro do grupo das derivadas, as espécies de *Acromyrmex* apresentaram apenas epitélio secretor interno, enquanto que as do gênero *Atta* apresentaram ou a glândula espermatecal externa, ou o epitélio secretor interno ou ainda ambos.

Os dados morfológicos e moleculares obtidos podem sugerir a ocorrência de uma evolução paralela, ou seja, independente de características similares ou idênticas, que em linhagens relacionadas seria baseada em modificações dos mesmos passos de desenvolvimento. Uma vez que espécies aparentadas possuem programas de desenvolvimento similares, o paralelismo é freqüente e tendências de evolução paralela são evidentes em quase todos grandes grupos.

ABSTRACT

The insects' spermatheca stores the spermatozoa from the copulation until the egg fecundation, and consists of a sac frequently associated with glands. Considerations about anatomy, histology and ultrastructure of spermathecae become much more complex in social insects, because they have queens and workers with different sizes and shapes, as well as among the species. Besides this complexity, the morphological, histochemical and ultrastructural results show the differences between the spermathecae of the following species: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri*. The species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri* presented only the spermathecal gland (external secretory portion). *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* and *Acromyrmex landolti balzani* presented both the spermathecal gland and an internal secretory epithelium. *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti*, however, presented only the internal secretory epithelium, suggesting that the spermatheca in these species is more independent in spermatozoa maintenance.

The leaf-cutter ants are being studied more from a phylogenetic point of view, having as a principal marker mitochondrial DNA. The establishment of the phylogeny of the attines ants would help in the response of some evolutionary questions about their relation with their fungus. The present study correlated the information obtained from the DNA sequences and morphological studies of spermathecae of *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp. and *Mycocepurus goeldii* queens.

The regional sequencing of the mitochondrial genome corresponding to the Cytochrome Oxidase I (COI), Intergenic Spacer (IGS), Leucine transporter RNA (Leu-tRNA) and Cytochrome Oxidase II (COII) genes of these species show high

amounts of A/T nucleotides, as expected for mtDNA particularly as found in Hymenoptera.

The region of the intergenic spacer (IGS) showed great variation and it was characterized by its A/T contents and by the lower index of homoplasy in the species studied. The COI and COII regions, as well as Leu-tRNA region were highly maintained, facilitating the alignment among themselves.

The phylogenetic analysis from this study generated a more parsimonious tree, where it was verified that *Cyphomyrmex muelleri*, which has a spermatheca only with a spermathecal gland (external secretory portion), would be the more basal species among the attines ants, followed by *Apterostigma* sp. and *Mycocepurus goeldii*, respectively. The species from the genera *Atta*: *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*, which have only the spermathecal gland, *Atta sexdens sexdens* and *Atta capiguara*, which presented a spermathecal gland as well as an internal secretory epithelium, and *Atta sexdens piriventris*, which have only an internal secretory epithelium, and *Acromyrmex*: *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti*, which have only the internal secretory epithelium, were pointed out as being the most derived inside the group.

The morphological and molecular data of the spermathecae from the *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* and *Cyphomyrmex muelleri* species, cannot yet explain if the evolution would have substituted the external secretory cells (spermathecal gland) for the internal ones, or vice-versa, because the spermatheca of *Cyphomyrmex muelleri* (more basal), as well as *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa* (more derived), have an external spermathecal gland. Inside the derived group, the *Acromyrmex* species presented only an internal secretory epithelium, while the *Atta* genera, or an external spermathecal gland, or an internal secretory epithelium or both.

The morphological and molecular data could suggest the occurrence of a parallel evolution, i.e., independent of similar or identical characteristics, that in related lineages would be based on modifications of the same developmental steps. Since related species exhibit similar developmental stages, parallelism is frequent among them, and trends of parallel evolution are evident in almost all large groups.

I. INTRODUÇÃO GERAL

As formigas são consideradas os indivíduos de maior sucesso entre os Hymenoptera sociais nos aspectos diversidade, abundância e dispersão global. Presentes em quase todos os habitats, elas têm um importante papel, mantendo a estabilidade do ambiente, as condições do solo, polinizando as plantas e realizando a dispersão das sementes. Porém, quando o ambiente é alterado, esses insetos podem se tornar pragas incontroláveis (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As formigas cortadeiras são endêmicas da região neotropical e pertencem à tribo Attini, formada por espécies com hábito de cultivar o seu próprio alimento, um fungo que recebe tratamento especial por parte das operárias (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Estas formigas possuem em seus ninhos câmaras contendo esponjas ou jardins de fungos, e com eles mantêm uma relação de simbiose obrigatória, especialmente com os basidiomicetos (MARTIN *et al.*, 1969). As formigas propagam os fungos, alimentando-os com material vegetal cortado e inibindo o crescimento de organismos competidores (POWELL; STRADLING, 1986). Em compensação, os fungos lhes provêm enzimas e nutrientes (BASS; CHERRETT, 1996).

As formigas cultivadoras de fungo são fascinantes produtos da evolução através da seleção natural. Os ancestrais das formigas da tribo Attini cultivavam o fungo da família Lepiotaceae há aproximadamente 50 milhões de anos (WILSON,

1971; MUELLER *et al.*, 1998) e desde então uma espetacular irradiação tem ocorrido.

As formigas atines, que supostamente se originaram na América Equatorial há 50 milhões de anos, hoje ocupam desde o Sul da América do Norte até o Sul da América do Sul (MUELLER *et al.*, 2001). A principal dispersão em direção ao Norte começou com o estabelecimento da ligação pela América Central, há aproximadamente cinco milhões de anos (RICH; RICH, 1983). A distribuição geográfica, a frequência e a densidade das formigas da tribo Attini são fatores ligados às condições ambientais, ao tipo de vegetação, de solo e à precipitação média anual (PEREIRA *et al.*, 1997 apud RANDO; FORTI, 2005).

Existem cerca de 75 espécies de atines na Floresta Equatorial Tropical da Grande Amazônia, que inclui a Colômbia, e provavelmente muitas novas espécies ainda estão por ser descobertas. No Panamá a estimativa é de aproximadamente 35 espécies. O sul dos EUA é comparativamente muito pobre, contendo 15 espécies de atines, onde as espécies *Atta texana*, *Atta mexicana* e *Acromyrmex versicolor* são cortadeiras (MUELLER *et al.*, 2001).

A tribo Attini é composta por 12 gêneros, com pouco mais de 200 espécies descritas, sendo que todas são cultivadoras de fungo. Os gêneros *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* são considerados basais e caracterizam-se por apresentarem ninhos pequenos, colônias pouco populosas e indivíduos monomórficos. Já os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são considerados derivados e caracterizam-se por apresentarem ninhos grandes, colônias populosas e indivíduos polimórficos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

O gênero *Atta* destaca-se como o mais derivado da tribo com 14 espécies descritas, estando amplamente distribuído no continente desde a latitude 33° Sul (Sul do Brasil e Nordeste da Argentina) até 12° Norte (Texas, EUA) (WEBER, 1972). Diante da extensa distribuição geográfica as formigas *Atta* ou saúvas, como são popularmente conhecidas, caracterizam-se pela grande capacidade de migração e adaptação a diversos meios climáticos.

O gênero *Acromyrmex* representa as formigas cortadeiras conhecidas como quenquéns, contando com 63 espécies (MAYHÉ-NUNES, 1991), de ocorrência

própria da América, cuja distribuição abrange Califórnia (EUA), México, América Central, América do Sul (exceto Chile), Argentina (Patagônia), Cuba e Trinidad (Antilhas). No Brasil, de acordo com Gonçalves (1961), Fowler *et al.* (1986) e Fowler (1988), ocorrem 21 espécies e 11 subespécies deste gênero.

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* têm recebido atenção especial pelos danos que ocasionam ao cortarem e transportarem para os seus ninhos folhas de pastagens, florestas e plantas cultivadas, com consideráveis prejuízos para a agricultura e para a pecuária em diferentes regiões das Américas (FOWLER *et al.*, 1986). Elas apresentam alta capacidade de migração e adaptação a diversas condições ambientais, possuindo elevado número de espécies e grande diversidade. Em situações naturais, sua presença agindo como o principal animal herbívoro do ecossistema é muito importante ecologicamente. Estas formigas, ao escavarem os ninhos em solos úmidos, provocam uma reciclagem de nutrientes, especialmente quando estes estão muito profundos, tornando possível o estabelecimento de uma variedade maior de plantas no local e contribuindo também para a manutenção da biodiversidade da região (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As atines basais provêm seus fungos simbioses com restos de plantas, de insetos adultos mortos e de larvas, ou ainda uma mistura que pode incluir sementes (WEBER, 1972) ou partes de plantas frescas que se desprendem dos vegetais e caem no solo (OLIVEIRA, 1999). Somente as atines derivadas cortam ativamente as folhas das plantas vivas, razão pela qual são chamadas de formigas cortadeiras, algumas das quais consideradas pragas agrícolas.

Entre as atines mais derivadas e as mais basais existe uma notável diferença com relação à capacidade de reprodução. As derivadas possuem colônias geralmente com uma rainha e mais de um milhão de indivíduos polimórficos, podendo chegar a cinco milhões de operárias, enquanto que as basais apresentam colônias com uma rainha e no máximo 50 indivíduos monomórficos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Esta diferença é fundamental para a atividade das cortadeiras pragas agrícolas, e está diretamente relacionada à grande quantidade de vegetação que estas formigas utilizam para manter as suas grandes colônias.

Estudos têm revelado que cerca de 99,95% das fêmeas reprodutivas de saúvas, depois de fecundadas, não conseguem formar um novo ninho (MARICONI,

1970). No entanto, este fato, somado à ação de seus inimigos naturais, ainda não consegue diminuir o número de colônias destas formigas no ambiente, exigindo a necessidade de outros tipos de controle.

As formigas são insetos sociais em cujas colônias os machos têm função reprodutora e as fêmeas, além desta, diversas outras relacionadas ao cuidado geral do ninho. Entre as fêmeas de formigas podem-se distinguir basicamente dois tipos de indivíduos: as rainhas, consideradas as fêmeas reprodutivamente funcionais, e as operárias, geralmente indivíduos estéreis e com funções voltadas para o cuidado com a cria, forrageamento, defesa e limpeza do ninho (PASSERA, 1984).

A colônia é, geralmente, iniciada por uma única rainha (iça ou tanajura), fenômeno este conhecido como haplometrose. Esta é a fêmea reprodutivamente funcional, visto que as operárias são estéreis (HÖLLBOBLER; WILSON, 1990).

Na tribo Attini a colônia, depois de formada, tende a permanecer monogínica, isto é, haverá sempre a presença de uma só rainha, que também será a única fonte de ovos disponível na colônia, e conseqüentemente única fonte de novos indivíduos. Este fato implica que a diversidade genética da colônia pode ser aumentada com o acasalamento da rainha com múltiplos machos, comportamento que pode gerar custos devido à prolongada exposição a predadores durante o vôo nupcial (WEBER, 1972; FOWLER *et al.*, 1986).

Estudos já realizados mostraram que as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* apresentam a maior frequência de acasalamento de rainhas encontrada entre as formigas, com uma razão efetiva de acasalamento igual a dois (*Atta*) e quatro (*Acromyrmex*) (FJERDINGSTAD *et al.*, 1998; BOOMSMA *et al.*, 1999; BEKKEVOLD *et al.*, 1999). Estes resultados sugeriram que a evolução das atines caminhou no sentido de aumentar a habilidade de cópula das rainhas, que poderia estar relacionada a um aumento na capacidade das espermatecas de manter os espermatozoides viáveis por mais tempo. O número de espermatozoides encontrado na espermateca de algumas espécies de formigas ultrapassa a 300 milhões, sendo que cada macho tem capacidade de produzir e transferir para a fêmea cerca de 40 a 80 milhões deles (KERR, 1962).

Dentro da ordem Hymenoptera, o número de ovos postos e o período de tempo em que estes são produzidos é extremamente variável, o que leva a uma

diferença na quantidade de espermatozóides necessários para a fecundação e no tempo de seu armazenamento pelas fêmeas. Dependendo da espécie considerada, o intervalo entre a inseminação e a fecundação pode variar de poucas horas a muitos anos. Este grande período para a fecundação é devido, pelo menos em parte, à longevidade dos espermatozóides, visto que certas espécies de formigas podem levar até 15 anos para fertilizar seus ovos (WHEELER, 1910) e de abelhas (*Apis mellifera* L.) até sete anos (TABER; BLUM, 1960).

O sistema reprodutor feminino nos insetos, além de receber e estocar os espermatozóides, tem por função a produção de ovos (GILLOT, 1980), e possui um par de ovários compostos por unidades funcionais denominadas ovaríolos. O conjunto de ovaríolos se une na região proximal para formar o oviduto lateral, um para cada ovário (CHAPMAN, 1998; GILLOT, 1980). Os dois ovidutos laterais se unem formando o oviduto comum, constituído internamente por epitélio revestido de cutícula e externamente por musculatura. O oviduto comum normalmente sustenta a espermateca, também chamada de receptáculo seminal, que armazena os espermatozóides e possui uma organização peculiar para cada grupo considerado (WIGGLESWORTH, 1964).

A espermateca é um órgão de origem ectodérmica e, portanto, encontra-se delineada internamente por cutícula (ENGELMANN, 1970). Consiste basicamente de uma bolsa armazenadora, onde freqüentemente podem ser observadas glândulas a ela associadas (glândulas espermatecais), as quais produzem secreções que provêm um microambiente com pH apropriado, constituição iônica ideal, nutrientes, além de outros fatores necessários à manutenção dos espermatozóides. Em alguns insetos estas glândulas podem estar ausentes, aí então o próprio epitélio que reveste a espermateca executa a função secretora. Em muitos insetos, como abelhas, besouros e outros insetos, a porção distal da espermateca se especializa na produção de secreção e é também denominada glândula espermatecal (DALLAI, 1975; HAPP; HAPP, 1975).

Após a cópula, a transferência dos espermatozóides para a espermateca pode ser de forma indireta, através de uma estrutura especializada produzida pelas glândulas acessórias masculinas denominada espermatóforo, predominante em vários insetos (LAY *et al.*, 1999). Em alguns casos, os espermatozóides saem do

espermatóforo através de um poro e em outros através da ruptura do próprio (CHAPMAN, 1998). Em Orthoptera o espermatóforo consiste de um bulbo que permanece no macho e de uma porção tubular que é transferida para a fêmea durante a cópula (MANN, 1984). A transferência dos espermatozóides para a espermateca pode ser também realizada diretamente, como em *Drosophila*, com a ajuda de uma bomba de esperma (LAY *et al.*, 1999). Nesse caso, para alguns autores a transferência dar-se-ia através de um estímulo químico, enquanto que para outros por meio de movimentos passivos (CHAPMAN, 1998).

Em geral, a espermateca consiste de bolsa única, podendo haver variações dependendo da espécie considerada. Em Díptera podem ocorrer duas, como em *Phebotamus*, ou três, porém existem registros da presença de até quatro em algumas espécies. Dentre os insetos, de maneira geral, a forma, arranjo e número de espermatecas estariam diretamente relacionados com uma adaptação específica de cada grupo de acordo com sua biologia reprodutiva (MATSUDA, 1976). A espermateca de *Acromyrmex subterraneus* é uma bolsa bilobada que se abre num ducto no oviduto comum. A parede do ducto espermatecal é formada por epitélio. Nas rainhas de formigas *Diacamma* sp a espermateca apresenta um reservatório esférico, revestido por um epitélio cilíndrico e por uma fina cutícula, esta última em contato direto com o lúmen. As glândulas espermatecais encontram-se localizadas dorsalmente em relação ao reservatório (ALLARD *et al.*, 2005).

As células secretoras da espermateca, quando observadas ultraestruturalmente, apresentam uma cavidade em forma de cálice no seu domínio apical, com membrana repleta de microvilos nesta região. Essa cavidade é conectada a um poro na íntima cuticular da espermateca, através de um ducto também cuticular. Em alguns insetos existe um ducto e um poro secretor associado a cada célula secretora, como é o caso de *Periplaneta americana*. Em outros, como em besouros *Tenebrio molitor*, vários ductos podem se abrir em um poro único, ou em outros casos podem ainda estar ausentes, como em *Rhodnius prolixus*, onde a célula é simplesmente recoberta por uma cutícula.

O ducto intracitoplasmático (aparelho terminal) das células secretoras possui fina e descontínua cutícula e é circundado por numerosas e profundas

invaginações da membrana plasmática da célula glandular, as quais coletam a secreção, assim como em *Apis mellifera* (CRUZ-LANDIM; SERRÃO, 2002).

Happ e Happ (1970, 1977) estudaram a diferenciação e a organização estrutural da glândula espermatecal em muitos insetos. De acordo com estes autores, cada unidade da glândula seria formada por três tipos celulares. O primeiro seria secretor e produziria a cutícula do canalículo intracitoplasmático. O segundo secretaria a cutícula do ducto eferente e o terceiro formaria o epitélio que delimitaria o lúmen da glândula. Estas células glandulares seriam da classe III, segundo classificação de Noirot e Quenedey (1991). Camargo e Mello (1970) e Dallai (1972), através de diversos estudos, descreveram a composição da secreção da glândula espermatecal das abelhas de mel e encontraram o mesmo padrão proposto por Happ e Happ (1970) para outros insetos, ou seja, glicoprotéica.

As funções básicas das secreções espermatecais têm sido ainda pouco estudadas, porém alguns autores têm sugerido que a função primordial seria a de nutrir e manter viáveis os espermatozóides, durante o período que vai desde a cópula até a fecundação dos ovos (BERRY, 1985; BAO; DOLBER, 1998).

A espermateca dos insetos produz diferentes compostos como glicoproteínas e glicosaminoglicanas (HAPP; HAPP, 1970). Estas últimas contêm substâncias quimiotáticas responsáveis pelo transporte e migração dos espermatozóides da bursa copulatrix da fêmea até a espermateca no coleoptera *Anthomus grandis*, podendo a secreção então produzida agir sobre a motilidade e a capacidade de fecundação dos espermatozóides (GRODNER; STEFFENS, 1978).

A espermateca e as secreções nela contidas estão envolvidas na capacitação dos espermatozóides em *Ceratitis capitata* (Díptera), segundo Bao e Dolber (1998), uma vez que os mesmos são mantidos no interior desse órgão por períodos variáveis, antes de ocorrer a fecundação dos ovos. Portanto, a importância desta secreção para a fecundação basear-se-ia no fato de que a remoção da glândula espermatecal levaria a uma perda gradual da motilidade dos espermatozóides e a um esvaziamento espermatecal (VILLAVASO, 1975; KAULENAS, 1992; GILLOT, 2003).

Varna (1955) estudou a variação e peculiaridades da forma e do tamanho da espermateca de 68 diferentes espécies de 13 subfamílias de Chrysomelidae e observou que a espermateca não só poderia auxiliar na seleção de caracteres que

diferenciassem as várias subfamílias, como, possivelmente, poderia servir para distinguir gêneros e espécies. Mais tarde Suzuki (1988) apresentou uma revisão sobre a morfologia e a homologia do sistema reprodutor feminino em Chrysomelidae e verificou que a espermateca seria o órgão mais diversificado e, como em muitos outros grupos de insetos, constituir-se-ia de três partes essenciais: reservatório, ducto espermatecal e glândula.

Estudos sobre a anatomia, histologia e ultra-estrutura de espermateca de insetos sociais são mais complexos, visto que os mesmos apresentam, na sua grande maioria, diferenças entre rainhas e operárias com conseqüentes diferenças no tamanho, na composição morfológica e na secreção nela contida (PEETERS *et al.*, 1999).

A análise das espermatecas, de forma geral, poderia ser uma excelente ferramenta para estudos filogenéticos, cujos resultados obtidos poderiam ser extremamente significativos, uma vez que a análise filogenética das formigas é tradicionalmente baseada apenas na morfologia das larvas (SCHULTZ; MEIER, 1995) ou dos machos adultos (BORGMEIER, 1950), e os caracteres levantados a partir destas análises não seriam suficientemente informativos para proporcionar uma boa resolução nas árvores geradas (SCHULTZ; MEIER, 1995).

Como todos os conceitos importantes, a evolução gera controvérsia e tem sido usada como base ou fundamento intelectual para pontos de vista filosófico, ético, social ou biológico. Segundo Futuyma (2002), o termo evolução biológica seria definido como a mudança nas propriedades das populações dos organismos que transcenderiam o período de vida de um indivíduo. A ontogenia de um indivíduo não seria considerada evolução; organismos não evoluiriam individualmente. As mudanças consideradas evolutivas nas populações seriam aquelas herdáveis via material genético, de uma geração para outra. A evolução biológica abrangeria desde pequenas mudanças na proporção de diferentes alelos dentro de uma população até alterações sucessivas, as quais levariam os primeiros proto-organismos a se transformarem em organismos.

Questões evolutivas fundamentais sobre as formigas atines permanecem sem resposta devido ao pobre entendimento de suas relações filogenéticas (SCHULTZ; MEIER, 1995). As relações entre os gêneros de atines propostas em

pesquisas anteriores mostram pouca concordância. Wheeler (1910), por exemplo, propôs que o gênero *Myrmicocrypta* seria o mais basal entre as atines, porém Weber (1972) e Hölldobler e Wilson (1990) consideraram que *Cyphomyrmex* o seria. Emery (1912) apresentou uma árvore filogenética da tribo Attini descrevendo a dicotomia basal, com os gêneros *Myrmecocrypta* e *Apterostigma* em um ramo e todos os demais da tribo Attini em outro. Já Kusnezov (1963) propôs que os gêneros *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* e *Mycocepurus* seriam gêneros basais e considerou *Cyphomyrmex* como intermediário. Entre todas as propostas de filogenia existe uma concordância de que os gêneros *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta* seriam aqueles considerados derivados (WHEELER, 1910; HÖLLDOBLER; WILSON; 1990; EMERY; 1912; KUSNEZOV, 1963).

Seqüências de DNA ribossomal ou de DNA mitocondrial têm sido freqüentemente utilizadas no estudo filogenético das formigas, estabelecendo as relações entre gêneros, tribos ou subfamílias (WARD; BRADY, 2003; WETTERER *et al.*, 1998).

O DNA mitocondrial apresenta características interessantes para estudos evolutivos. Possui herança exclusivamente materna, o que impede a recombinação, grande taxa evolutiva e polimorfismo intra-específico, tornando-o uma molécula eficaz para estudos filogenéticos (AVISE *et al.*, 1987). Algumas hipóteses foram lançadas para tentar explicar esta grande taxa evolutiva: (1) o relaxamento funcional, pois não codifica proteínas diretamente envolvidas em sua replicação e transcrição, e a codificação de apenas 13 polipeptídeos o torna capaz de tolerar alguma imprecisão durante a tradução; (2) a grande taxa de mutação devido à ineficiência dos mecanismos de reparo e a exposição a radicais livres no interior da mitocôndria e (3) a não associação a proteínas histônicas como o DNA nuclear (AVISE, 2001).

As formigas da tribo Attini vêm sendo cada vez mais estudadas do ponto de vista filogenético, tendo como principal marcador o DNA mitocondrial (WETTERER *et al.*, 1998; SILVA-PINHATI *et al.*, 2004).

Resultados preliminares apontam uma região muito apropriada para estudos evolutivos de subespécies e de populações de formigas. Especificamente nas atines seria a do espaçador intergênico (IGS), localizado entre os genes codificadores do Citocromo Oxidase I (COI) e do RNA transportador de Leucina (Leu-tRNA).

Estabelecer a filogenia das formigas atines auxiliaria nas respostas de algumas questões evolutivas sobre a relação destas com seus fungos. Enquanto que a maioria das atines cultiva fungos na forma de micélio, a espécie *Cyphomyrmex rimosus* cultiva fungo na forma de levedura, formando um clado basal, caracterizando o cultivo de levedura como uma condição basal entre as atines, como sugerido por Weber (1972). Entretanto, Wetterer *et al.* (1998) propuseram que *Apterostigma* e *Mycocepurus* é que seriam os gêneros mais basais, e o cultivo de levedura por *C. Rimosus*, portanto, passaria a ser uma característica derivada.

Muitas outras questões envolvendo a filogenia das formigas da tribo Attini merecem mais atenção. Desta forma, a análise da estrutura das espermatecas em diferentes gêneros basais e derivados da tribo Attini poderia contribuir para elucidar a sua história evolutiva.

II. OBJETIVOS

Diante das informações expostas, e dada a importância econômica dos insetos em questão para a agro-economia, principalmente sob o ponto de vista reprodutivo, o presente estudo teve como objetivos principais:

1. Realizar análises morfo-histológicas das espermatecas de rainhas de formigas das espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, com vistas a trazer a luz informações sobre essa importante estrutura na biologia reprodutiva destes insetos.
2. Fazer análises histoquímicas com vistas a detectar os possíveis componentes produzidos pelas células (proteínas, lipídios e carboidratos) para compor as secreções espermatecais.
3. Correlacionar as informações obtidas através das seqüências de DNA com a posição filogenética de cada um dos gêneros da tribo Attini estudados.
4. Fazer a correlação dos dados morfológicos da espermateca e moleculares obtidos através das seqüências de DNA mitocondrial, na tentativa de contribuir para o estabelecimento da possível filogenia deste grupo de insetos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MATERIAL

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizadas rainhas de formigas das espécies *Atta sexdens rubropilosa* (exemplares coletados na região de Rio Claro e Botucatu – SP/Brasil), *Atta laevigata* (exemplares cedidos pelo Prof. Dr. Odaír Corrêa Bueno – Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP/Brasil), *Atta sexdens sexdens* (exemplares cedidos pelo Prof. Dr. Jacques Delabie e coletados na CEPLAC – Ilhéus/Bahia/Brasil), *Atta sexdens piriventris* (exemplares cedidos por Fábio Moreira Link e coletados em Santa Maria/RS/Brasil), *Atta capiguara* (exemplares cedidos pelo Prof. Dr. Fernando Pagnocca – Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP/Brasil) *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Mycocepurus goeldii* (coletadas em ninhos localizados no Campus da UNESP de Rio Claro/SP/Brasil) e *Cyphomyrmex muelleri* e *Apterostigma* sp. (exemplares cedidos pelo Prof. Dr. Ulrich Mueller – Universidade do Texas – Austin/EUA). Para a análise foram utilizados os equipamentos disponíveis nos laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia, e do CEIS - Centro de Estudo de Insetos Sociais da UNESP, Campus de Rio Claro/SP/Brasil.

Os exemplares, depois de anestesiados por choque térmico, tiveram suas espermatecas retiradas em placa de Petri contendo solução fisiológica para insetos

(NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L; pH 7.2), com o auxílio de pinças de ponta fina e micro-tesouras cirúrgicas, para serem posteriormente submetidos às diferentes técnicas.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ

III.2.1.1. Análises Morfológicas:

III.2.1.1.1. Técnica da Hematoxilina de Harris - Eosina Aquosa (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As espermatecas foram fixadas em Paraformaldeído 4% durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada em série de álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição, onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145.

As secções de 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C e coradas com Hematoxilina de Harris durante 10 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos para ocorrer a reação com o corante e, a seguir, coradas com Eosina durante 5 minutos. Após nova lavagem em água corrente para retirada do excesso do corante, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2. Análises Histoquímicas:

III.2.1.2.1. Azul do Nilo para detecção de lipídios ácidos (Segundo PEARSE, 1985):

As espermatecas foram fixadas em Formol Ca 1% durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada em série de álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição, onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145. As secções de 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C por 24 horas.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas no corante à 37° por 5 minutos, a seguir foram lavadas em água corrente e, posteriormente, colocadas em ácido acético 1% por 1 minuto. Depois de secas, foram montadas em gelatina glicerinada para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.2. Sudan Black B para detecção de lipídios totais (Segundo PEARSE, 1985):

As espermatecas foram fixadas em Formol Ca 1% durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada em série de álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição, onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145. As secções de 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C por 24 horas.

Posteriormente as lâminas foram lavadas em álcool 70% e, na sequência foram colocadas no corante por 30 minutos. A seguir, foram novamente lavadas em álcool 70% e água destilada para a retirada do excesso do corante. Logo após, foram

contra-coradas com vermelho neutro durante 1 minuto e lavadas. Foram secas e montadas em gelatina glicerinada para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.3. PAS/Azul de Alcian para detecção de polissacarídeos neutros e ácidos (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As espermatecas foram fixadas em Bouin Aquoso durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada em série de álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição, onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145. As secções de 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C por 24 horas.

As lâminas foram coradas com Alcian Blue pH 2,5, durante 30 minutos e, posteriormente, lavadas com água destilada. A seguir, foram colocadas em ácido periódico 1% durante 5 minutos e novamente lavadas em água destilada. As lâminas foram colocadas no reagente de Schiff, onde permaneceram por 30 minutos, sendo a seguir submetidas à lavagem em água corrente por 10 minutos. Logo após, foram contra-coradas com Hematoxilina por 2 minutos e lavadas em seguida. Foram secas e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.4. Azul de Bromofenol para detecção de proteínas totais (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As espermatecas foram fixadas em Paraformaldeído 4% durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada em série de álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição, onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145. As secções de 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C por 24 horas.

As lâminas foram coradas pelo Azul de Bromofenol durante 1 hora, à temperatura ambiente. Logo após, foram lavadas com ácido acético 0,5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos e, a seguir, foram passadas rapidamente por uma solução de álcool butílico. Foram secas e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.5. Ninhidrina Schiff para detecção de proteínas (Segundo PEARSE, 1985).

As espermatecas foram fixadas em Carnoy durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada em série de álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição, onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145. As secções de 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C por 24 horas.

As lâminas foram coradas pela Ninhidrina 0,5% em etanol absoluto por 20 minutos a 37°C. A seguir, foram colocadas no reagente de Schiff por 30 minutos. Posteriormente fez-se a contra-coloração com Hematoxilina. Foram secas e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

III.2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

As espermatecas foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) por 24h e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (70-100%) por 5 minutos cada. O material foi levado ao ponto crítico, colado em suporte de alumínio, onde recebeu banho de ouro, e posteriormente, foi examinado ao Microscópio Eletrônico de Varredura PHILLIPS 505 SEM.

III.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As espermatecas das rainhas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 24 horas, à 4°C. A seguir, passaram por duas lavagens de 15 minutos cada em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 1% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 2 horas, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens de 15 minutos cada em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M e foi contrastado em solução de acetato de uranila 2% com acetona 10%, por 2 a 4 horas no escuro.

A desidratação foi realizada em série crescente de acetona 50% a 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material foi colocado em mistura de acetona e resina (1:1) onde permaneceu por 12 horas. O material foi incluído em resina pura contendo catalisador e colocado em estufa à 60°C por um período de 48 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo. As secções foram coletadas em grades de cobre e passaram por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. As grades foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILLIPS 100 TEM, onde procedeu-se também a documentação fotográfica.

III.2.3. ANÁLISES MOLECULARES

III.2.3.1. Extração de DNA com TNES

III.2.3.1.1. Lise

As formigas das espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Apterostigma* sp., *Cyphomyrmex muelleri* e *Mycocepurus goeldii* foram individualmente processadas, sendo utilizados dois indivíduos representantes destas

espécies. Os espécimens foram divididos em 3 partes, cabeça, tórax e gáster e cada uma foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, congelada imediatamente em nitrogênio líquido e triturada com o auxílio de pistilo plástico. O material triturado foi colocado em tampão TE (pH = 8,0). Uma solução de TNES foi colocada no gelo por 5 minutos. Colocou-se 50 µL de solução em um Eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se um pequeno fragmento do tecido no tubo. Com o auxílio de uma ponteira com a ponta previamente fechada em chama, a amostra foi homogeneizada, mantendo o Eppendorf no gelo, acrescentando-se mais 700 µL de solução de TNES. Adicionou-se 5 µL de proteinase K (20mg/mL) levando a amostra à incubadora por 3 horas a 55°C para que ocorresse a digestão.

III.2.3.1.2. Tratamento com RNase A

Após a amostra retornar à temperatura ambiente, acrescentou-se 5 µL de RNase A (4mg/mL), incubando em seguida a 37°C por 30 minutos.

III.2.3.1.3. Precipitação de Proteínas

Após a amostra retornar à temperatura ambiente adicionou-se 280 µL de NaCl 5M, agitando no Vortex por 20 segundos e centrifugando a amostra a 15000xg por 5 minutos.

III.2.3.1.4. Precipitação de DNA

Foi colocado 600 µL de isopropanol 100% em um Eppendorf de 1,5 mL. O sobrenadante com DNA, obtido através da centrifugação descrita acima foi transferido para este Eppendorf, sendo que aquele com o pellet de proteína foi descartado. O tubo Eppendorf contendo o DNA foi invertido 50 vezes e centrifugado a 15000xg por 3 minutos, e logo após o sobrenadante foi descartado com auxílio de bomba de vácuo. Em seguida foi adicionado 600 µL de etanol 70% e o Eppendorf foi

invertido 30 vezes e centrifugado a 15000xg por 3 minutos. O etanol foi então descartado na bomba de vácuo sem deslocar o pellet e o Eppendorf secou naturalmente em temperatura ambiente.

III.2.3.1.5. Hidratação do DNA

Adicionou-se 35 µL de DNA Hydration Solution (tampão TE) ao pellet de DNA, guardando a amostra a -80°C, visto que nestas condições o DNA permanece inalterado por mais de um ano.

III.2.3.1.6. Eletroforese em Gel de Agarose

O gel foi preparado a 1% de agarose em tampão TBE 1X. Em seguida a agarose foi dissolvida em forno microondas, em potência baixa. A fonte de energia e a cuba de eletroforese foram então preparados selando as extremidades do gel com as cunhas metálicas e colocando o pente escolhido. Adicionou-se, logo após, 0,5 µL de brometo de etídio (EtBr) à agarose e o gel foi derramado na base e carregado, misturando-se 2 µL de Loading Buffer em um volume de 2 µL de DNA ressuspenso em TB para cada amostra. Finalizando o procedimento de eletroforese, os eletrodos foram conectados nos terminais da cuba e da fonte, de forma que o DNA se deslocasse do pólo negativo para o positivo.

III.2.3.2. Amplificação da Região Mitocondrial

A região do genoma mitocondrial correspondente aos genes Citocromo Oxidase I (COI), Espaçador Intergênico (IGS), RNA transportador de Leucina (Leu-tRNA) e Citocromo Oxidase II (COII) foi amplificada através de reações de PCR. Cada reação conteve 0,1 µg de DNA genômico, 1 pmol de cada iniciador, 1 porção de reagente PCR Ready-to-Go (Amersham 27-9555-01) e foi incluída uma desnaturação (94 °C, 3 min) seguida de 30 ciclos de PCR (94° C-10 seg, 37° C-1 min,

72 °C-3 min). Foram utilizados os iniciadores Jerry (TGTAAGCGGGGGAAGCTTGAATCGGGGTAC) e Marilyn (TGGATTCCGCGT-GGTACCTCCCGGCCACC).

III.2.3.3. Purificação e Seqüenciamento de DNA

Os marcadores amplificados foram purificados com a utilização do Kit da Ultra Clean PCR Clean-Up – MOBIO. Em seguida o DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. A reação de seqüenciamento conteve 100 ng de amplicon purificado, 1 pmol de iniciador e 2,0 µL de Big Dye (PE Applied Biosystems 4303153), 2 µL Tris 100 mM com MgCl₂ 2,5 mM, pH 9.0, em um volume final de 10 µL, e foi conduzida com desnaturação inicial (90 seg a 96° C), seguida de 25 ciclos de PCR (12 seg a 96° C, 6 seg a 50° C, 4 min a 60° C). Após a reação, os produtos de seqüenciamento foram purificados conforme recomendado pelo fabricante e separados em gel de poliacrilamida em seqüenciador ABI 377 (PE Applied Biosystems, alocado no CEIS-Centro de Estudos de Insetos Sociais-UNESP- Rio Claro, SP).

III.2.3.4. Análises Filogenéticas

As seqüências obtidas foram editadas com o aplicativo BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999) e alinhadas com o programa Clustral (THOMPSON *et al.*, 1994). Como grupo externo foi utilizada a espécie *Wasmannia auropunctata*. Para a obtenção das árvores filogenéticas as seqüências foram submetidas à análise de Máxima Parcimônia (MP) com o aplicativo PAUP 4b10 (SWOFFORD, 2003) através de 1000 buscas heurísticas e o mesmo peso para todos os caracteres. O suporte dos ramos das árvores foi estimado através da análise de *bootstrap* (BS) (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 pseudo-réplicas.

IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo estão apresentados na forma de artigos, os quais foram submetidos e/ou já publicados em periódicos especializados:

Capítulo 1: “Spermatheca of four species of ants of the Tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological Specialization”. Publicado no periódico *Research Journal of Biological Sciences.*, v. 2, p. 5-12, 2007.

Capítulo 2: “Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae)”. Publicado no periódico *American Journal of Agricultural and Biological Science.*, v. 1, p. 58-65, 2006.

Capítulo 3: “Phylogenetic study on attines ants based on the morphology of spermathecae and molecular biology (Hymenoptera: Myrmicinae)”. Submetido ao periódico *Journal of Morphology* (2007).

Capítulo 4: “Virgin queens (gynes) of *Atta capiguara* (Hymenoptera: Myrmicinae): A morphological study regarding the phylogeny of the spermathecae”. Submetido ao periódico *Acta Zoológica* (2007).

CAPÍTULO 1

TÍTULO: “Spermatheca of four species of ants of the Tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological Specialization”.

AUTORES: Gabriela Ortiz¹ and Maria Izabel Camargo-Mathias²

^{1,2} Departamento de Biologia – Instituto de Biociências- UNESP, Av. 24A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19) 3524-0009.

Artigo publicado no periódico: *Research Journal of Biological Sciences.*, v. 2, p. 5-12, 2007.

RESUMO

A função da espermateca nos insetos é estocar os espermatozóides desde o momento da cópula até a fecundação dos ovos. Este órgão consiste de uma bolsa que frequentemente possui glândulas associadas. As formigas *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti balzani* são espécies consideradas pragas e causam sérios danos econômicos à diversas plantações. As espermatecas das rainhas das quatro espécies aqui analisadas através de técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Histologia e Histoquímica possuem forma de bolsa bilobada que se funde parcialmente na sua porção central. Em *Atta sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex landolti balzani*, grupos de células secretoras formam a glândula espermatecal, a qual encontra-se ausente em *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex balzani*. Nestas duas últimas as células secretoras apresentaram-se sob a forma de um epitélio secretor simples revestindo completamente o interior da espermateca. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que as espermatecas destas espécies de formigas possuem diferenças morfológicas. Assim sendo, a espermateca de *Acromyrmex landolti* apresentou um epitélio secretor interno constituído de células prismáticas em toda sua extensão, sugerindo que a secreção seja produzida uniformemente por todas as células. A espermateca da espécie *Acromyrmex balzani* apresentou uma diferenciação do epitélio secretor interno em duas porções com células com formas: cúbica e prismática, sugerindo que a maior produção da secreção, provavelmente, esteja ocorrendo na porção prismática do epitélio. A espécie *Acromyrmex landolti balzani* apresentou o epitélio secretor interno e a glândula espermatecal (externa), enquanto que *Atta sexdens rubropilosa* apresentou apenas a glândula espermatecal.

PALAVRAS-CHAVE: espermateca, histologia, histoquímica, glândula espermatecal, Attini.

Spermatheca of Four Species of Ants of the Tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological Specialization

G. Ortiz and M.I. Camargo-Mathias

Departamento de Biologia da UNESP, Instituto de Biociências,
Avenida 24-A, n 1515 Cep: 13506-900, Rio Claro SP, Brasil

Abstract: The function of the insects spermatheca is to store the spermatozoa from the time of copulation until the fertilization of the eggs. This organ consists of a sac, usually associated to glands. The ants *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti balzani* are species considered pests and cause serious economical damages to several crops. Queens' spermatheca of these four species were analyzed through techniques of Scanning Electron Microscopy (SEM), histology and histochemistry. It was verified that these structures had the morphology of a sac consisting of two lobes, which fusing at the median region. In *A. s. rubropilosa* and *A. l. balzani*, groups of cells with secretory characteristics form the spermathecal gland, but were absent in *A. landolti* and *A. balzani*. In these latter species the secretory cells are arranged like a single epithelium forming an internal coat inside the spermatheca. The results obtained in the present work shows that the spermatheca of these species of ants have morphological differences. In this sense, the spermatheca of *A. landolti* presents an internal secretory epithelium of columnar morphology throughout its extension, thus suggesting that all the cells would produce the secretion. The spermatheca of the one *A. balzani* presented an internal secretory epithelium with columnar and cubical portions, where a greater secretion likely occurs at the columnar one. *A. l. balzani* presents internal secretory epithelium and external spermathecal gland connected by a duct, while *A. s. rubropilosa* presents only the spermathecal gland.

Key words: Spermatheca, histology, histochemistry, spermathecal gland, attini

INTRODUCTION

Leaf-cutting ants are the main agricultural pests of the neotropical region and their control can be performed through the use of chemical substances of low specificity that accumulate in the environment.

These ants are represented by some species of the genera *Atta* and *Acromyrmex*, which are the most derived of the tribe Attini and whose colonizing success of agricultural crops is attributed to their great voracity and capability to proliferate.

Ant queens live unusually long for insects, which generally have short lives. They store viable spermatozoa for a decade or more and produce workers and reproductives over such long periods, that almost certainly has contributed to the propensity for ants to evolve diverse life histories that been so successful in a wide range of environments. After mating, which occurs in a few minutes during the mating flight, a queen is capable of storing viable spermatozoa for dozens of years; these spermatozoa will

be gradually used to fertilize the eggs and thus originate all the individuals of the colony.

The ability to store spermatozoa releases from the risk and energy expenditure involved in finding subsequent mates (Thornhill and Alcock, 1983). Maintenance of spermatozoa viability can be a critical aspect of female reproduction in insects, yet the mechanisms mediating this phenomenon are poorly understood.

The maintenance of these spermatozoa for such a long time requires the presence of a specialized organ in the queens, known as spermatheca which presents a particular organization for each phylogenetic group that has been studied.

The spermatheca is an organ of ectodermic origin and it is internally coated with cuticle. It basically consists of a storage sac, often accompanied by associated glands, known as spermathecal glands, which produce secretions that allow the maintenance of a microenvironment of appropriate pH, ideal ionic constitution and nutrients, in addition to other factors necessary for the survival of the spermatozoa. In

some insects these glands might be absent and the internal coating epithelium performs the secretory role (Davey, 1985).

Generally, the spermatheca consists of a single sac, but two have been observed in *Blaps* (Coleoptera) and *Phlebotomus* (Diptera) and three occur in the most derived flies (Chapman, 1998). In ants in general only one spermatheca has been described.

The basic functions of the spermathecal secretions have been poorly studied, however, some observations suggest that their main function would be to maintain the viability of the spermatozoa during the time of mating until the fertilization of the eggs (Berry, 1985). The spermatozoa of insects become active inside the spermatheca and may remain there for several months or up to several years.

In view of the all the facts described above and given the economical importance of these insects, the present work had the object of carrying out a study of the spermatheca of queen ants of *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti balzani* through the use of the techniques of Scanning Electron Microscopy (SEM), histology and histochemistry. The specific aim of this study is to show a morphological diversity between the spermatheca in ants of the tribe Attini.

MATERIALS AND METHODS

Mated queens of ants of the sp. *A. landolti*, *A. balzani* and *Acromyrmex landolti balzani* were collected from nests in the campus of the UNESP in Rio Claro, SP-Brazil and queen ants of *Atta sexdens rubropilosa* were collected in the region of Botucatu, SP-Brazil. The equipments used are available in laboratories of Histology of the Biology Department, Biosciences Institute, UNESP, campus in Rio Claro, SP-Brazil.

Scanning Electron Microscopy (SEM): The spermatheca were removed from the *A. s. rubropilosa* queens, fixed in Karnovsky for 24 h and dehydrated in a graded 70-100% ethanol and acetone series. The material was critical point dried, sputtered with gold and examined under a Phillips SEM 505.

Histology: The spermatheca from queens of all species were removed, fixed in paraformaldehyde, dehydrated a graded 70-95% alcohol series and embedded in JB-4 resin at 4°C in the dark. Then they were placed in plastic molds at 4°C in order to delay premature

polymerization. The plastic molds containing the material were filled with JB-4 resin and polymerization was completed at room temperature. The sections were placed on clean glass slides and air dried. Then they were stained with hematoxylin-eosin, just applied in *Atta sexdens rubropilosa*.

Histochemistry: Individuals were cold anesthetized and dissected in saline solution. The spermatheca were fixed in paraformaldehyde. Dehydration was performed in a standard alcohol series (70, 80, 90 and 95%) at 15 min intervals. The material was embedded in resin and sectioned to a 3 µm thickness. The sections were arrayed on glass slides and stained with PAS/Aleian Blue (for the detection of polysaccharides) for all four studied species, Bromophenol Blue (for protein detection) just applied in the sp. *Acromyrmex landolti balzani* and Sudan Black B (for lipids detection) just applied in *Atta sexdens rubropilosa*.

RESULTS

Morphology: The morphological studies with spermatheca of *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti balzani* revealed that in the four species this structure was located at the beginning of the common oviduct. In all four species, the spermatheca appeared as a bi-lobed sac that fuses partially at the median region and thus present a common lumen (Fig. 1A) and an ample reservoir for the storage and maintenance of the spermatozoa.

Figure 1 B illustrates the morphology of the spermatheca of queen ants of *Atta sexdens rubropilosa*, which is the same observed in the other three species. In the sp. *A.s. rubropilosa* and *A.l. balzani* the spermatheca was divided into two distinct regions: a) an external secretory portion composed by rounded or elongated cellular groups (resembling acini), denominated spermathecal glands and b) a reservoir (Fig. 1B). In *A. s. rubropilosa* the spermathecal gland was only located at the region of fusion of the two spermathecal lobes, while in *A.l. balzani* this gland coated the whole upper portion of the spermatheca. In the sp. *A. landolti* and *A. balzani* there was no subdivision of the spermatheca into two portions, given that the secretory portion was only found coating the reservoir internally.

Histology and histochemistry: In order to obtain a better understanding and visualization the histological and histochemical results were summarized in Table 1.

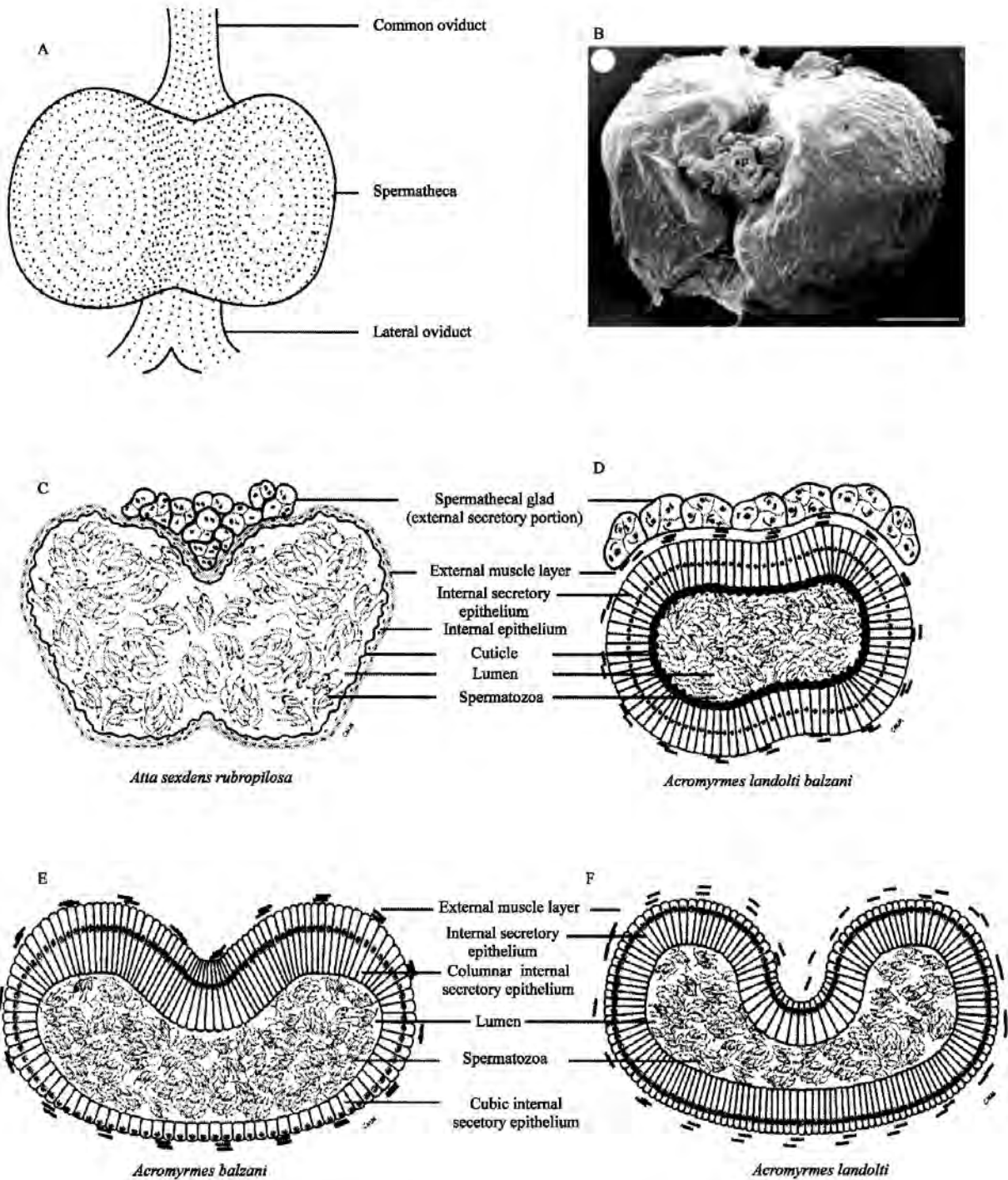


Fig. 1: A. Schematic diagram showing the bi-lobed sac morphology of the spermatheca of the ants *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti balzani*. B. SEM of the spermatheca of *A.s. rubropilosa*, r = reservoir, sp. = secretory portion, Scale bar = 1 μ m. C. D. E. F. Schematic diagram of the spermatheca obtained through the histological sections

Table 1: Histology and histochemistry of the spermatheca of queens of the ants *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti balzani*

Species structure	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	<i>Acromyrmex landolti</i>	<i>Acromyrmex balzani</i>	<i>Acromyrmex landolti balzani</i>
Spermathecal gland	-Present in the form of rounded or elongated cellular groups forming acini (Fig. 1B, C; 2A) -Rounded or polygonal secretory cells located at the point of fusion of the two spermathecal lobes (Fig. 1C; 2A) -Rounded nuclei (Fig. 1C; 2A) -Sudan Black B +++ (Fig. 2D)	-Absent	-Absent	-Present in the form of polygonal secretory cells forming acini (Fig. 1D; 2F, G) -Coats the whole upper portion of the spermatheca (Figs. 1D; 2F, G) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2F) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2G)
Portion of the canaliculi near to the the cell nucleus found in the spermathecal gland	-Showing infoldings around the lumen and a thin cuticle coating it internally (Fig. 2A)	-Absent	-Absent	-Showing infoldings around the lumen and a thin cuticle coating it internally (Fig. 2F) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2F)
Portion of the canaliculi near to the reservoir found in the spermathecal gland	-No infoldings in the lumen -The cuticle is thicker than the one found in the canaliculi (Fig. 2A)	-Absent	-Absent	-Not observed
Internal secretory epithelium	-Absent	-Simple epithelium of columnar cells (Fig. 1F; 2I) -Rounded nuclei found at the basal region (Fig. 1F; 2I) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2I)	-Simple epithelium of columnar cells (Fig. 1D; 2F, G, H) -Spherical nuclei located at the median-basal portion of the cells (Fig. 1D; 2F, G, H) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2F) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2G, H)	
Reservoir wall	-Thin -Composed by an epithelium varying from scamous to cubical (Fig. 1C; 2B) -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 2C) -Sudan Black B +++ (Fig. 2E)	-Thin -Composed by an internal columnar secretory epithelium (Fig. 1F; 2I) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2I)	-Thin -Composed by an internal secretory epithelium varying from cubical to columnar (Fig. 1E; 2J, K, L) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2J, K, L)	-Thin -Composed by an internal columnar secretory epithelium (Fig. 1D; 2F, G) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2F) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2G, H)
Cuticle found internally coating the spermatheca	-Thick throughout most of its extension -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 1C; 2B, C) (Fig. 2C) -Sudan Black B ++ (Fig. 2E)	-Absent	-Absent	-Thick throughout its extension (Fig. 1D; 2F, G) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2G)
Musculature found externally surrounding the spermatheca	-Few layers (Fig. 1C; 2B, E) -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 2C) -Sudan Black B ++ (Fig. 2E)	-Numerous layers that thicken at he point of fusion between the two lobes (Fig. 1F; 2I) -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 2I)	-Numerous layers (Fig. 1E; 2J, K, L) -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 2J, K, L)	-Few layers (Fig. 1D; 2F, G, H) -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 2F) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2G, H)
Morphology of the spermatozoa	-Elongated without a distinction between the head and tail -PAS/Alcian Blue ++ -Sudan Black B + (Fig. 2E)	-Elongated without a distinction between the head and tail (Fig. 2I) -PAS/Alcian Blue ++ (Fig. 2I)	-Elongated without a distinction between the head and tail (Fig. 2J, K, L) -PAS/Alcian Blue ++ (Fig. 2J, K, L)	-Elongated without a distinction between the head and tail (Fig. 2G) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2G)

+Weak positive reaction, ++Medium positive reaction, +++Strong positive reaction, -Negative reaction

DISCUSSION

The spermatheca of ants in general has been considered important for the adaptive success of these species, given that it is responsible for the reception and storage of the spermatozoa from the moment of mating

until the fertilization of the eggs, thus being the source for the production of new individuals.

The morphology of spermatheca is generally described as a sac, into which a few secretory glands may open. These associated glands are known as spermathecal glands.

In the species of ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* analyzed in the present study, the spermatheca shows the same sac morphology described for insects in general; however, in these species there were two lobes that fused partially at the median region of the structure.

It was possible to verify that, in the spermatheca of these species, the regions of probable secretory function were distributed in two different manners: a) as cells grouped together forming structures similar to acini and located externally in relation to the spermatheca and b) in the form of a secretory epithelium coating the spermatheca internally. Depending on the species, was observed that the secretory cells might be distributed in three different manners: a) at the external portion likely acini, b) at the internal portion in the shape of an epithelium that coats the reservoir, or c) at both the internal and external portions.

The external secretory portion was found in *A.s. rubropilosa* and *A.l. balzani* located precisely at the point of fusion between the two spermathecal lobes of the reservoir and it was denominated spermathecal gland. Nevertheless, in the spermatheca of queens *A. balzani* and *A. landolti* we could verify the absence of cells with secretory characteristics located externally in relation to the spermatheca, in other words, these species lacked the spermathecal glands.

In insects in general, the external secretory portion of the spermatheca, both at the level of light microscopy and electron microscopy, has been described as constituted by cells presenting intra and extracytoplasmic canaliculi (Gupta and Smith, 1969; Davey, 1985).

In the species *A.s. rubropilosa* and *A.l. balzani*, which presented the spermathecal gland, the presence of these canaliculi was also noted and they have the function of collecting the secretion produced by the secretory cells and transport it into the reservoir's lumen. In these two species we suggest that the secretion produced by the spermathecal gland might undergo some sort of modification through the path it travels, from the site where it was produced intracellularly, going through the canaliculi and finally reaching the reservoir. This suggestion is based on the results of the histochemical tests, which revealed that the final secretion released does not present the exact constitution of when it was produced. In the spermatheca of queens of *A.s. rubropilosa* the two portions of the canaliculi were observed. In the intracellular portion the canaliculi showed numerous infoldings around the lumen, as well as a thin internal cuticular coat. In the extracellular portion, no infoldings were observed in the surface of the lumen and the cuticle that forms the internal coat appeared thicker.

The occurrence of a modification in the composition of the secretion has already been described in some insects by other authors, who reported that the secretion produced by the secretory cells is generally more dense at the beginning of the extracytoplasmic canaliculi and becomes more fluid as it travels through them, thus facilitating its passage into the spermathecal lumen.

The spermatheca of the queens of the three species of the genus *Acromyrmex* appeared as organs of considerable size, showing thick walls due to the presence of an internal secretory epithelium. However, in the species *A.s. rubropilosa*, the reservoir wall appeared extremely thin due to the absence of the secretory epithelium composed by cells of columnar morphology. These cells are probably responsible for the production of the cuticle and may also play a role in the passage of material.

The presence of an internal secretory epithelium in the spermatheca of the queens of all three species of ants of the genus *Acromyrmex* suggests that the physiology for the maintenance of the spermatozoa in viable conditions in order to use them at the time of fertilization of the eggs in these species must be different than the physiology observed in *A.s. rubropilosa*, in which only an external secretory portion was observed.

In *A.l. balzani* in addition to the spermathecal gland, the internal secretory epithelium appeared composed by columnar cells. In the spermatheca of queens of *A. balzani* and *A. landolti*, which did not present the spermathecal gland, the secretory cells forming a single internal epithelium. In *A. landolti*, this epithelium was constituted by columnar cells too. In the spermatheca of queens of *A. balzani* we observed a differentiation in the cellular morphology of the internal secretory epithelium, with the upper 2/3 of the spermatheca approximately being composed by columnar cells, while the remaining lower 1/3 of the spermatheca approximately was composed by cubical cells. This variation in the height of the secretory cells must depend on their degree of functional activity. It could be inferred that the greatest activity occurs in the columnar region of the epithelium probably due to the fact that, previously in the evolutionary scale, the spermathecal gland would have been located externally to this precise region.

According to Wheeler and Krutzsch (1994) the apical margin of the columnar epithelium of the spermatheca of ants *Crematogaster opuntiae* displays dense arrays of microvilli and numerous bounded pinocytotic vesicles. We also observed that the apical region of the epithelial cells of the secretory epithelium of *A. balzani* and *A. landolti* is differentiated. Due to the fact that the portion responsible for the production of the secretion is located internally and coats the whole reservoir, the

secretion produced by the cells would be released directly inside the reservoir through a process of exocytosis, in which vesicles from the apical cytoplasm of the cells to forward into the spermathecal lumen. Consequently, there would be no participation of external cells to the spermatheca in the production of secretion to replace the spermathecal fluid.

Muscle layers were observed externally surrounding the spermatheca of all four species of ants described in the present study. The musculature appeared relatively thin, with the exception of the sp. *A. balzani*, in which was verified the presence of several layers and in *A. landolti*, in which these layers thicken particularly at the region of the point of fusion between the two spermathecal lobes. The musculature by contracting all the structure has the function of aiding the movement of the spermatozoa inside the spermatheca and also in their expulsion at the time of egg fertilization.

From the histochemical point of view, the data presented in this research revealed that the external secretory portion of the spermatheca of *A.s. rubropilosa*, the internal secretory epithelium and the external secretory portion in *A.l. balzani* and the internal secretory epithelium in *A. landolti* and *A. balzani*, reacted weakly to the test for the detection of polysaccharides, thus indicating low levels of production of these elements in the spermatheca of the four species. The polysaccharides observed in the spermatheca of *A.s. rubropilosa*, *A. landolti* and *A.l. balzani* correspond to neutral polysaccharides, since they did not react to the Alcian Blue showing the absence of acid polysaccharides. However, the presence of acid ones was observed in the spermatheca of *A.l. balzani*.

In the spermatheca of *A.s. rubropilosa* was observed a large amount of polysaccharides in the cytoplasm of the cells reservoir. Therefore, since the cuticle is a structure that presents large amounts of polysaccharides, these elements might have the cells of the epithelium of the reservoir as source.

The low level of polysaccharides found in the spermatheca of ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* might suggest that these compounds would be forming complexes with other elements, such as glycoproteins, which would in turn have the function of maintaining the spermatozoa by providing them with an energy source while they remain stored, but mainly by supplying the energy necessary for their metabolism at the time of fertilization.

Atta sexdens rubropilosa spermatheca had a low level of lipids, thus suggesting that they might also be produced with the purpose of establishing complexes that would act in the maintenance of the spermatozoa stored.

The protein detection revealed that in *A.l. balzani* the internal secretory epithelium, the cuticle that coats the reservoir internally, the musculature that surrounds the whole structure externally and the secretion stored inside the spermathecal lumen are positive to this element.

The studies concerning the specific composition of the secretion produced by the secretory cells of insect's spermatheca, or of the secretion contained inside the lumen shown that it is a product of specialized glandular cells found in this structure, has a glycoproteic nature (Clements and Potter, 1967; Happ and Happ, 1970; Bhatnagar and Musgrave, 1971; Grodner and Steffens, 1978; Ahmed and Gillot, 1982 a, b; Gardner, 2004).

The spermatozoa of most insects are described as elongated and filamentous structures (Bacceti, 1972; Dallai and Afzelius, 1993; Lino-Neto and Dolder, 2002), an observation that was corroborated in the ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* analyzed in the present study. The histochemical studies showed that the spermatozoa contain polysaccharides and proteins in their basic constitution, with lipids having been observed only in *A.s. rubropilosa*. The spermathecal fluid stored inside the lumen of the spermatheca had proteins as its basic component and has the function of maintaining the spermatozoa alive.

The analysis of the external morphology of the spermatheca of ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex*, showed many more similarities than differences when examined by the naked eye. Thus, histological studies were needed in order to corroborate such similarity or verify that, although the spermatheca are externally similar, they present variations in the arrangement of cells and tissues.

According to the morphological data up to now obtained for the spermatheca of *A.s. rubropilosa*, *A. balzani*, *A. landolti* and *A.l. balzani*, it was possible to propose a specialization of the structure (Fig. 1 C, D, E, F), since the spermatheca of *A.s. rubropilosa* only presents an external secretory portion; *A.l. balzani*, presenting the internal secretory epithelium and the external secretory portion and the spermatheca of *A. balzani* and *A. landolti* only present an internal secretory epithelium. However, *A. landolti* presents a higher degree of differentiation than *A. balzani* since its secretory epithelium was differentiated into two portions (columnar and cubical), thus suggesting that the greater production of secretion would occur in the columnar portion of the epithelium. In *A. landolti* there was no such differentiation of the epithelium presenting only columnar cells throughout, thus suggesting that the secretion is produced uniformly.

In *A. balzani* and *A. landolti*, the fact that the secretory epithelium is exclusively located in the internal region of the spermatheca suggests that, in these two

species, the spermatheca itself would be self-sufficient to produce all the elements that compose the secretion necessary to maintain the spermatozoa viable. A lesser or none dependence on the supply of exogenous elements that contribute for an adequate microenvironment for the spermatozoa until the moment of fertilization of the eggs would render greater chances of survival to the species, even at times of unfavorable environmental conditions such as low temperatures, high pluviosity, scarce food sources, etc.

ACKNOWLEDGMENTS

This research by supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant nº 03/05485-0. The authors wish to thanks to Antônio Teruyoshi, Mônica Iamonte, Gerson Mello Souza and Cristiane Márcia Mileo for their technical support.

REFERENCES

- Ahmead, L. and C. Gillot, 1982a. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) I. Morphology, histology and histochemistry. Int. J. Invert. Rep., 4: 281-295.
- Ahmead, L. and C. Gillot, 1982b. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) II. Ultrastructure. Int. J. Invert. Rep., 4: 297-309.
- Baccetti, B., 1972. Insects sperm cell. Advances in Insects Physiology, London, 9: 315-395.
- Berry, D.J., 1985. Material direction of oogenesis and early embryogenesis in insects. Annu. Rev. Entomol., 27: 205-227.
- Bhatnagar, R.D. and A.J. Musgrave, 1971. Aspects of the histophysiology of the spermathecal gland of *Stophilus granarius* (L.) (Coleoptera). Canad. J. Zool., 49: 275-277.
- Chapman, R.F., 1998. The insects: Structure and function. New York, Elsevier, pp: 770.
- Clements, A.N. and S.A. Potter, 1967. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Insect. Physiol., 13: 1825-1836.
- Dallai, R. and B. Afzelius, 1993. Axonemal structure and insect phylogeny. Boll. Zool., 60: 423-429.
- Davey, K.G., 1985. The Female Reproductive Tract. In: Kerkut, G.A. and L.I. Gilbert (Eds.), Comprehensive Insect Physiology: Embryogenesis and Reproduction. Pergamon Press.
- Gardner, G.E., 2004. Morphological and histological aspects of the spermatheca as they relate to sperm organization in the grasshopper species *Schistocerca americana* and *Dissosteira carolina* (Orthoptera: Acrididae). 2004, 41f. Thesis (Degree of Master of Science)-Faculty of North Carolina State University, Raleigh.
- Grodner, M.L. and W. Steffens, 1978. Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the boll weevil. Trans. Am. Microsc. Soc., 97: 116-120.
- Gupta, B.L. and D.S. Smith, 1969. Fine structural organization of the spermatheca in the cockroach *Periplaneta americana*. Tissue Cell, 1: 295-324.
- Happ, G.M. and C.M. Happ, 1970. Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Tissue Cell, 2: 443-466.
- Lino-Neto, J. and H. Dolder, 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *S. invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). Tissue Cell, 34: 124-128.
- Schoeters, E. and J. Billen, 2000. The importance of the spermathecal duct in bumblebees. J. Ins. Physiol., 46: 1303-1312.
- Thornhill, R. and J. Alcock, 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard Press, Cambridge, Mass.
- Wheeler, D.E. and P.H. Krutzsch, 1994. Ultrastructure of the spermatheca and its associated gland in the ant *Crematogaster opuntiae* (Hymenoptera, Formicidae). Zoomorphol., 114: 203-212.

CAPÍTULO 2

TÍTULO: “Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae)”.

AUTORES: Gabriela Ortiz¹ and Maria Izabel Camargo Mathias²

^{1,2.} Departamento de Biologia – Instituto de Biociências- UNESP, Av. 24A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19) 3524-0009.

Artigo publicado no periódico: *American Journal of Agricultural and Biological Science.*, v. 1, p. 58-65, 2006.

RESUMO

A espermateca é o local para onde os espermatozoides do macho são transferidos no momento da cópula e nela permanecem até o momento da fecundação dos ovos. Este órgão tem sido considerado uma importante estrutura para o sucesso adaptativo das formigas, visto que tem como função a capacitação dos espermatozoides, processo que envolveria tanto mudanças estruturais no próprio espermatozoide quanto na secreção contida no interior da espermateca. As formigas *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, espécies consideradas pragas, causam sérios danos econômicos à diversas plantações. Suas espermatecas foram analisadas através de técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Histologia e Histoquímica, e verificou-se que possuem forma de bolsa bilobada que se funde parcialmente na porção central, e ainda em *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, a mesma apresenta-se mais larga do que alta em comparação com as outras espécies. A glândula espermatecal externa, constituída por grupos de células secretoras, encontrou-se localizada precisamente na região de fusão dos dois lobos espermatecais e foi observada nas rainhas das espécies *Atta laevigata* e *Atta sexdens sexdens*, caracterizando-se pela presença de agrupamentos celulares, e em *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, como filamentos terminando em fundo cego. A espécie *Atta sexdens piriventris*, no entanto, não apresentou glândula espermatecal (externa), e sim um epitélio de revestimento interno ao reservatório composto de células secretoras. Este epitélio secretor interno também foi observado em *Atta sexdens sexdens*, porém com localização restrita ao ponto de fusão dos lobos espermatecais.

A presença do epitélio secretor interno nas espermatecas das rainhas de formigas *Atta sexdens piriventris* e *Atta sexdens sexdens* poderia sugerir que a fisiologia para manutenção dos espermatozoides em condições viáveis para sua utilização no momento da fecundação dos ovos deva ser diferente daquela observada em *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, onde apenas a glândula espermatecal (externa) foi observada.

PALAVRAS-CHAVE: espermateca, histologia, histoquímica, glândula espermatecal, Attini.

Morpho-physiological Differences of the Spermatheca of Attini Ants (Hymenoptera: Myrmicinae)

¹Gabriela Ortiz and ²Maria Izabel Camargo-Mathias

^{1,2}Instituto de Biociências, Departamento de Biologia da UNESP. Avenida 24-A, nº 1515 Cep: 13506-900, Rio Claro-SP-Brasil

Abstract: The insect's spermatheca store the spermatozoa from the time of copulation until the fertilization of the eggs and consists of a sac, usually associated to glands. The ant species *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri* are considered pests, as they cause economic losses to several crops. The spermatheca of these species were examined by scanning electron microscopy, histological and histochemical techniques. Their morphology resembled that of a bilobular pouch partially jointed in the central portion. In *A. coronatus* and *C. muelleri* it is flatter in shape than those of other species. The external spermathecal gland, groups of secretory cells, was located at the joining point of the two spermathecal lobes of the reservoir. This was observed in *A. laevigata*, *A. s. sexdens* and *A. coronatus*, like a group of cells, while in *C. muelleri*, like filaments. An external associated gland was not observed in *A. s. piriventris*, instead secretory cells were arranged in a simple prismatic epithelium internally lining the spermathecal lumen. This epithelium was also observed in *A. s. sexdens*, although it was restricted to the joining point of the spermathecal lobes. The presence of an internal secretory epithelium in *A. s. piriventris* and *A. s. sexdens* suggests that their physiology for the maintenance of spermatozoa in viable conditions for egg fertilization might differ from *A. laevigata*, *A. coronatus* and *C. muelleri*, in which only an external spermathecal gland was observed.

Key words: Spermatheca, histology, histochemistry, spermathecal gland, Attini

INTRODUCTION

The leaf-cutting ants are the main agricultural pests and are represented by some species of the genera *Atta* and *Acromyrmex*, which are the most derived of the tribe Attini and whose colonizing success of agricultural crops is attributed to their great voracity and capability to proliferate.

Ant queens live unusually long for insects, which generally have short lives. They store viable spermatozoa for a decade or more and produce workers and reproductives over such long periods, that almost certainly has contributed to the propensity for ants to evolve diverse life histories that been so successful in a wide range of environments.

The ability to store spermatozoa releases from the risk and energy expenditure involved in finding subsequent mates^[1]. Maintenance of spermatozoa viability can be a critical aspect of female reproduction in insects, yet the mechanisms mediating this phenomenon are poorly understood.

The maintenance of these spermatozoa for such a long time requires the presence of a specialized organ in the queens, known as spermatheca which presents a particular organization for each phylogenetic group that has been studied^[2].

The morphology of the insect spermatheca varies from species to species, however it basically consists of storage pouch where associated glands, called spermathecal glands, can often be observed. When these glands are absent, the actual spermathecal epithelium functions to produce secretions that supply adequate nutrients and conditions for the survival of the spermatozoa^[2,3].

Generally, the spermatheca consists of a single sac, but two have been observed in *Blaps* (Coleoptera) and *Phlebotomus* (Diptera) and three occur in the most derived flies^[2]. In ants in general only one spermatheca has been described.

In a variety of insects taxa, females have complex storage organs with multiple compartments^[4]. A possible function of such multiple compartments is to enable differential spermatozoa storage, that is, the spatial separation of competing spermatozoa in independent compartments. This separation, in turn, may allow females to use spermatozoa differentially at fertilization.

Insect spermatheca produce glycoproteins or mucopolysaccharides through their glandular secretory cells^[5]. The mucopolysaccharide secreted by the spermathecal gland has been shown to contain a chemotactic substance responsible for the transport and

Corresponding author: Maria Izabel Camargo-Mathias, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia da UNESP. Avenida 24-A, nº 1515 Cep: 13506-900, Rio Claro-SP-Brasil, Tel / Fax: 055-19-35340009

migration of spermatozoa from female *bursa copulatrix* to the spermatheca in the boll weevil *Anthonomus grandis*^[6]. Very small amounts of the secretion from the spermathecal gland affect the motility and fertilizing capacity of spermatozoa^[6]. The importance of these secretions for fertilization is demonstrated by the fact that the removal of spermathecal gland led to gradual loss of spermatozoa motility and spermathecal emptying^[7-9]. The main function of these secretions would be to maintain the viability of the spermatozoa during the time of mating until the fertilization of the eggs^[10]. The spermatozoa of insects become active inside the spermatheca and may remain there for several months or up to several years.

In view of the facts described above and given the economical importance of these insects, the present work had the object of carrying out a study of the spermatheca of queen ants of *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri* through the use of the techniques of Scanning Electron Microscopy (SEM), histology and histochemistry. The specific aim of this study is to show a morphological diversity between the spermatheca in ants of the tribe Attini.

MATERIALS AND METHODS

Were utilized fertilized queens of *Atta laevigata* (provided by Dr. Odair Corrêa Bueno-Center for the Study of Social Insects-CEIS-UNESP-Rio Claro/SP/Brazil), *Atta sexdens sexdens* (provided by Dr. Jacques Delabie and collected at CEPLAC-Ilhéus/Bahia/Brazil), *Atta sexdens piriventris* (provided by Fábio Moreira Link and collected in Santa Maria/RS/Brazil), *Acromyrmex coronatus* (collected from nests located in the UNESP Campus in Rio Claro/SP) and *Cyphomyrmex muelleri* (provided by Dr. Ulrich Mueller-University of Texas-Austin/EUA). The equipment utilized in this study were located at the Histology and Electron Microscopy Laboratories of the Department of Biology of the Institute of Biosciences as well as at CEIS-Center for the Study of Social Insects of UNESP-Rio Claro/SP/Brazil.

Scanning Electron Microscopy (SEM): The spermatheca were removed from the *A. s. sexdens* and *A. s. piriventris* queens, fixed en Karnovsky for 24 hours and dehydrated in a graded 70-100% ethanol and acetone series. The material was critical point dried, sputtered with gold and examined under a Phillips SEM 505.

Histology: The spermatheca from queens of all species were removed, fixed in paraformaldehyde, dehydrated a graded 70-95% alcohol series and embedded in JB-4 resin at 4° in the dark. Then they were placed in plastic molds at 4°C in order to delay premature polymerization. The plastic molds containing the

material were filled with JB-4 resin and polymerization was completed at room temperature. The sections were placed on clean glass slides and air dried. Then they were stained with hematoxylin-eosin, just applied in *A. s. sexdens* and *A. coronatus*.

Histochemistry: Individuals were cold anesthetized and dissected in saline solution. The spermatheca were fixed in paraformaldehyde. Dehydration was performed in a standard alcohol series (70, 80, 90 and 95%) at 15 minutes intervals. The material was embedded in resin and sectioned to a 3 µm thickness. The sections were arrayed on glass slides and stained with PAS/Alcian Blue (for the detection of polysaccharides) just applied in the species *A. s. sexdens* and *A. s. piriventris*, Bromophenol Blue (for protein detection) just applied in the species *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. s. piriventris* and *C. Muelleri*, Ninhidrina Schiff (for protein detection) just applied in the species *A. laevigata* and *A. s. sexdens*, Sudan Black B (for lipids detection) just applied in the species *A. laevigata* and *A. s. sexdens* and Nile Blue (for lipids detection) just applied in the species *A. s. sexdens* and *A. s. piriventris*.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology: The morphological results obtained for the spermatheca of ant queens of *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. s. piriventris*, *A. coronatus* and *C. muelleri* revealed that in all five species, this structure is located at beginning of the common oviduct of the female reproductive tract and resembles a bilobed pouch partially jointed at the central portion, therefore exhibiting a common lumen (Fig. 1). In *A. coronatus* and *C. muelleri*, the spermatheca is flatter in shape than those observed in other species (Fig. 1).

Thus, the spermatheca of queens of *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. s. piriventris*, *A. coronatus* and *C. muelleri* exhibit a large spermathecal reservoir to store and maintain spermatozoa, in which they remain from mating until egg fertilization (Fig. 1).

The surface of the reservoir of the spermatheca of *A. s. sexdens* and *A. s. piriventris* is rough and tracheoles are attached into the structure. SEM observations of the internal portion of the reservoir of the spermatheca of these species revealed that this region is internally infolded and irregular, due to the presence of a thick cuticle lining the entire structure (Fig. 2F, G, H, S).

Inside the reservoir of *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. s. piriventris* and *C. muelleri* examined in this study, we observed filamentous and elongated spermatozoa with a constant diameter (Fig. 2H, S).

Histology and histochemistry: To better compare and visualize, histological and histochemical results are summarized in Table 1.

Table 1: Histology and histochemistry of the spermatheca of queens of the ants *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri*

Species	<i>Atta laevigata</i>	<i>Atta sexdens Sexdens</i>	<i>Atta sexdens piriventris</i>	<i>Acromyrmex Coronatus</i>	<i>Cyphomyrmex muelleri</i>
Structure					
Spermathecal gland	-Present as groups of cells forming acini (Fig. 1, 2 A) -Round and/or polygonal-shaped secretory cells located at the joining point of spermathecal lobes (Fig. 1, 2 A) -Round-shaped nuclei (Fig. 1, 2 A) -Ninhydrin Schiff +++ (Fig. 2 A) -Sudan Black B +	-Present as groups of cells forming acini (Fig. 1, 2 I, J, K) -Secretory cells varying from cubic to prismatic shaped; cells may be rounder when located near the periphery (Fig. 1, 2 I, J, K) -Large nuclei consistent with the cell morphology and with 2 to 3 nucleoli (Fig. 1, 2 I, J, K) -Presence of extracellular canaliculi of considerable caliber internally lined with a thick cuticle (Fig. 2 I) -Ninhydrin Schiff +++ (Fig. 2 J) -PAS/Alcian Blue + (Fig. 2 K) -Sudan Black B-	-Absent	-Present as filaments with a visible central lumen (Fig. 1, 2 W) -Round to prismatic shaped secretory cells (Fig. 1, 2 W) -Spherical nuclei located in the median region of cells with evident nucleoli (Fig. 1, 2 W)	-Present as filaments with a visible central lumen containing secretion (Fig. 1, 2 X) -Cubic shaped secretory cells (Fig. 1, 2 X) -Nuclei consistent with the cell morphology and with only 1 nucleolus (Fig. 1, 2 X) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 X)

Table 1: Contd.

Species	<i>Atta laevigata</i>	<i>Atta sexdens sexdens</i>	<i>Atta sexdens Piriventris</i>	<i>Acromyrmex Coronatus</i>	<i>Cyphomyrmex muelleri</i>
Structure					
Internal secretory epithelium	-Absent	-Simple secretory epithelium consisted of prismatic cells and very elongated nuclei located only joining point of the spermathecal lobes (Fig. 1, 2 L, M, N, O) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 M) -PAS/Alcian Blue-(Fig. 2 N) -Nile Blue + (Fig. 2 O)	-Simple secretory epithelium consisted of tall and narrow prismatic cells and nuclei consistent with this morphology. This epithelium, however, differentiates at the joining point of the lobes and cells become even larger (Fig. 1, 2 T, U, V) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 T) -PAS/Alcian Blue-(Fig. 2 U) -Nile Blue +++ (Fig. 2 V)	-Absent	-Absent
Reservoir wall	-Thin -Consisted of a simple epithelium varying from squamous to cubic (Fig. 1, 2 B) -Ninhydrin Schiff +++ (Fig. 2 A, B) -Sudan Black B + (Fig. 2 E) -At the joining point of spermathecal lobes, this epithelium exhibits several layers of oval or polygonal cells (Fig. 2 C) -Ninhydrin Schiff +++ (Fig. 2 C) Sudan Black B-	-Thin, except at the joining point of spermathecal lobes, due to the presence of the prismatic secretory epithelium (Fig. 1, 2 L, N, O) -Consisted of a simple lining epithelium varying from cubic to squamous (Fig. 1, 2 M) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 M) -PAS/Alcian Blue-(Fig. 2 N)	-Thick -Consisted of a simple prismatic secretory epithelium (Fig. 1, 2 T, U, V) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 T) -PAS/Alcian Blue-(Fig. 2 U) -Nile Blue +++ (Fig. 2 V)	-Thin -Consisted of a simple squamous epithelium exhibiting cells with flattened nuclei (Fig. 1, 2 W)	-Thin -Consisted of a simple squamous epithelium (Fig. 1, 2 X) -Bromophenol Blue + (Fig. 2 X)

Table 1: Contd.

Species	<i>Atta laevigata</i>	<i>Atta sexdens sexdens</i>	<i>Atta sexdens piriventris</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	<i>Cyphomyrmex muelleri</i>
Cuticle found internally lining the spermatheca	-Thick in most of its area (Fig. 1, 2 A, B) -Ninhydrin Schiff +++ (Fig. 2 A, B) -Sudan Black B + (Fig. 2 E) -Thin on the stratified epithelium (Fig. 2 C)	-Thick throughout (Fig. 1, 2 M, N, R) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 M) -PAS/Alcian Blue ++ (Fig. 2 N) -Sudan Black B + (Fig. 2 R)	-Thick, but it becomes thinner in the joining point of the lobes where the epithelium differentiates (Fig. 1, 2 T, U) -Bromophenol Blue+ (Fig. 2 T) -PAS/Alcian Blue ++ (Fig. 2 U) -Nile Blue-(Fig. 2 V)	-Thin	-Thin (Fig. 1, 2 X) -Bromophenol Blue + (Fig. 2 X)
Musculature found externally surrounding the spermatheca	-Several layers (Fig. 1, 2 B) -Ninhydrin Schiff +++ (Fig. 2 B) -Sudan Black B-	-Several layers (Fig. 1, 2 M) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 M) -PAS/Alcian Blue + -Sudan Black B +	-Several layers (Fig. 1, 2 U, V) -Bromophenol Blue +++ -PAS/Alcian Blue +++ (Fig. 2U) -Nile Blue-(Fig. 2 V)	-Few layers (Fig. 1, 2 W)	-Few layers (Fig. 1, 2 X) -Bromophenol Blue + (Fig. 2 X)
Morphology of the spermatheca	-Elongated, no distinction between head and tail (Fig. 1, 2 D) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 D)	-Elongated, no distinction between head and tail (Fig. 1, 2 P, Q, R) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 P) -PAS/Alcian Blue ++ (Fig. 2 Q) -Sudan Black B ++ (Fig. 2 R)	-Elongated, no distinction between head and tail (Fig. 1, 2 S)	-Elongated, no distinction between head and tail (Fig. 1)	-Elongated, no distinction between head and tail (Fig. 1, 2 X) -Bromophenol Blue +++ (Fig. 2 X)
	+ Weak positive reaction	++ Medium positive reaction	+++ Strong positive reaction		-Negative reaction

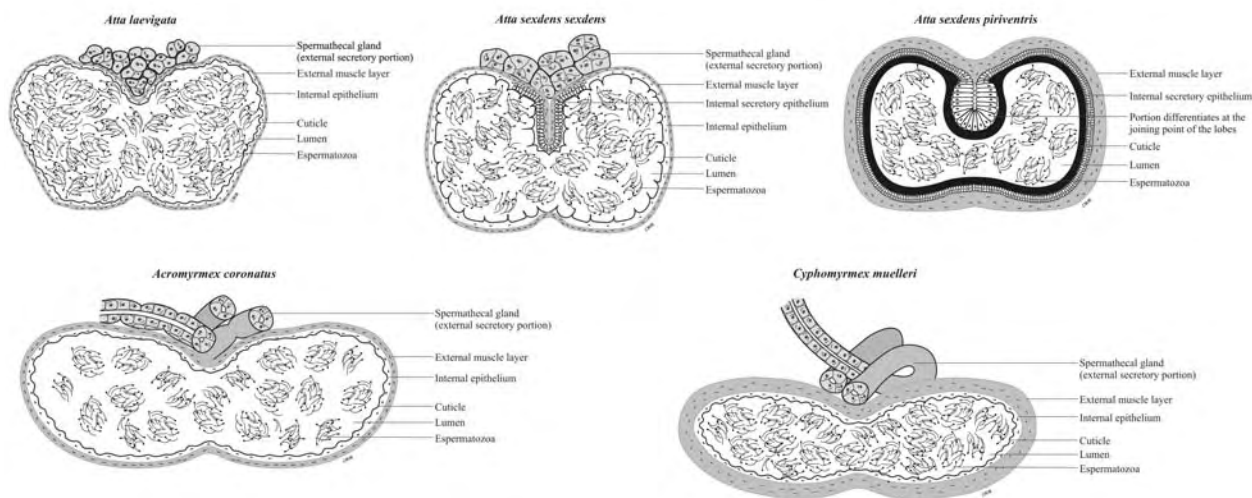


Fig. 1: Schematic diagram showing the bilobed sac morphology of the spermatheca of the ants *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri*

Aspects of the internal anatomy of ants still remain mostly unknown, as most studies on these insects are focused on control aspects, especially in ants of the genus *Atta*, considered pests. Although of considerable importance, few studies have been conducted to describe the morphology of the spermatheca of these insects.

In general, the spermatheca of ants has been considered an important structure for their adaptive success, as it receives and stores sperm from mating until egg fertilization, in addition to being a source of origin of new individuals of a colony.

The spermatheca is an organ usually described as a pouch, to which glands might be associated with and discharge their secretion into. These glands are termed spermathecal glands and play a role in the production of secretions that allow the maintenance of a microhabitat with an adequate pH, ionic composition, in addition to other necessary conditions for the survival of spermatozoa.

Most insects present only one spermatheca, as also observed in the queens of the species examined in this study: *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri*.

In these species, were confirmed that the spermatheca exhibit a similar morphology resembling a storage pouch described for insects in general, however, with two lobes partially jointed at the median portion of this structure. The same morphology was observed for the spermatheca of queens of the ants *A. s. rubropilosa*, *A. balzani*, *A. landolti* and *A. l. balzani* (Ortiz; Camargo-Mathias, personal communication). In *A. coronatus* and *C. muelleri*, the pouch is flatter than those of other species.

The presence of a fat body around organs has been reported for most insects, as observed surrounding the spermatheca of *C. muelleri*, however, it is unclear whether the fat body has any influence on the spermatheca or it only plays a role filling the abdomen. In the Orthoptera *Locusta migratoria*, the spermatheca is also surrounded by a layer of fat body, probably acting as a protective structure in the pupa as well as in the adult^[11].

Another characteristic aspect of the spermatheca of queens of most insects is the presence of tracheae. According^[12], these tracheae are responsible for gas exchanges, which are of extreme importance to maintain the integrity of epithelial cells and consequently fully functional.

The secretory cells of the spermatheca of most insects exhibit the membrane with abundant microvilli, which increase the cell surface for exchanges, indicating that the secretory epithelium may play a role in the reabsorption of the contents present in the lumen, in addition to cuticular support. Apical microvilli in the epithelial cells of the spermatheca have been described in some species of Blattaria^[13], Coleoptera^[14,15], Orthoptera^[11] and in the stingless bee *Melipona bicolor*^[16]. In the present study, similar structures, resembling a brush border, were observed in the internal secretory epithelium of *A. s. piriventris*.

In the spermatheca of these study species, as well as species of genus *Atta* and *Acromyrmex* examined by Ortiz and Camargo-Mathias (personal communication), regions probably playing a secretory role exhibited two morphologies: a) groups of cells forming structures resembling acini or filaments, located externally to the structure (spermathecal gland) and b) as a secretory epithelium internally lining the reservoir. Thus, depending on the species, the spermathecal secretion may be produced in three sites: a) in the spermathecal gland located in the external portion, b) in the secretory epithelium located in the internal portion of the reservoir or c) in both portions.

A spermathecal gland was observed in queens of *A. laevigata*, *A. s. sexdens* and *A. coronatus* and characterized by groups of cells and in *C. muelleri*, by filaments. The presence of this gland forming groups of cells resembling acini was also observed by Ortiz and Camargo-Mathias (personal communication) in the species *A. s. rubropilosa* and *A. l. balzani*. In the spermatheca of queens of *A. s. piriventris*, however, the

external associated gland was absent, as also reported by Ortiz and Camargo-Mathias (personal communication) in the species *A. balzani* and *A. landolti*, suggesting a morphological similarity among the spermatheca of these ant species.

The spermatheca of the species *A. laevigata*, *A. coronatus* and *C. muelleri* present a reservoir with thin walls, due to the absence of an internal secretory epithelium, which was only present in *A. s. sexdens*, located only at the joining point of the spermathecal lobes and in *A. s. piriventris*, internally lining the entire spermatheca. The presence of an internal secretory epithelium in the spermatheca of queens of *A. s. piriventris* and *A. s. sexdens* suggests that the physiology to maintain the sperm in viable conditions for egg fertilization might differ from those of *A. laevigata*, *A. coronatus* and *C. muelleri*, in which only the external spermathecal gland was observed.

Differences in thickness epithelium of the spermatheca are correlated with its roles, whether secretory or storing. In general, the epithelium of the spermatheca of insects is classified in three basic types, according to the location of secretory cells^[17]. In the first type, found in *Periplaneta americana*, secretory cells are distributed throughout the entire wall of the reservoir^[13], as also observed in our study for *A. s. piriventris* and the ant species *A. l. balzani*, *A. balzani* and *A. landolti* examined by Ortiz and Camargo-Mathias (personal communication). In the second type, gland cells are restricted to a particular region of the epithelium, as reported for *Aedes aegypti*^[18] and for *A. s. sexdens* examined in our study. In the third type, gland cells form a gland distinct from the reservoir, as found in most Hymenoptera and several Coleoptera^[14,19], in queens of *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. coronatus* and *C. muelleri* examined in present study and in *A. s. rubropilosa* described by Ortiz and Camargo-Mathias (personal communication).

According to the observed in the queens of *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. coronatus* and *C. muelleri*, were divided the spermatheca of these ant species in two distinct portions: a) a secretory portion represented by the spermathecal gland and consisted of cells responsible for the production the spermathecal liquid and b) a storing portion, represented by the reservoir consisted of a simple lining epithelium, where spermatozoa are stored and nourished until egg fertilization. Specifically in queens of *A. s. sexdens*, the secretory portion of the spermatheca was subdivided once more in: a) external secretory portion, represented by the spermathecal gland located externally to the structure and b) internal secretory portion, represented by the secretory epithelium located internally to the reservoir and restricted to the joining point of spermathecal lobes. Since in *A. s. piriventris* the spermatheca is not divided into two distinct portions and the epithelium producing the secretion is located internally to the reservoir, the secretion is produced and

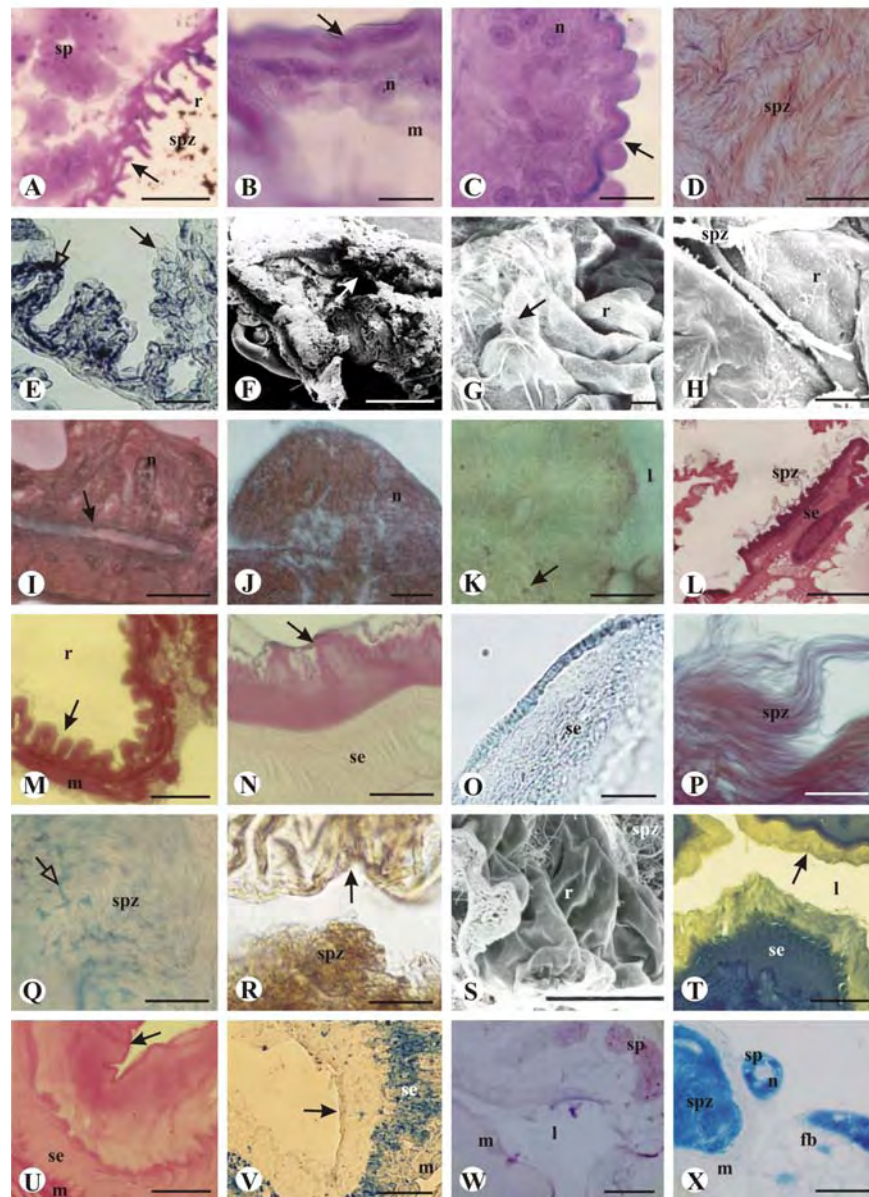


Fig. 2: A. General view of the spermatheca of *A. laevigata* stained with Ninhydrina Schiff, Scale bar = 100 μ m. B. Detail of the reservoir wall with simple epithelium of scamous cells found in the spermatheca of *A. laevigata* stained with Ninhydrina Schiff, Scale bar = 20 μ m. C. Portion of the stratified epithelium with cubical or polygonal cells found in the spermatheca of *A. laevigata* stained with Ninhydrina Schiff, Scale bar = 20 μ m. D. Spermatozoa in the reservoir of the spermatheca of *A. laevigata* stained with Bromophenol Blue, Scale bar = 10 μ m. E. Criosection of the spermatheca of *A. laevigata* stained with Sudan Black B, filled block arrow = cuticle, empty block arrow = lipid accumulation at the cells of the coating epithelium, Scale bar = 20 μ m. F. SEM of the spermatheca of *A. s. sexdens*, arrow = interior of the reservoir, Scale bar = 0,5 μ m. G. H. SEM of the interior of reservoir of *A. s. sexdens*, Scale bar G = 0,025 μ m, Scale bar H = 8 μ m. I. Detail of the spermathecal gland of *A. s. sexdens* stained with Hematoxyline and Eosin, arrow = canaliculi, Scale bar = 10 μ m. J. Detail of the spermathecal gland of *A. s. sexdens* stained with Ninhydrina Schiff, Scale bar = 10 μ m. K. Detail of the spermathecal gland of *A. s. sexdens* stained with PAS/Alcian Blue, arrow = intracitoplasmic granules PAS positive, Scale bar = 10 μ m. L. General view of the spermatheca of *A. s. sexdens* stained with Hematoxyline and Eosin, Scale bar = 100 μ m. M. Detail of the reservoir wall composed by a simple epithelium of scamous cells found in the spermatheca of *A. s. sexdens* stained with Bromophenol Blue, Scale bar = 50 μ m. N. Detail of the internal secretory epithelium of the spermatheca of *A. s. sexdens* stained with PAS/Alcian Blue, Scale bar = 10 μ m. O. Detail of the internal secretory epithelium of the spermatheca of *A. s. sexdens* stained with Nile Blue, Scale bar = 20 μ m. P. Spermatozoa in the reservoir of the spermatheca of *A. s. sexdens* stained with Bromophenol Blue, Scale bar = 10 μ m. Q. Spermatozoa in the reservoir of the spermatheca of *A. s. sexdens* stained with PAS/Alcian Blue, empty block arrow = secretion with acid polysaccharide, Scale bar = 10 μ m. R. Criosection of the reservoir wall of spermatheca of *A. s. sexdens* stained with Sudan Black B, Scale bar = 10 μ m. S. SEM of the interior of reservoir of *A. s. piventris*, Scale bar = 0,025 μ m. T. General view of the spermatheca of *A. s. piventris* stained with Bromophenol Blue, Scale bar = 50 μ m. U. Detail of the internal secretory epithelium of the spermatheca of *A. s. piventris* stained with PAS/Alcian Blue, Scale bar = 50 μ m. V. Criosection of the spermatheca of *A. s. piventris* stained with Nile Blue, Scale bar = 20 μ m. W. General view of the spermatheca of *A. coronatus* stained with Hematoxyline and Eosin, Scale bar = 100 μ m. X. General view of the spermatheca of *C. muelleri* stained with Bromophenol Blue, Scale bar = 50 μ m. sp = secretory portion, m = musculature, se = internal secretory epithelium, n = nucleus of the epithelial cell, filled block arrow = cuticle, r = reservoir, l = lumen, spz = spermatozoa, fb = fat body cells

discharged directly by exocytosis, with vesicles from the apical portion of the cytoplasm of secretory cells being released into the lumen of the spermatheca, without the participation of secretory cells externally to the organ. The same process has already been observed and described for the spermatheca of *Rhodnius prolixus*^[20].

In *A. laevigata*, *A. s. sexdens*, *A. coronatus* and *C. muelleri*, the external secretory cells form a central collecting canaliculus, in which intracellular canaliculi open and collect the secretion produced by these cells, as well as transport them to the lumen of the reservoir. When we examined queens of *A. s. sexdens*, which exhibit two types of secretory epithelium, it is worth pointing out that canaliculi were only observed in cells of the spermathecal glands, while they were absent in the internal secretory epithelium. This indicates a different way, by exocytosis, to release the secretion produced by the cells of epithelia located internally to the reservoir.

Histochemically, these results revealed that in the spermatheca of two of three species of the genus *Atta* and that exhibit an internal secretory epithelium, *A. s. sexdens* and *A. s. piriventris*, the epithelium was strongly positive for proteins, indicating that this element is produced in large quantities and probably plays an important role in the composition of the secretion. The spermatheca of *C. muelleri* was also positive for this histochemical test, specially the spermathecal gland, the spermatozoa and the secretion present in the lumen of the reservoir, while the lining epithelium and muscles externally surrounding the spermatheca were weakly stained.

Tests demonstrating polysaccharides revealed that secretory cells, internally located in the spermatheca of *A. s. sexdens* and *s. piriventris*, were weakly stained or unstained in certain regions. This was also observed in the spermathecal gland of *A. s. sexdens* and *laevigata*. In the cytoplasm of these cells, only small PAS-stained deposits resembling fine granules were observed, indicating low levels of production of these elements in the spermatheca of the three species.^[21] reported that the spermatheca of *Schistocerca americana* and *Dissosteira carolina* were weakly to moderately stained by PAS, while the cuticle lining this structure was strongly positive for acidic polysaccharides.

In the spermatheca of *A. laevigata*, a large amount of polysaccharides was observed in the cytoplasm of cells of the epithelium lining the reservoir, which does not play a secretory role in the production of components for the maintenance of spermatozoa in this species, suggesting that, since the cuticle is a structure that exhibits large quantities of polysaccharides and proteins, these polysaccharides might be produced by the cells of this epithelium.

The low levels of polysaccharides in the spermatheca of the studied species of the genus *Atta*, as well as those of other insects, suggest that these elements might take part only in the formation of complexes with other compounds, such as

glycoproteins, which might play a role in the maintenance of spermatozoa, providing them a source of energy while stored inside these structures and mainly, providing energy necessary for their metabolism, including during the time near fertilization.

Tests performed in these study demonstrated that lipids were more abundant in the spermatheca of *A. s. piriventris*, although some staining was observed in the secretory cells of *A. s. sexdens* and *A. laevigata*. Weak staining by Sudan Black B was also observed by^[21] in the spermatheca of *S. americana* e *D. carolina*.

These results obtained for lipids showed a low production of these elements in spermathecae, suggesting that, similarly to polysaccharides, they might be produced only to form complexes with other compounds. The small amounts of polysaccharides and lipids found in the spermathecae of ants of the genus *Atta*, as opposed to the large quantities of proteins, suggest that the spermathecal secretion primarily consists of proteins, but that form complexes with lipids and polysaccharides.

In some studies on the reproductive system of bees, reported that phospholipids can also used as a source of energy, although in this case, oxidative energy for respiration^[22]. The use of this compound might be associated to the fact that, under aerobic conditions, the spermatozoon might be mobile for at least three hours before ejaculation.

There are few studies specifically on the secretion produced by spermathecal secretory cells, as well as the secretion present in the spermatheca. Some of them, however, have demonstrated that the secretion present in the lumen of the spermatheca, product of secretory cells, is of glycoprotein nature^[18,23-25]. The spermatozoa utilize this secretion as a source of energy and are in constant movement inside this structure.

The spermatozoa of most insects have been described as elongated and filamentous structures^[26,27], as also observed in all ant species examined in the present study. Histochemical tests revealed that spermatozoa of these ants species are elongated and uniform structures consisted primarily of polysaccharides and proteins, as lipids were only observed in the membrane of spermatozoa of *A. laevigata* and *A. s. sexdens*.

These preliminary morphological datas on the spermatheca of queens of *A. s. sexdens*, *A. s. piriventris*, *A. laevigata*, *A. coronatus* and *C. muelleri* revealed that the latter three species present only an external secretory epithelium (spermathecal gland); *A. s. sexdens* exhibits an external as well as an internal secretory epithelium; and *A. s. piriventris* presents only an internal secretory epithelium.

Since *A. s. piriventris* exhibits a secretory epithelium only in the internal region of the spermatheca, this suggests that the spermatheca itself might be self-sufficient to produce all elements of secretion in order to maintain the spermatozoa viable, without the need of exogenous elements from the hemolymph. The little or no dependence on exogenous

compounds in relation to the spermatheca that contribute to provide a suitable microhabitat for the spermatozoa until egg fertilization might increase the chances of survival of the species, even during unfavorable environmental conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work by supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant nº 03/05485-0. The authors wish to thanks to Antônio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte, Gerson Mello Souza and Cristiane Márcia Mileo for their technical support.

REFERENCES

1. Thornhill, R. and J. Alcock, 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard Press, Cambridge, Mass.
2. Chapman, R.F., 1998. The Insects: Structure and Function. New York, Elsevier, pp: 770.
3. Davey, K.G., 1985. The Female Reproductive Tract. Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (Ed). Comprehensive Insect Physiology: Embryogenesis and Reproduction. Pergamon Press.
4. Eberhard, W.G., 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton: Princeton University Press.
5. Happ, G.M. and C.M. Happ, 1970. Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Tissue Cell., 2: 443-466.
6. Grodner, M.L. and W. Steffens, 1978. Evidence of a chemotatic substance in the spermathecal gland of the boll weevil. Trans. Am. Microsc. Soc., 97: 116-120.
7. Gillot, C., 2003. Male accessory gland secretions: Modulations of female reproductive physiology and behaviour. Annu. Rev. Entomol., 48: 163-184.
8. Kaulenas, M.S., 1992. Insect Accessory Reproductive Structures: Function, Structures and Development. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
9. Villavaso, E.J., 1975. The role of the spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*. J. Insect. Physiol., 21: 1457-1462.
10. Berry, D.J., 1985. Material direction of oogenesis and early embryogenesis in insects. Annu. Rev. Entomol., 27: 205-227.
11. Lay, M., D. Zissler and R. Hartmann, 1999. Ultrastructural and functional aspects of the spermatheca of the African Migratory Locust *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche and Fairmaire) (Orthoptera: Acrididae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 28: 349-361.
12. Poole, H.K., 1970. The wall structure of the honey bee spermatheca with comments about its function. Ann. Entomol. Soc. Am., 63: 1625-1628.
13. Gupta, B.L. and D.S. Smith, 1969. Fine structural organization of the spermatheca in the cockroach *Periplaneta americana*. Tissue and Cell., 1: 295-324.
14. Happ, G.M. and C.M. Happ, 1975. Fine structure of the spermathecae of the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. Cell Tissue Res., 162: 253-269.
15. Tombes, A.S. and R.M. Roppel, 1972. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera, Curculionidae). Int. J. Insect. Morphol. Embryol., 1: 141-152.
16. Cruz-Landim, C. and J.E. Serrão, 2002. Ultrastructure of the spermathecal gland of *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). Braz. J. Morphol. Sci., 1: 9-16.
17. Gillot, C., 1988. Insecta. In Reproductive Biology of Invertebrates. Vol. III. Accessory Sex glands. Edited by K.G. Adiyodi and R.D. Adiyodi. John Wiley & sons Ltd., U.K., p. 356-471.
18. Clements, A.N. and S.A Potter, 1967. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Insect. Physiol., 13: 1825-1836.
19. Dallai, R., 1975. Fine structure of the spermathecae of *Apis Mellifera*. J. Insect Physiology., 21: 89-109.
20. Camargo, J.M.F. and M.L.S. Mello, 1970. Anatomy and histology of the genital tract, spermatheca, spermathecal duct and glands of *Apis mellifera* queens (Hymenoptera: Apidae). Apidologie., 1: 351-373.
21. Gardner, G.E., 2004. Morphological and histological aspects of the spermatheca as they relate to sperm organization in the grasshopper species *Schistocerca americana* and *Dissosteira carolina* (Orthoptera: Acrididae). 2004, 41f. Thesis (Degree of Master of Science)-Faculty of North Carolina State University, Raleigh.
22. Blum, M.S., Z. Glowska and S. Taber, 1967. Composition and possible significance of fatty acids in the lipid classes in honey bee semen. Journal of Insect Physiology., 13: 1301-1308.
23. Ahmead, L. and C. Gillot, 1982a. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) I. Morphology, histology and histochemistry. Int. J. Invert. Rep., 4: 281-295.
24. Ahmead, L. and C. Gillot, 1982b. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) II. Ultrastructure. Int. J. Invert. Rep., 4: 297-309.
25. Bhatnagar, R.D. and A.J. Musgrave, 1971. Aspects of the histophysiology of the spermathecal gland of *Stophilus granarius* (L) (Coleoptera). Canad. J. Zool., 49: 275-277.
26. Baccetti, B., 1972. Insects sperm cell. Advances in Insects Physiology, London., 9: 315-395.
27. Dallai, R. And B. Afzelius, 1993. Axonemal structure and insect phylogeny. Boll. Zool., 60: 423-429.

CAPÍTULO 3

TÍTULO: “Phylogenetic study on attines ants based on the results of morphology of spermathecae and molecular biology (Hymenoptera: Myrmicinae)”.

AUTORES: Gabriela Ortiz¹, Maurício Bacci Jr.² e Maria Izabel Camargo-Mathias³

^{1,3.} Departamento de Biologia – Instituto de Biociências - UNESP. Av. 24A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19) 3524-0009.

^{2.} Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Instituto de Biociências - UNESP. Av. 24A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4160.

Corresponding author: micm@rc.unesp.br

Artigo submetido ao periódico: *Journal of Morphology* (2007).

RESUMO

Dada a importância econômica das formigas da tribo Attini na agricultura, o presente estudo teve como objetivo correlacionar as informações obtidas através dos resultados morfológicos obtidos das espermatecas e das seqüências de DNA de rainhas de formigas das espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*, na tentativa de fornecer mais informações que possam contribuir para o estabelecimento da filogenia deste grupo de insetos. A espécie *Wasmannia auropunctata* foi utilizada como grupo externo. As análises filogenéticas realizadas a partir das seqüências dos loci mitocondriais estudados geraram uma árvore mais parcimoniosa, onde foi possível verificar que *Cyphomyrmex muelleri*, espécie na qual a espermateca possui apenas glândula espermatecal (externa), seria a mais basal entre as atines estudadas, seguida por *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*, respectivamente. As espécies pertencentes aos gêneros *Atta*, a saber: *Atta laevigata* e *Atta sexdens rubropilosa*, que possuem apenas glândula espermatecal, *Atta sexdens sexdens* e *Atta capiguara*, que possuem tanto glândula espermatecal como epitélio secretor interno e *Atta sexdens piriventris*, que possui apenas epitélio secretor interno, e *Acromyrmex*, a saber: *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, que possuem apenas epitélio secretor interno, destacaram-se como as mais derivadas dentro do grupo.

Através dos dados morfológicos e moleculares obtidos para as espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Cyphomyrmex muelleri*, não se poderia ainda, baseando-se apenas na morfologia das espermatecas, afirmar que a evolução teria substituído as células secretoras externas (glândula espermatecal) por células secretoras internas, e nem que tivesse ocorrido uma externalização destas células secretoras, pois tanto a espermateca da espécie *Cyphomyrmex muelleri*, considerada a mais basal dentro do grupo, quanto as de *Atta laevigata* e *Atta sexdens rubropilosa*, consideradas as mais derivadas, apresentaram

glândula espermatecal. Ainda nas mais derivadas, as espécies de *Acromyrmex* apresentaram apenas epitélio secretor interno, enquanto que as de *Atta* apresentaram ou a glândula espermatecal, ou o epitélio secretor interno ou ainda ambos. Portanto, os dados morfológicos e moleculares aqui obtidos poderiam sugerir a ocorrência de uma evolução paralela, ou seja, independente de características morfológicas similares ou idênticas, que em linhagens relacionadas usualmente se acredita ser baseada em modificações dos mesmos passos de desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE: formigas, espermateca, glândula espermatecal, filogenia, biologia molecular, Attini.

ABSTRACT

Given the economic importance of ants of the tribe Attini in agriculture, the present study aimed at correlating the information obtained using results of the morphology of spermathecae and DNA sequences of queens of ants of the species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp. and *Mycocepurus goeldii* to contribute for the phylogeny of this group of insects. The species *Wasmannia auropunctata* was used as external group. The phylogenetic analyses conducted based on the sequences of mitochondrial loci generated a most parsimonious tree, in which *Cyphomyrmex muelleri*, a species with a spermatheca with only an external spermathecal gland, was the most basal species among attines ants already examined, followed by *Apterostigma* sp. and *Mycocepurus goeldii*, respectively. The following species of the genera *Atta*, *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*, which have only an spermathecal gland, *Atta sexdens sexdens* and *Atta capiguara*, which presented a spermathecal gland as well as an internal secretory epithelium, and *Atta sexdens piriventris*, which have only an internal epithelium, and *Acromyrmex*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti*, in which the spermatheca has only an internal secretory epithelium (Ortiz; Camargo-Mathias, 2007), were the most derived within the group. This confirms other phylogenetic studies already conducted.

Using the morphological and molecular data for the *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* and *Cyphomyrmex muelleri*, it is not possible yet, based only on the morphology of spermathecae, to infer that during evolution, external secretory cells (spermathecal gland) were substituted for internal secretory ones, or that an externalization of these secretory cells occurred, since the spermatheca of *Cyphomyrmex muelleri*, considered the most basal within the group, as well as those of *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*, considered the most derived ones, exhibited spermathecal glands. Also, derived species of *Acromyrmex* exhibited only an internal secretory epithelium, while *Atta*, or an

external spermathecal gland, or an internal secretory epithelium or both. Our findings suggest the occurrence of a parallel evolution, which is independent of similar or identical characteristics, and that are thought to be based on modifications of the same steps of development in related lineages.

KEY WORDS: ants, spermatheca, spermathecal gland, phylogeny, molecular biology, Attini.

INTRODUCTION

Present in nearly every habitat on Earth, ants play an important role, maintaining the stability of the environment, soil conditions, pollination of plants, and seed dispersal. However, these insects may become pests in altered environments (Hölldobler; Wilson, 1990).

Leaf-cutting ants are endemic of neotropical regions and belong to the tribe Attini, consisted of species that cultivate their own food, a fungus that receives special treatment from workers (Hölldobler; Wilson, 1990). These ants, belonging to the genera *Atta* and *Acromyrmex*, have received special attention due to the damage they cause when cutting and transporting to their nests leaves of: pastures, forests, cultivated and wild plants, with considerable agricultural losses in different regions of the Americas (Fowler *et al.*, 1986).

Between more derived and more basal (or plesiomorphic) attines, there is a remarkable difference regarding their reproductive capacity. Derived species form colonies with usually one queen and over a million polymorphic individuals, reaching up to five million workers. Basal species, on the other hand, form colonies with one queen and approximately up to 50 monomorphic individuals (Hölldobler; Wilson, 1990). The high capacity of leaf-cutting ants to increase their progeny is also associated with the number of times queens mate during the nuptial flight. The number of matings of the queen is one of the reasons that influence the relationship in the colony and the genetic diversity in social hymenopterans, and estimating the frequency of matings is important for studies on selection of castes inside the colony (Ratnieks, 1988; Boomsma; Grafen, 1991; Pamilo *et al.*, 1994; Schmid-Hempel, 1994). Studies suggested that attines evolved to increase the capacity of mating of queens, and this might be associated with an increase in the capacity of spermatheca, a specialized organ responsible for maintaining the collected spermatozoa viable during long periods.

The morphology of the spermatheca of insects varies among species, but it basically consists of a sac that may have associated spermathecal glands. When these glands are absent, the internal epithelium lining the spermatheca secretes and

provides nutrients and adequate conditions for the survival of spermatozoa (Chapman, 1998; Davey, 1985).

Considerations on the anatomy, histology, and ultrastructure of spermatheca become much more complex when social insects are considered. They exhibit differences between queens and workers regarding the presence, size and histology of spermatheca, as well as the secretion stored in the reservoir (Peeters *et al.*, 1999). Thus, an analysis of the anatomy of spermatheca, in general, may be an important tool in phylogenetic studies. Results at this level may be significant, since phylogenetic analyses of ants are traditionally based only on the morphology of larvae (Schultz; Meier, 1995), or adult males (Borgmeier, 1950), and the characters examined in these analysis are not informative enough to provide an ideal resolution in the generated trees (Schultz; Meier, 1995).

Fundamental evolutionary questions on attines ants still remain unanswered due to poor understanding of their phylogenetic relationships (Schultz; Meier, 1995). The relationships among attines genera previously proposed show little agreement. For instance, Wheeler (1910) proposed that *Myrmicocrypta* was the most basal genus among attines. Weber (1972) and Hölldobler and Wilson (1990), however, considered *Cyphomyrmex* the genus with the most basal traits. Emery (1912) presented a phylogenetic tree of the tribe Attini describing a basal dichotomy, with *Myrmecocrypta* and *Apterostigma* on one branch and all other attines on another. Kusnezov (1963) proposed that *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* and *Mycocepurus* were the basal genera and considered *Cyphomyrmex* an intermediary genus. Among all phylogenies proposed, the only agreement was that *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* and *Atta* were considered derived genera (Wheeler, 1910; Hölldobler; Wilson; 1990; Emery; 1912; Kusnezov, 1963).

Ribosomal and mitochondrial DNA sequences have been often used in studies on ants (Formicidae) to establish phylogenic relationships (Ward; Brady, 2003; Wetterer *et al.*, 1998). Complete preliminary trees of the family Formicidae based on ribosomal DNA have been presented by Sullender (1998) and Maddison (2002). However, the high content of A/T nucleotides in the mitochondrial genome of Hymenoptera makes this region less useful, unless the mutability of G/C

nucleotides is sufficiently high to account for the content of A/T bases, as observed in honey bees (Koulianos; Crozier, 1999).

From an evolutionary point of view, the mitochondrial DNA exhibits interesting characteristics, as it has an exclusive maternal inheritance, without recombination and intra-specific polymorphism, making it suitable in phylogenetic studies (Avisé *et al.*, 1987).

Preliminary results indicate the region of the intergenic spacer (IGS), located between coding genes of the Cytochrome Oxidase I (COI) and the Leucine transporter RNA (Leu-tRNA), as very appropriate in evolutionary studies to differentiate subspecies and populations of attines ants (Bacci *et al.*, 2001).

Establishing a reasonable phylogeny for attines ants may help answer some old evolutionary questions on the relationship of these ants with their fungi. While most attines cultivate fungi in the form of mycelium, one group of species, *Cyphomyrmex rimosus* cultivates the fungus in yeast form. If the latter forms a basal clade, then the cultivation of yeast might be a basal condition among attines, as suggested by Weber (1972). However, Wetterer *et al.* (1998) proposed that *Apterostigma* and *Mycocepurus* would be more basal genera than *Cyphomyrmex*. Thus the cultivation of yeast by *C. rimosus* would be a derived characteristic.

Many other questions involving the phylogeny of ants of the tribe Attini deserve more attention. Thus, the analysis of the structure of spermatheca in different basal and derived genera of the tribe Attini may contribute to clarify the evolutionary history of this tribe as well as the understanding of the specialization of the reproductive system through the evolution of these ants.

Based on the above described and given the economic importance of these insects, the present study aimed at correlating the morphological data of spermatheca and molecular data (DNA sequences), to contribute for the establishment of a phylogeny for this group of insects.

MATERIAL AND METHODS

For this study, were used mated queens of the ant species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata* (specimens provided by Dr. Odair Corrêa Bueno – Center for Studies in Social Insects – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP/Brazil), *Atta sexdens sexdens* (provided by Dr. Jacques Delabie and collected at CEPLAC – Ilhéus/Bahia/Brazil), *Atta sexdens piriventris* (provided by Fábio Moreira Link and collected in Santa Maria/RS/Brazil), *Atta capiguara* (specimens provided by Dr. Fernando Pagnocca – Center for Studies in Social Insects – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP/Brazil), *Apterostigma* sp., *Cyphomyrmex muelleri* (specimens provided by Dr. Ulrich Mueller – University of Texas – Austin/USA), *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* and *Mycocepurus goeldii* (collected on the UNESP – Rio Claro/SP/Brazil). The species *Wasmannia auropunctata* was used as external group. All equipment was available at the CEIS - Center for Studies in Social Insects of UNESP of Rio Claro/SP/Brazil were used.

DNA extraction with TNES

Lysis

Two specimens of each species of *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Apterostigma* sp., *Cyphomyrmex muelleri* and *Mycocepurus goeldii* were individually processed. Ants were divided into three parts (head, thorax, and gaster) and each part was transferred to a 1.5 mL microtube and smashed with a plastic pestle. Then, 50 µL of solution and a small fragment of tissue were added to a 1.5 mL Eppendorf. With the aid of pipette tip previously closed under a flame, the sample was homogenized with the Eppendorf maintained in ice, followed by addition of 600 µL of TNES solution. Then 5 µL of proteinase K (20mg/mL) were added to the sample, which was then placed in an incubated for 3 hours at 55°C for digestion.

Treatment with RNase A

After the sample returned to room temperature, 5 μL of RNase A (4mg/mL) were added to the sample that was then placed in an incubator at 37°C for 30 minutes.

Precipitation of Proteins

In sequence, 280 μL of 5M NaCl were added to the sample, Vortex mixing for 20 seconds in high speed and centrifuging at 15000xg for 5 minutes.

Precipitation of DNA

Six hundred μL of isopropanol 100% were added into a 1.5 mL Eppendorf. The supernatant containing DNA, obtained by centrifuging, was transferred to this Eppendorf, while the Eppendorf with the pellet with protein was discarded. The Eppendorf tube was inverted 50 times and centrifuged at 15000xg for 3 minutes, and the supernatant was then discarded, 600 μL of ethanol 70% were added and the Eppendorf was inverted 30 times and centrifuged at 15000xg for 3 minutes. Ethanol was then discarded using a vacuum pump without displacing the pellet. The Eppendorf was allowed to completely dry at room temperature.

Hydration of DNA

Thirty-five μL of DNA Hydration Solution (buffer TE) were added to the pellet of DNA, and the sample was stored at -80°C to preserve the DNA.

Amplification of Mitochondrial Regions

The regions of the mitochondrial genome corresponding to the genes Cytochrome-Oxidase I (COI), Intergenic Spacer (IGS), Leucine Transporter RNA (Leu-tRNA) and Cytochrome-Oxidase II (COII) were amplified by PCR. Each reaction contained 0.1 µg of genomic DNA, 1 pmol of each primer, 1 portion of PCR Ready-to-Go (Amersham 27-9555-01), that was then denatured (94 °C, 3 min) followed by 30 cycles of PCR (94° C-10 sec, 37° C-1 min, 72 °C-3 min). The primers Jerry (TGTAAGCGGGGGAACCTGAATCGGGGTAC) and Marilyn (TGGATTCCGCGT-GGTACCTCCCGGCCACC) were used.

Purification and sequencing of DNA

The amplified markers were purified with UltraClean PCR Clean-Up Kit-MOBIO. The DNA was then quantified by spectrophotometry at 260 nm. The sequencing reaction contained 100 ng of purified amplicon, 1 pmol of primer, and 2.0 µL of Big Dye (PE Applied Biosystems 4303153), 2 µL Tris 100 mM with MgCl₂ 2.5 mM, pH 9.0, in a final volume of 10 µL. An initial denaturation was performed (90 sec at 96° C), followed by 25 PCR cycles (12 sec at 96° C, 6 sec at 50° C, 4 min at 60° C). After the reaction, the sequencing products were purified according to the manufacture's instructions and separated in polyacrylamide gel in an ABI 377 sequencer (PE Applied Biosystems, located at CEIS-Center for Studies in Social Insects-UNESP- Rio Claro, SP).

Phylogenetic analyses

The sequences obtained were edited with BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999) and aligned using the program Clustral (Thompson *et al.*, 1994). *Wasmannia auropunctata* was used as an outgroup species. To construct phylogenetic trees, sequences examined using the Maximum Parsimony (MP) method with PAUP 4b10 (Swofford, 2003), with 1000 heuristic searches with the same weight for all

characters. The support of branches was estimated by *bootstrap* (BS) analysis (Felsenstein, 1985) for 1000 pseudo-replicates.

RESULTS

The results of the molecular analyses based on the sequencing of the regions of the mitochondrial genome corresponding to the genes Cytochrome Oxidase I (COI), Intergenic Spacer (IGS), Leucine Transporter RNA (Leu-tRNA) and Cytochrome Oxidase II (COII) of queens of the ant species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp., and *Mycocepurus goeldii* using the methods previously described indicate good quality sequences (Fig. 1). The composition of sequenced loci of the study species exhibits a predominance of A/T nucleotides, which would be expected for mitochondrial DNA and for hymenopterans in general.

The intergenic spacer region (IGS), located in between mitochondrial coding genes of the Cytochrome Oxidase I (COI) and Leucine Transporter RNA (Leu-tRNA) is highly variable among attines ants and is characterized by the highest content of A/T and lowest homoplasmy index, as observed in the sequences of the ants examined in this study (Fig. 1).

The COI and COII regions, as well as the Leu-tRNA region, are highly conserved in these species, facilitating the alignment of sequences (Fig. 1).

The phylogenetic analyses conducted based on the sequencing of the mitochondrial loci examined generated one single most parsimonious tree (Fig. 2). *Cyphomyrmex muelleri*, a species that based on morphology exhibited a spermatheca with only an spermathecal gland, was the most basal species among attines currently examined, followed by *Apterostigma* sp. and *Mycocepurus goeldii*, respectively. The species of the genera *Atta*: *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*, which presented only a spermathecal gland externally to the spermatheca, *Atta sexdens sexdens* and *Atta capiguara*, which presented a spermathecal gland as well as an internal secretory epithelium, and *Atta sexdens piriventris*, which have only an

internal epithelium, and *Acromyrmex*: *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti*, in which the spermatheca has only an internal secretory epithelium, were the most derived within the group.

FIGURES

FIGURE 1: Sequences of the mitochondrial genome corresponding to the loci Cytochrome Oxidase I (COI) (1-91 bp), IGS (92-224 bp), Leu-tRNA (225-296 bp) and Cytochrome Oxidase II (COII) (226-451 pb) of queens of the ants *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*.

FIGURE 2: Single most parsimonious tree with 383 steps using a heuristic search with TBR branching swapping. The numbers under nodes represent the bootstrap values obtained with 1000 replicates. CI = 0.6919, HI = 0.3081, RI = 0.6456.

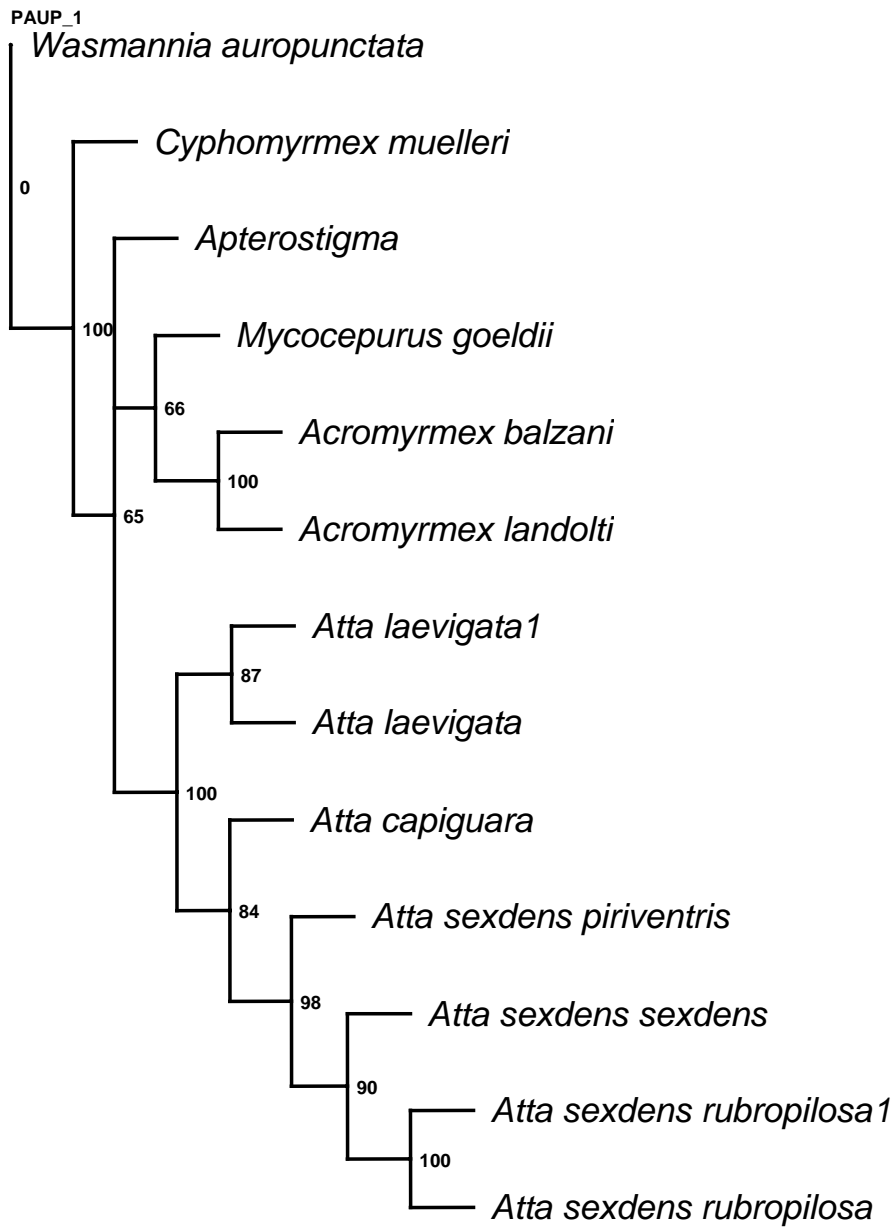
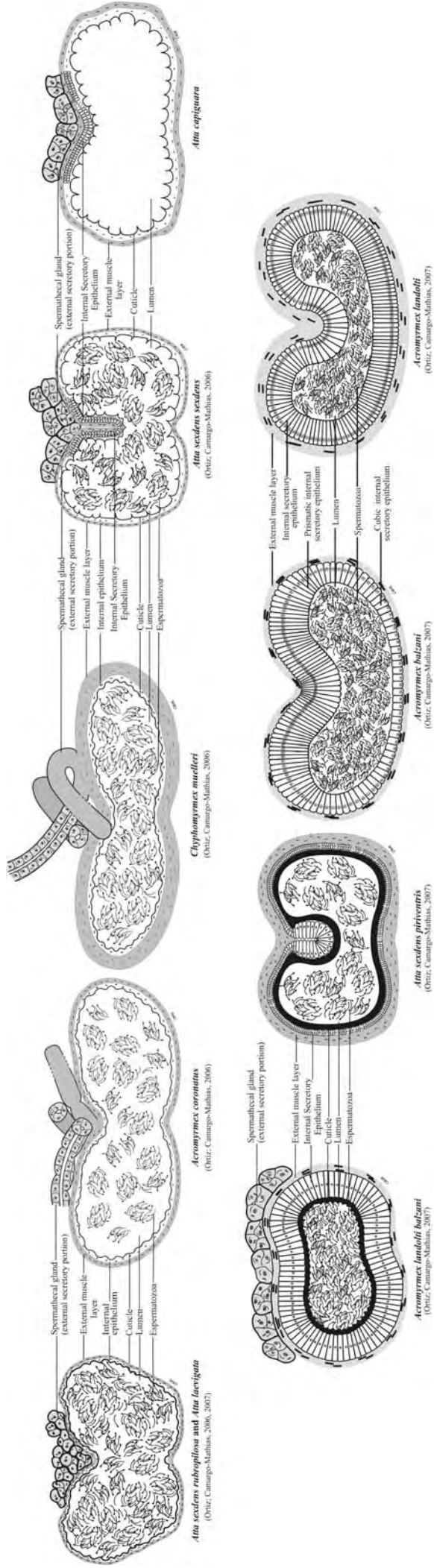


FIGURE 3: Schematic diagram showing the bilobed sac morphology of the spermatheca of the ants *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex coronatus*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani* and *Cyphomyrmex muelleri*.



DISCUSSION

Considerations on the anatomy, histology, and ultrastructure of spermatheca become much more complex when social insects are considered. Most exhibit differences between queens and workers and consequently differences in size and morphological composition of the spermatheca and the secretion they contain (Peeters *et al.*, 1999; Ortiz; Camargo-Mathias, 2006, 2007).

Despite this complexity, Ortiz and Camargo-Mathias (2006, 2007) have reported differences among spermathecae of the attines ants: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri*. The species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* and *Cyphomyrmex muelleri* exhibited only a spermathecal gland externally to the spermatheca. The species *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* and *Acromyrmex landolti balzani* presented a spermathecal gland as well as an internal secretory epithelium. *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti* exhibited only an internal secretory epithelium, and their spermatheca appears as an independent organ for the maintenance of spermatozoa, suggesting a specialization.

Mitochondrial DNA sequences have been frequently been used to establish phylogenetic relationships among genera, tribes, and subfamilies of Formicidae. However, the large amount of A/T nucleotides in the mitochondrial genome of hymenopterans, as observed in the species examined in this study, makes this region less useful, unless the mutability of G/C nucleotides is sufficiently high to account for the content of A/T bases, as observed in honey bees (Koulianos; Crozier, 1999). According to Moritz *et al.* (1987), no-coding regions of mtDNA tend to be less conserved and exhibit a higher evolutionary rate than coding regions.

The genes Cytochrome Oxidase I (COI) and II (COII) are excellent for phylogenetic comparisons among genera and species within the tribe Attini (Wetterer *et al.*, 1998). This region has been successfully used in other basic phylogenetic studies on Hymenoptera, although with similar problems associated with the high

content of A/T bases, as also observed in this study. Therefore, the use of this region is not suitable for more complex phylogenetic studies (Liu; Beckenbach, 1992).

In this study, the phylogenetic analyses conducted based on sequences of mitochondrial loci generated one single most parsimonious tree. *Cyphomyrmex muelleri*, a species that based on morphology exhibited a spermatheca with only an spermathecal gland (Ortiz; Camargo-Mathias, 2006), was the most basal species among attines currently examined, followed by *Apterostigma* sp. and *Mycocepurus goeldii*, respectively. The species of the genera *Atta*: *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*, which based on their morphology, present only a spermathecal gland externally to the spermatheca, *Atta sexdens sexdens* and *Atta capiguara*, which presented a spermathecal gland as well as an internal secretory epithelium (Ortiz; Camargo-Mathias, 2006, 2007), and *Atta sexdens piriventris*, which have only an internal secretory epithelium (Ortiz; Camargo-Mathias, 2006, 2007), and *Acromyrmex*: *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti*, in which the spermatheca has only an internal secretory epithelium (Ortiz; Camargo-Mathias, 2007), appear as the most derived species within the group, as observed in other phylogenetic studies (Weber, 1982, Wetterer *et al.*, 1998).

Based on morphological and molecular data obtained for the species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* and *Cyphomyrmex muelleri*, it is not possible to conclude, based only on the morphology of spermathecae, that during evolution, the external secretory cells (spermathecal gland) were substituted by internal ones, or that the latter were externalized, since the spermatheca of *Cyphomyrmex muelleri*, considered the most basal species within the group, as well as those of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*, considered the most derived, have spermathecal glands. Moreover, among the most derived species, ants of the genus *Acromyrmex* exhibited only an internal secretory epithelium, while species of *Atta* exhibited, or an external spermathecal gland, or an internal secretory epithelium or both.

Our findings, however, suggest the occurrence of a parallel evolution, which is independent of similar or identical characteristics, and that are thought to be based on modifications of the same steps of development in related lineages. Since related

species exhibit similar developmental stages, parallelism is frequent among them, and trends of parallel evolution are evident in almost all large groups (Futuyma, 2002).

It is not surprising that parallel evolution is common. If related species present similar developmental patterns, they might change similarly if subjected to the same selective pressures (Futuyma, 2002).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant n° 03/05485-0. The authors wish to thanks Antônio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte, Gerson Mello Souza, Cristiane Márcia Mileo and Joaquim Martins for their technical support.

REFERENCES

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18:489-522.

Bacci M, Silva ACO, Martins VG, Pagnocca FC, Bueno OC, Hebling MJA. 2001. A molecular marker for evolution studies of closely related specimens of higher atines ants. *Anais da XXX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, p. 37.

Boomsma JJ, Grafen A. 1991. Colony-level sex ratio selection in the eusocial Hymenoptera. *J Evol Biol* 3:383-407.

Borgmeier T. 1950. Estudos sobre *Atta* (Hym., Formicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 48:239-264.

Chapman RF. 1998. *The insects: structure and function*. New York, Elsevier. 770 p.

Davey KG. 1985. The female reproductive tract. In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. (Ed.) *Comprehensive Insect Physiology: Embryogenesis and Reproduction*. Pergamon Press 1.

Emery C. 1912. Études sur le Myrmicinae. *Ann Soc Entomol Belg* 56:94-105.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: an approach using of bootstrap. *Evol* 39:783-791.

Fowler HG, Pereira-Da-Silva V, Forti LC, Saes NB. 1986. Population dynamics of leaf-cutting ants. A brief review. In: Fire Ants and Leaf Cutting Ants: Biology and Management (eds. Lofgren, C. S.; Vander Meer, R. K.), p. 123-145. Westview Press, Boulder.

Futuyma DJ. 2002. *Biologia Evolutiva*. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP. 661p.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc Ac Sym Series* 41:95-98.

Hölldobler B, Wilson EO. 1990. *The ants*. Harvard University Press. 732p.

Koulianos S, Crozier RH. 1999. Current intraspecific dynamics of sequence evolution differs from long-term trends and can account for the AT-richness of honeybee mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 49:44-48.

Kusnezov N. 1963. Zoogeografía de las hormigas en Sudamerica. *Acta Zool Lilloana* 19:3-186.

Liu H, Beckenbach AT. 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insect. *Mol Phylogenet Evol* 1:41-52.

Maddison DR. 2002. Tree of life. Formicidae. Available in <http://tolweb.org/tree/>.

Moritz C, Dowling TE, Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevant for population biology and systematics. *Ann Rev Ecol Sys* 18:269-292.

Ortiz G, Camargo-Mathias MI. 2006. Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae). *American Journal of Agricultural and Biological Science* 1:58-65.

Ortiz G, Camargo-Mathias MI. 2007. Spermatheca of four species of ants of the tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological specialization. *Research Journal of Biological Sciences* 2:5-12.

Pamilo P, Sundström L, Fortelius W, Rosengren R. 1994. Diploid males and colony-level selection in *Formica* ants. *Ethol Ecol Evol* 6:221-235.

Peeters C, Ito F, Gebin B, Fannes W, Billen J. 1991. Queens-worker divergence in the spermatheca of Ponerinae and Myrmicinae ants. In: IUSI CONGRESS, 13. Adelaide. 3699 p.

Ratnieks FLW. 1988. Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. *Am Nat* 132:217-236.

Schmid-Hempel P. 1994. Infection and colony variability in social insects. *Proceedings of the Royal Society London B* 346:313-321.

Schultz TR, Meier R. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology* 20:337-370.

Swofford DL. 2003. *Phylogenetic analyses using parsimony, version 4.0b10*. Smithsonian Institution, Washington DC.

Sullender BW. 1998. A molecular phylogeny for the Formicidae. Available in http://www.ruf.rice.edu/~bws/molecular_phylogeny.html.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice. *Nuc Ac Re* 22:4673-4680.

Ward PS, Brady SG. 2003 Phylogeny and biogeography of the ant subfamily Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). *Invert Syst* 17:361-386.

Weber NA. 1972. *Gardening ants: the Attines*. Philadelphia: the American Philosophical Society. 146p.

Weber NA. 1982. Fungus Ants. *In "Social Insects"* (H. Hermann, Ed). Academic Press. New York, p. 255-363.

Wetterer JK, Schultz TR, Meier R. 1998. Phylogeny of fungus-growing ants (tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. *Mol Phylogenet Evol* 9:42-47.

Wheeler WC. 1910. *Ants: Their Structure, Development and Behavior*. Columbia Univ Press. New York. 663p.

.

CAPÍTULO 4

TÍTULO: “Virgin queens (gynes) of *Atta capiguara* (Hymenoptera: Myrmicinae): A morphological study regarding the phylogeny of the spermathecae”.

AUTORES: Gabriela Ortiz¹, Maurício Bacci Jr.² e Maria Izabel Camargo-Mathias³

^{1,3.} Departamento de Biologia – Instituto de Biociências - UNESP. Av. 24A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19) 3524-0009.

^{2.} Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Instituto de Biociências - UNESP. Av. 24A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4160.

Corresponding author: micm@rc.unesp.br

Artigo submetido ao periódico: *Acta Zoologica* (2007).

RESUMO

A espermateca das formigas tem sido considerada importante estrutura para o sucesso adaptativo destes indivíduos, visto que ela é responsável pela recepção e estocagem dos espermatozoides, desde a cópula até a fecundação dos ovos. *Atta capiguara* é uma espécie de formiga que causa sérios danos à agricultura. Dada a importância econômica deste inseto, estudou-se a espermateca de rainhas virgens (gynes) desta espécie através de técnicas de Histologia, Histoquímica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET), além do seqüenciamento do DNA, com vistas a trazer a luz informações sobre essa importante estrutura na biologia reprodutiva deste inseto. Os resultados revelaram que a espermateca de *Atta capiguara* possui forma de bolsa bilobada que se funde parcialmente na porção central. Foi observada a presença de glândula espermatecal, formada por agrupamentos celulares secretores desembocando no reservatório revestido por epitélio simples pavimentoso, e constituído de epitélio secretor simples com células variando de cúbicas a prismáticas apenas no local de fusão dos lobos espermatecais. Histoquimicamente, os dados revelaram que a espermateca reagiu com forte positividade em toda sua extensão ao teste para detecção de proteínas, porém, apresentou pouca quantidade de polissacarídeos. O teste aplicado para detecção de lipídios foi positivo, ocorrendo maior reação no citoplasma das células secretoras da glândula espermatecal.

Para um melhor entendimento da biologia molecular dos organismos têm-se utilizado freqüentemente seqüências de DNA mitocondrial. A região do espaçador intergênico possui a maior variação entre as atines e é caracterizada por uma alta quantidade de A/T e um baixo índice de homoplasia, o que também foi observado na seqüência de *Atta capiguara*. As regiões do COI e COII, bem como do Leu-tRNA regions, nesta espécie, mostraram-se altamente conservadas, facilitando o alinhamento das seqüências entre si.

PALAVRAS-CHAVE: formigas, espermateca, histologia, histoquímica, biologia molecular, glândula espermatecal, Attini.

ABSTRACT

The spermatheca of the ant has been considered an important structure for the adaptation of these individuals, because it is responsible for the reception and storage of spermatozoa, from copulation to egg fecundation. *Atta capiguara* is an ant species considered a pest causing serious economical damage to agriculture. The economical importance of this insect was an essential factor for conducting the present study. The spermatheca of this species was studied using Histology, Histochemistry, Scanning (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) techniques. The DNA sequencing was also studied to provide information about this important structure in the reproductive biology of this insect. The results revealed that the spermatheca of *Atta capiguara* possess a shape in the form of a bilobed sac that is partially fused at the central portion. The external spermathecal gland was observed and it is formed by secretory cellular groups, as well as a reservoir, consisting of a simple secretory epithelium with cubical and prismatic cells, covering only the part where the spermathecal lobes are fused, while the rest is lined by simple pavementous epithelium. Through the histochemical study, the data revealed that the spermatheca of this species reacts positively in all of its exposure to the protein detection test, but presented few polisacharydes. The test for lipid detection was positive, with a major reaction in the cytoplasm secretory cells of the spermathecal gland occurring.

To better understand the molecular biology of the organisms, sequences of mitochondrial DNA have been often used. The region of the intergenic spacer (IGS) possesses the most variation between attines ants and it is characterized by having the highest amount of A/T and the lowest index of homoplasy, which can also be observed in the sequences of *Atta capiguara* ants. The COI and COII regions, as well as Leu-tRNA regions, in this species, are highly maintained facilitating the alignment of sequences among them.

KEY WORDS: spermatheca, histology, histochemistry, spermathecal gland, Attini.

INTRODUCTION

The ants are considered the most successful individuals among the Hymenoptera regarding diversity, abundance and global dispersion, playing an important role in environmental stability, soil condition, plant polinization and seed dispersion. However, if the environment is altered because of human activity, these insects can become uncontrollable pests (Hölldobler; Wilson, 1990).

The leaf-cutter ants belong to the Attini tribe, formed by species with peculiar behaviour among animals, i.e., they cultivate their own food, a fungus that receives special treatment by the workers (Hölldobler; Wilson, 1990).

The Attini tribe includes 12 genera, which includes more than 200 described species, all cultivating fungus. The genera *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Sericomyrmex* and *Trachymyrmex* are considered the basal species, with *Atta* and *Acromyrmex* the derived.

The *Atta* genus, popularly know as “saúvas”, is the most derived from the Attini tribe with 14 described species, being largely distributed throughout the continent (Central and South America). These ants are characterized by their great capabilities of migration and adaptation to various environments (Weber, 1972).

The *Acromyrmex* genus represents the leaf-cutter ants known as “quenquéns”, having 63 species according to the Mayhé-Nunes (1991) revision.

The leaf-cutter ants, belonging to the *Atta* and *Acromyrmex* genera, have received special attention because of the damage they cause while cutting and transporting leaves from pastures, forests and cultivated to their nests, with considerable losses to agriculture in various regions of Central and South America (Fowler *et al.*, 1986).

Earlier studies showed that the females of the *Atta* and *Acromyrmex* genera present more frequency of mating than is found between many ants (Fjerdingstad *et al.*, 1998; Boomsma *et al.*, 1999; Bekkevold *et al.*, 1999), suggesting that the evolution of the attines took place in a way to increase the ability of the queens' copulation, which could be related to the increase of the capability of the

spermathecae, organs with the function of maintaining viable spermatozoa for long periods of time. The number of spermatozoa found in the spermatheca of some ant species surpasses 300 million, where each male has the capability of producing and transferring around 40 to 80 million to the female at a time (Kerr, 1962).

The spermatheca is an organ of ectodermic origin, consisting basically of a storage sac where associated glands can be frequently found (spermathecal glands). These glands produce secretions that maintain a microenvironment adequate to the spermatozoa surviving. In some insects these glands can be absent where the epithelium that covers the spermatheca internally will have the secretory function (Engelmann, 1970).

The secretory portion of the spermatheca of the insects produces different compounds such as: glycoprotein and glycoaminoglycans (Happ; Happ, 1970). The latter contain chemotactical substances responsible for transport and migration of spermatozoa from the bursa copulatrix of the female to the spermatheca of the *Anthnomus grandis* (Coleoptera), where the secretion can take precedence over the motility and capability of spermatozoa fecundation (Grodner; Steffens, 1978). Thus the removal of the spermathecal gland would lead to a gradual loss of spermatozoa motility and exhaustion of the spermatheca (Villavaso, 1975; Kaulenas, 1992; Gillot, 2003).

Studies of the anatomy, histology and ultrastructure of the spermatheca from social insects are more complex, since they present differences between the queens and workers with consequent differences in size, morphological aspects and secretion composition (Peeters *et al.*, 1999). According to some authors the spermatheca analysis could be an excellent tool for phylogenetic studies since the fundamental evolution questions about the attines ants remain unanswered due to the poor understanding of their phylogenetic relationships (Schultz; Meier, 1995). Therefore, the analysis of the spermatheca in this species could to provide information about this important structure in the reproductive biology of the ants and contribute to elucidate its evolutionary history.

MATERIAL AND METHODS

This study was performed using gynes (virgin queens) of *Atta capiguara* ants (individuals donated by Prof. Dr. Fernando Pagnocca – Social Insects Studies Centre – CEIS – São Paulo State University – UNESP – Rio Claro/SP/Brasil). The Histology and Electronic Microscopy laboratories from the Biology Department of the Biosciences Institute as well as CEIS provided the necessary equipment.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The spermatheca from the *Atta capiguara* ants were removed, placed in a sodium solution and fixated in a Karnovsky solution (2% Paraformaldehyde and 2.5% Glutaraldehyde in 0.1M Sorensen buffer), for 24 hours. They were then washed in distilled water and dehydrated in gradual concentrations of ethanol (70%, 90% and 95%), then 3 times with 100% alcohol, followed by a mixture of alcohol and acetone (1:1) and pure acetone, each for 10 minutes. The material was then processed in “Critical Point Drying”, sputtered with gold, examined and photographed using a PHILLIPS SEM 505.

Histology

For the histological studies the gynes specimens of *Atta capiguara* species were anesthetised in a freezer (thermal shock) and dissected with the help of a stereomicroscope in Petri dishes containing a sodium solution for insects. The spermathecae, after being removed, were fixed in 4% Paraformaldehyde for 24 hours. The properly fixated material was dehydrated in ethanol solutions of 70, 80, 90 and 95% for 15 minutes each. It was then transferred to a resin solution (JB-4 Polaron Instruments/Bio Rad) and kept in the fridge for 24 hours.

The specimens were then transferred to plastic mouldings previously filled with resin and catalyser. The mouldings were sealed in aluminum holders for microtomy. The blocks were polymerized and then sectioned using Sorvall JB-4/Bio

Rad Microtome. The 4 µm thick sections were hydrated and the slides containing the sections were hydrated with distilled water for 1 minute, stained with Hematoxilin for 10 minutes, washed and then stained with Eosin for 5 minutes. They were washed with tap water, dried and mounted with canada balsam.

Histochemistry

The individuals were anesthetized by thermal shock and dissected in a sodium solution. The spermathecae were fixed in 4% Paraformaldehyde (Bromophenol-Blue technique, in aqueous Bouin (PAS/Alcian Blue technique) and in Ca formal (Nile Blue technique), for 24 hours. The material was dehydrated in ethanol solutions of 70, 80, 90 and 95% for 15 minutes each. The material was then embedded in resin and sectioned 4 µm thick. The sections were hydrated, and stained with Bromophenol Blue (total protein detection), PAS/Alcian Blue (neutral and acidic polysaccharides detection) and Nile Blue (acid lipids detection). After being dried, the slides were mounted with canada balsam (Bromophenol Blue and PAS/Alcian Blue techniques) and glycerine agar (Nile Blue technique) for observation and photographic documentation.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The spermathecae of the virgin queens (gynes) of *Atta capiguara* species were removed and placed immediately in a Glutaraldehyde fixative (0.5%) then fixed in 2.5% Glutaraldehyde in 0.1M Cacodilate buffer for 2 hours at 4°C. They were washed twice in a cacodilate buffer for 15 minutes each, and post-fixed in a 1% osmium tetroxide and a 0.1M cacodilate buffer for 2 hours, also at 4°C, followed by 2 washes with the buffer for 15 minutes each. The material was contrasted using 2% uranile acetate, dissolved in 10% alcohol for 4 hours, dehydrated in gradual solutions of acetone (50, 70, 90, 95 and 100%) for 5 minutes each and then embedded in Epon resin diluted in acetone (1:1) for 12 hours. It was then included in pure Epon resin and transferred to an oven for 72 hours at 60°C for the polymerization. The semi-

and ultra-thin sections were made using an ultra-microtome. The semi-thin sections were stained with 1% Azur II and 1% Methylene Blue. The ultra-thin sections were transferred to screens and contrasted with uranile acetate and lead citrate. The screens were observed and photographed using a PHILLIPS CM 100 TEM.

Molecular Analysis

DNA extraction with TNES

Lysis

Two specimens of the species *Atta capiguara* were individually processed. Ants were divided into head, thorax, and gaster and each part was transferred to a 1.5 mL microtube and smashed with a plastic pestle. Then, 50 μ L of solution and a small fragment of tissue were added to a 1.5 mL Eppendorf. With the aid of pipette tip previously closed under a flame, the sample was homogenized with the Eppendorf maintained in ice, followed by addition of 600 μ L of TNES solution. Then 5 μ L of proteinase K (20mg/mL) were added to the sample, which was then placed in an incubated for 3 hours at 55°C for digestion.

Treatment with RNase A

After the sample returned to room temperature, 5 μ L of RNase A (4mg/mL) were added to the sample that was then placed in an incubator at 37°C for 30 minutes.

Precipitation of Proteins

In sequence, 280 μ L of 5M NaCl were added to the sample, Vortex mixing for 20 seconds in high speed and centrifuging at 15000xg for 5 minutes.

Precipitation of DNA

Six hundred μL of isopropanol 100% were added into a 1.5 mL Eppendorf. The supernatant containing DNA, obtained by centrifuging, was transferred to this Eppendorf, while the Eppendorf with the pellet with protein was discarded. The Eppendorf tube was inverted 50 times and centrifuged at 15000xg for 3 minutes, and the supernatant was then discarded, 600 μL of ethanol 70% were added and the Eppendorf was inverted 30 times and centrifuged at 15000xg for 3 minutes. Ethanol was then discarded using a vacuum pump without displacing the pellet. The Eppendorf was allowed to completely dry at room temperature.

Hydration of DNA

Thirty-five μL of DNA Hydration Solution (buffer TE) were added to the pellet of DNA, and the sample was stored at -80°C to preserve the DNA.

Amplification of Mitochondrial Regions

The regions of the mitochondrial genome corresponding to the genes Cytochrome-Oxidase I (COI), Intergenic Spacer (IGS), Leucine Transporter RNA (Leu-tRNA) and Cytochrome-Oxidase II (COII) were amplified by PCR. Each reaction contained 0.1 μg of genomic DNA, 1 pmol of each primer, 1 portion of PCR Ready-to-Go (Amersham 27-9555-01), that was then denatured (94°C , 3 min) followed by 30 cycles of PCR (94°C -10 sec, 37°C -1 min, 72°C -3 min). The primers Jerry (TGTAAGCGGGGAACTTGAATCGGGGTAC) and Marilyn (TGGATTCCGCGT-GGTACCTCCCGGCCACC) were used.

Purification and sequencing of DNA

The amplified markers were purified with UltraClean PCR Clean-Up Kit–MOBIO. The DNA was then quantified by spectrophotometry at 260 nm. The sequencing reaction contained 100 ng of purified amplicon, 1 pmol of primer, and 2.0 μ L of Big Dye (PE Applied Biosystems 4303153), 2 μ L Tris 100 mM with $MgCl_2$ 2.5 mM, pH 9.0, in a final volume of 10 μ L. An initial denaturation was performed (90 sec at 96° C), followed by 25 PCR cycles (12 sec at 96° C, 6 sec at 50° C, 4 min at 60° C). After the reaction, the sequencing products were purified according to the manufacture's instructions and separated in polyacrylamide gel in an ABI 377 sequencer (PE Applied Biosystems, located at CEIS - Center for Studies in Social Insects - UNESP- Rio Claro/SP/Brasil).

RESULTS

Morphology

The morphological results obtained from the spermatheca of ant queens *Atta capiguara* revealed that this structure is located at the beginning of the common oviduct of the female reproductive system, and it is presented as a bilobed sac that is partially fused at the central portion with a common lumen (Fig. 1 A). It is divided in two distinctive regions: a) the spermathecal gland (external secretory portion), composed of cellular groups with rounded morphology similar to acines (Figs. 1 A, B) and b) a reservoir (Figs. 1 A, C).

This way the spermatheca of the queens from the *Atta capiguara* species presents a large reservoir for storage and maintenance of the spermatozoa, which remains there from copulation until egg fecundation. The reservoir surface is wrinkled and tracheoles are inserted in the structure (Fig. 1 C).

Surrounding the spermatheca many fat body cells are observed (Fig. 1 A).

Histology

The spermatheca of the virgin queens (gynes) of *Atta capiguara* ants, presents a reservoir with its interior containing a large amount of wrinkles, since these individuals were not yet fecundated (Figs. 2 A, E, I, M). The histology shows the spermathecal gland, formed by cellular groups (Figs. 2 A, B, C, E, F, M, N) and the reservoir constituted of simple secretory epithelium with cells that vary from cubical to prismatic, covering only the fused portion of the spermathecal lobes (Figs. 2 A, B, C, E, F, G, I, K, M, O), with the rest covered by simple epithelium constituted of pavementous cells (Figs. 2 A, D, E, H, I, L, M). The presence of the spermatheca duct was also observed (Figs. 2 I, J).

The spermathecal gland possesses secretory cells with shapes that vary from round to polygonal, with the nucleus mimicing the cell shape and containing an average of two nucleoles (Figs. 2 B, C, F, N). In these glands are observed intracytoplasmic canalicules, internally lined with a thin cuticle with the function to collect the produced secretion and transfer it to the reservoir interior (Figs. 2 F, N).

Muscle layers cover the reservoir externally (Figs. 2 B, C, D, F, G, H, L) and a thin cuticular layer covers it internally (Figs. 2 A, B, C, E, F, G, H, I, K, L, M, O).

The presence of spermatozoa was not observed because these are individuals which were not yet fecundated.

Histochemistry

The techniques performed in the spermatheca of *Atta capiguara* reveal the presence of proteins, carbohydrates and lipids (Fig. 2).

The test to detect proteins shows that the whole spermatheca reacts with strong positivity, including the cells from the spermathecal glands (Figs. 2 E, F), the muscles (Figs. 2 F, G, H), the internal secretory epithelium (Figs. 2 E, F, G), the pavementous epithelium that covers the reservoir (Figs. 2 E, H), as well as the spermathecal secretion (Figs. 2 E, G, H). It is also observed that the prismatic

secretory cells of the internal secretory epithelium are strongly positive, while the cubical cells reacted weakly (Figs. 2 F, G).

The test for polysaccharides detection shows that the spermatheca reacted weakly, indicating little quantity of this substance. Some reaction can only be seen in the cuticle that covers the reservoir internally (Figs. 2 I, K), as well as in the cuticle that covers the spermathecal duct (Fig. 2 J). The cells of the internal secretory epithelium and the ones that cover the reservoir, as well as the secretions (spermathecal and the lumen of the spermathecal duct), show a positive reaction to the Alcian Blue test, indicating the presence of polysaccharides of an acidic nature (Figs. 2 I, J, K, L).

The test for lipids detection was positive (Figs. 2 M, N, O), where stronger reactions can be seen in the cytoplasm of the secretory cells of the spermathecal gland. The stained region probably corresponds to regions where the intracytoplasmic canalicules are located (Fig. 2 N). The cells from the internal secretory epithelium, as well as the cells from the pavementous epithelium that covers the reservoir also contain lipids (Figs. 2 M, O). The cuticle that covers the reservoir lumen reacted strongly, especially in the layer that is in direct contact with the lumen (Figs. 2 M, O).

Ultrastructure

The application of transmission electron microscopy techniques showed some aspects of the spermatheca of *Atta capiguara* gynes.

The intracytoplasmic collector canalicules of the secretory cells are covered by a thin cuticle and contain a homogeneous secretion in their interior (Figs. 3 B, C, D).

In the cytoplasm of the secretor cells the presence of organelles can also be observed. The mitochondria are the most frequent, appearing with various shapes and sizes, located in the corners of the cells and around the intracytoplasmic canalicules (Figs. 3 A, C, D, E, F). Another frequent organelle is the well developed rough endoplasmic reticulum (Fig. 3 C).

The presence of interdigitations in the plasmic membrane of secretory cells where they touch each other, in this way maintaining more adhesion, was also observed (Figs. 3 A, B).

Large quantities of mitochondria with rounded shape can be seen all over the cytoplasm of the lining epithelial cells, including around the openings of the intracytoplasmic canalicules (Figs. 3 E, F, G).

The presence of secretion vesicles, probably of a lipid nature, is observed in the cytoplasm of the secretory cells of the spermathecal glands as well as in the pavementous cells of the epithelium lining the reservoir (Figs. 3 A, B, D, F, G, H).

In the reservoir, the details of a thick cuticle with a laminate aspect, i.e., formed by electrondense and irregular layers disposed all the way around the lumen reservoir, is observed (Figs. 3 I, J, K). The presence of filaments, probably consisting of chitin, is also observed all over the cuticle (Fig. 3 L).

Molecular Analysis

The results obtained from the molecular analysis of the sequencing of the region of the mitochondrial genome corresponding to the Cytochrome Oxidase I (COI), Intergenic spacer (IGS), Leucine transporter RNA (Leu-tRNA) and Cytochrome Oxidase II (COII) genes of virgin queens (gynes) of *Atta capiguara* species, show the acquisition of a sequence said to be of fair quality (Fig. 4).

The results show the composition of the sequenced locus of the studied species with A/T nucleotides predominating, as well as those expected for mitochondrial DNA and particularly for the Hymenoptera in general (Koulianos; Crozier, 1999).

In this species the COI and COII regions are highly maintained (Fig. 4), permitting the observation that amino acid substitutions are rare (A by T and vice-versa or C by G and vice-versa).

FIGURES

FIGURE 1: SEM of gynes' spermatheca of *Atta capiguara*.

A. General view of the spermatheca, sgl = spermathecal gland (external secretory portion), r = reservoir, fbc = fat body cell. Bar = 0.3 μm . **B.** Detail of the spermathecal gland (sgl). Bar = 0.5 μm . **C.** Detail of the reservoir surface (r), tr = tracheole. Bar = 0.05 μm .

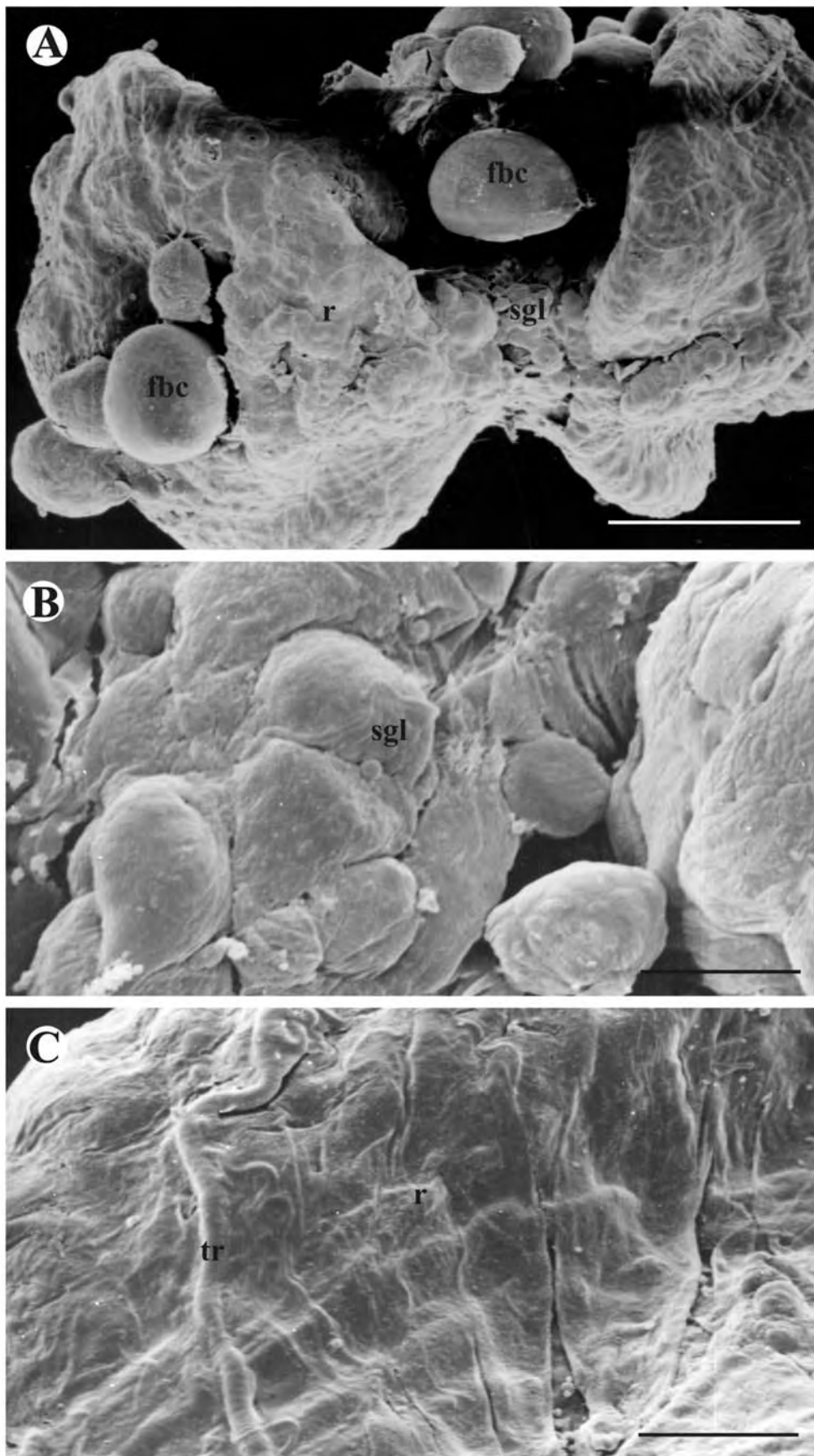


FIGURE 2: Histological sections of the spermatheca from gynes of *Atta capiguara*.

A. General view of the spermatheca stained with H/E. Bar = 100 μm . **B.** Detail of the spermathecal gland (sgl) (external secretory portion) stained with H/E. Bar = 20 μm . **C.** Transition region of the internal secretory epithelium, that changes from cubical (cse) to prismatic (pse), stained with H/E. Bar = 20 μm . **D.** Detail of the reservoir lined by pavementous epithelium (lpe) and surrounded by muscle (m) stained with H/E. Bar = 20 μm . **E.** General view of the spermatheca stained with Bromophenol Blue. Bar = 100 μm . **F. G.** Transition region of the internal secretory epithelium, that changes from cubical (cse) to prismatic (pse), stained with Bromophenol Blue. Bar = 20 μm . **H.** Detail of the reservoir lined by pavementous epithelium (lpe) stained with Bromophenol Blue. Bar = 20 μm . **I.** General view of the spermatheca stained with PAS/Alcian Blue. Bar = 100 μm . **J.** Detail of the spermatheca duct (du) with the secretion (s) in the lumen stained with PAS/Alcian Blue. Bar = 20 μm . **K.** Transition region of the internal secretory epithelium, that changes from cubical (cse) to prismatic (pse), stained with PAS/Alcian Blue. Bar = 20 μm . **L.** Detail of the reservoir lined by pavementous epithelium (lpe) stained with PAS/Alcian Blue. Bar = 20 μm . **M.** General view of the spermatheca stained with Nile Blue. Bar = 100 μm . **N.** Detail of the spermathecal gland (sgl) (external secretory portion) stained with Nile Blue. Bar = 20 μm . **O.** Transition region of the internal secretory epithelium, that changes from cubical (cse) to prismatic (pse), stained with Nile Blue. Bar = 20 μm .

m = muscle, sgl = spermathecal gland (external secretory portion), n1 = nucleus of a cell from the spermathecal gland, se = internal secretory epithelium, n2 = nucleus of a cell from the internal secretory epithelium, pse = prismatic secretory epithelium, cse = cubical secretory epithelium, lpe = lining pavementous epithelium, n = nucleus of the epithelial cell, arrow = cuticle, s = secretion in the interior of the spermatheca, l = lumen, ca = intracytoplasmic canalicule, ad = adipocyte, du = spermatheca duct.

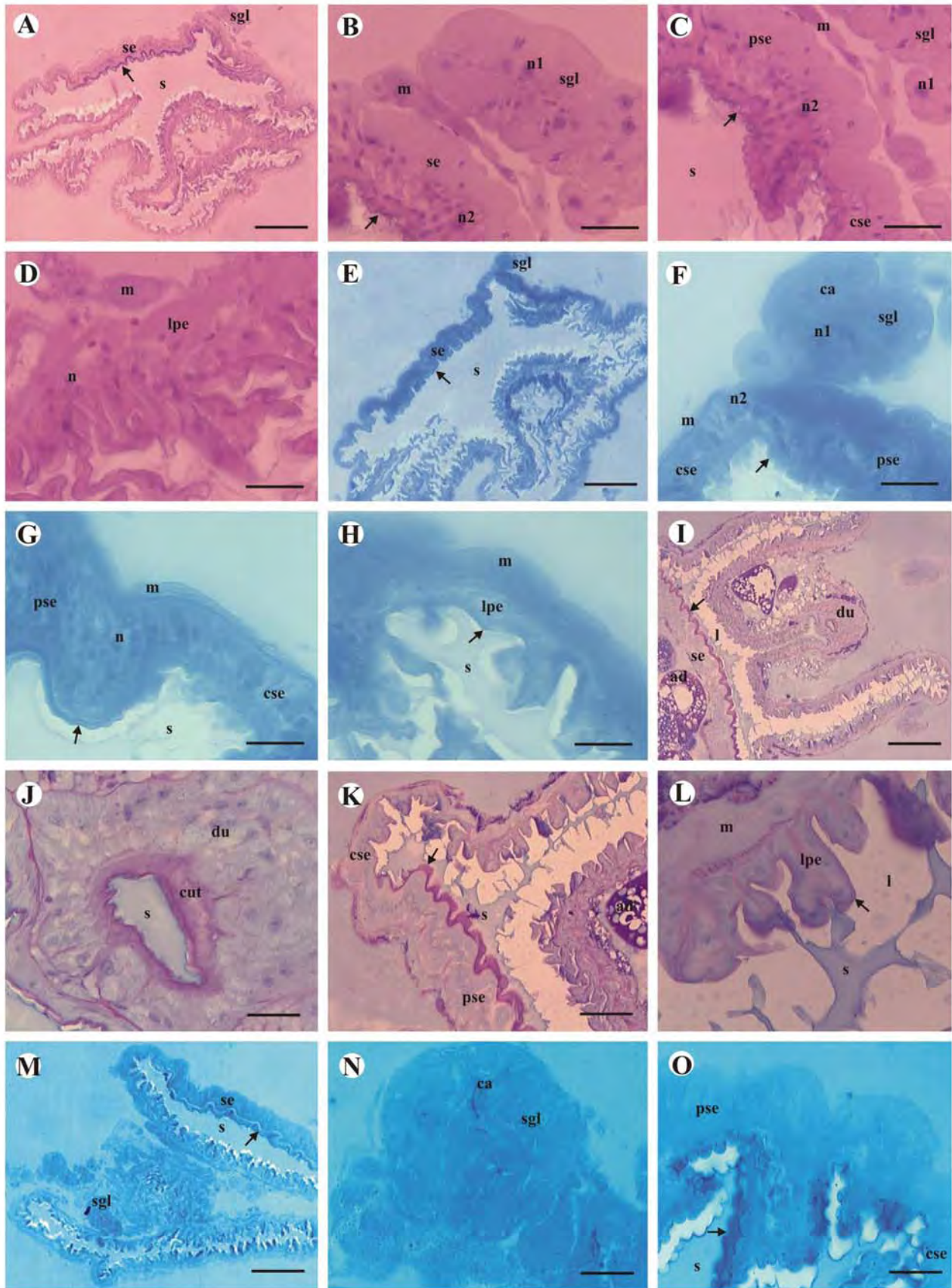


FIGURE 3: Electronic micrographies of the spermatheca of gynes (virgin queens) of *Atta capiguara*.

A. Detail of the secretory cell (sc) of the spermathecal gland (sgl), m = mitochondria, sv = secretion vesicle, arrow = junction between two secretory cells. Bar = 1 μm . **B.** Detail of the junction between two secretory cells of the spermathecal gland (clear arrow), black arrow = intracytoplasmic canalicule, sv = secretion vesicle, li = lipid. Bar = 0.5 μm . **C.** Detail of the intracytoplasmic canalicule of the secretor cell (black arrow), s = secretion in the interior of the canalicule, m = mitochondria, clear arrow = rough endoplasmic reticule. Bar = 0.5 μm . **D.** Detail of the periphery of the canalicule of the secretory cell (ca), m = mitochondria, sv = secretion vesicle. Bar = 0.5 μm . **E. F.** Detail of the epithelial cell that covers the reservoir (ec), n = nucleus of the epithelial cell, m = mitochondria, cut = cuticle, sv = secretion vesicle. Bar = 1 μm . **G.** Detail of the epithelial cell that covers the reservoir (ec) and cuticle (cut), n = nucleus of the epithelial cell, m = mitochondria, sv = secretion vesicle. Bar = 2 μm . **H.** Junction between the cells of the pavementous epithelium that covers the reservoir (lpe) and the cuticle (cut), sv = secretion vesicle. Bar = 1 μm . **I. J. K. L.** Detail of the cuticle (cut), black arrow = electrondense material, clear arrow = chitin filaments, lpe= pavementous epithelium that covers the reservoir, l = lumen. I. J. Bar = 1 μm . K. L. Bar = 2 μm .

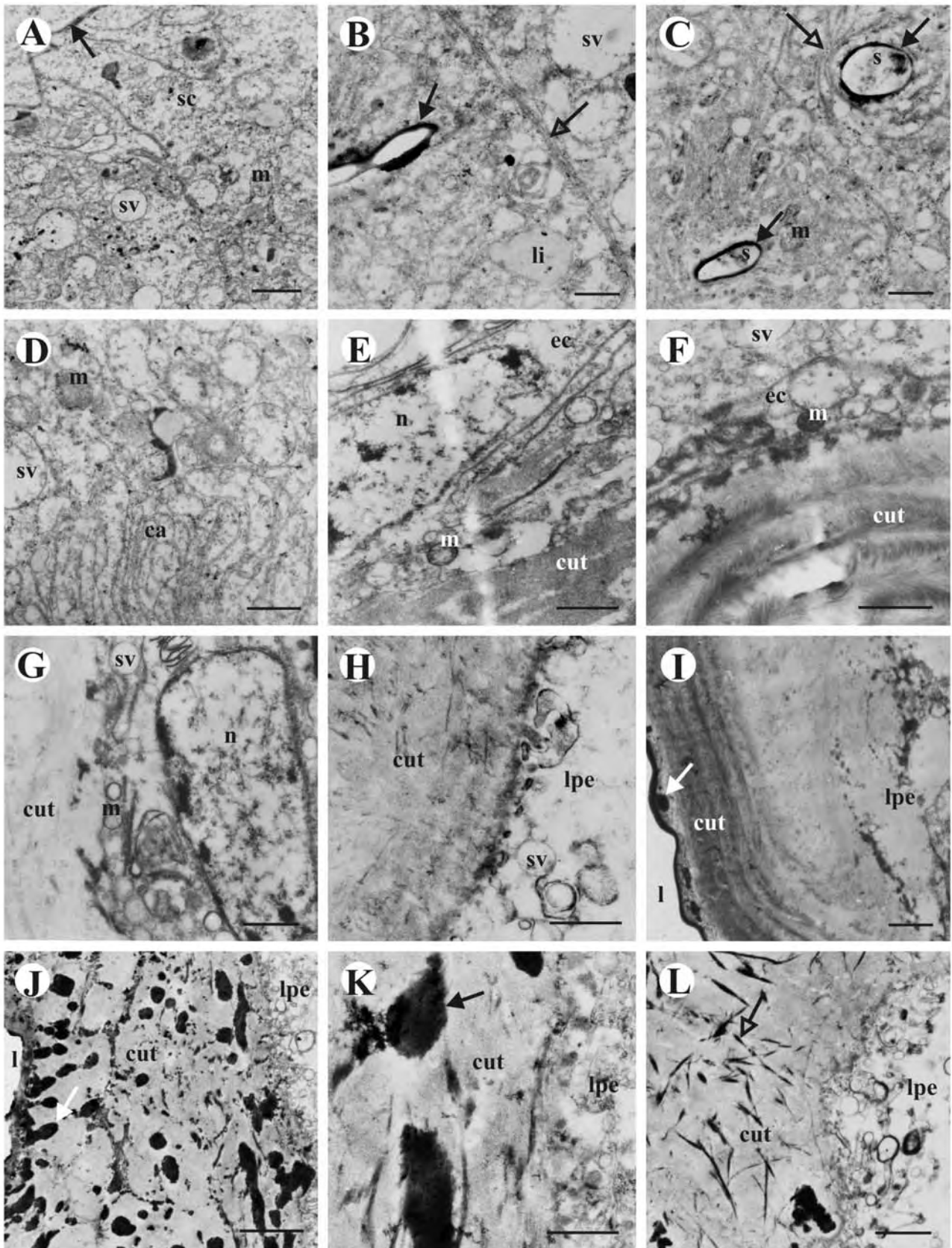


FIGURE 4: Sequencing of the mitochondrial genome corresponding to the Cytochrome Oxidase I, IGS, Leu-tRNA and Cytochrome Oxidase II loci of gynes (virgin queens) of *Atta capiguara* ants.

DISCUSSION

The insects' spermatheca is the place where the male spermatozoa is transferred at the moment of copulation and remains stored until the moment of the fecundation of the eggs. This organ has been considered an important structure for the adaptation success of ants, since it has as its function the disposition of the spermatozoa, a process that would involve structural changes as well as the secretion produced and stored in the interior of the spermatheca (Chapman, 1998).

Available articles in the literature show that the spermatheca are of ectodermic origin, covered internally by a cuticle (Snodgrass, 1935; Ortiz; Camargo-Mathias, 2006, 2007).

The spermatheca is an organ that has the shape of a sac, where the spermathecal glands have their openings, with the function to produce secretions that maintain a microenvironment with proper pH, ideal ionic constitution, besides other necessary factors to survival of the spermatozoa. Some insects do not possess these glands and in this case the epithelium that covers the interior of the spermatheca provides the secretory function (Davey, 1985). This was also observed in the ant species *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* and *Acromyrmex landolti* by Ortiz and Camargo-Mathias (2006, 2007).

It is common to observe the presence of the fat body cells around the insect organs, as well as around the spermatheca in *Atta capiguara*. However, it is not known if this tissue has some influence over the spermatheca or if it only plays a role of the filling of the abdomen. Pavon *et al.* (2006), studying mandibular glands of workers of *Atta sexdens rubropilosa*, verified that the hemolymph, as well as the fat body present around these structures, could be involved in providing substances that would constitute the secretions of these glands, which could also be occurring in this study.

In the majority of the insects the spermatheca is similar in its constitution, being different only in shape, size and number representing the specific adaptation of the reproductive biology of each group (Lay *et al.*, 1999).

Ultrastructural studies have demonstrated that the secretor cells of the spermatheca of the insects have a cavity like a calyx in its apical portion, and the membrane is full of microvilli. These foldings increase the cellular surface available for exchanges, which indicates the involvement of the secretory epithelium in the reabsorption of the lumen contents. Apical microvilli in the epithelial cells of the spermatheca were described in some species of Blattaria (Gupta; Smith, 1969), Coleoptera (Tombes; Roppel, 1972; Happ; Happ, 1975), Lepidoptera (Mancini; Dolder, 2003), Orthoptera (Lay *et al.*, 1999), Hymenoptera (Ortiz; Camargo-Mathias, 2006, 2007) and in stingless bees *Melipona bicolor* (Cruz-Landim, 2002).

In the spermatheca of the species used for this present study, the regions with a secretory function were found in two forms: a) as group cells forming a structure similar to the acines, located externally to the spermatheca (spermathecal gland), and b) in the form of a simple secretory epithelium varying from cubical to prismatic, covering the reservoir internally only in the fusion region of the spermathecal lobes, thus corroborating with the data found for the spermatheca in *Atta sexdens sexdens* species (Ortiz; Camargo-Mathias, 2006).

The present study also revealed that the spermatheca of this species has a reservoir with thin walls, with the exception of the region close to the spermathecal gland, where the walls are thicker because of the presence of internal secretory epithelium. The rest of the storing portion of the spermatheca is constituted of a simple lining epithelium with pavementous cells, as described by Ortiz and Camargo-Mathias (2006) for *Atta sexdens sexdens* species. According to some authors, the difference in the thickness of the spermatheca epithelium would be related to its function, secretory or lining (Gillot, 1988; Gupta; Smith, 1969; Clements; Potter, 1967; Dallai, 1975; Happ; Happ, 1975).

Many studies with spermathecae in other insects revealed that the thickness of the reservoir could be caused by the fact that the spermatozoa would need to be kept in a controlled environment, which would be performed not only by the secretions produced by the different portions of the spermatheca, but also by the hemolymph and/or by the fat body cells. In theory, the wall thickness would permit the passage of products to the spermatheca lumen not only the ones secreted by its

cells, also suggesting high permeability of the epithelium to these substances (Gillot; Friedel, 1977).

In general in insects the external secretory portion of the spermatheca, through light or electronic microscopy, has been described as having cells that show intra and extracytoplasmic canalicules (Gupta; Smith, 1969; Davey, 1985).

In *Atta capiguara* the arrangement of the external secretory cells of the spermatheca forms a central collector canalicule, where the intracytoplasmic canalicules have their openings and it collects the secretion produced by these cells, as well as transporting the secretion to the lumen of the reservoir. It is important to highlight that in gynes from this species, which possess two types of secretory epithelium, the canalicules were only observed in the cells from the spermathecal gland (external secretory portion), and they are absent in the internal secretory epithelium. This data confirms the different way of liberation of the secretion produced by different secretory cells located internally to the reservoir, which would be done by a process called exocytosis.

The transmission electron microscopy techniques allowed the observation large amounts of rounded mitochondria around the intracytoplasmic canalicule of the spermathecal gland of *Atta capiguara*, suggesting a high demand of energy to transfer the cellular secretion to the interior of the canalicules, from where it would be transported to the reservoir. This technique also revealed the presence of interdigitations uniting the lining epithelial cells from the reservoir, which would facilitate more distension of the epithelium when the spermatheca would be filled with spermatozoa. The presence of this type of junction is typical of epithelia that are subjected to constant distensions impeding the rupture of the cells and walls, as well as acting as a barrier (selective permeability), mediating the material traffic in both directions (intra and extracellular) (Junqueira; Carneiro, 2004).

In *Atta capiguara* the cuticle that covers the reservoir is thicker and has a laminated aspect, where electronlight layers among others more electrondense were observed. The electrondense cuticular portion that is in direct contact with the lumen of the spermathecal reservoir, seems to have a differentiated constitution, probably a fibrillar endocuticle, because the presence of electrondense material originating from the cells of the lining epithelium of the reservoir was observed in this region. The

presence of intermediate filaments probably of a polysaccharide nature (chitin), was also observed in the cuticle that covers all of the reservoir interior, providing mechanical stability to the cells.

The data using histochemistry techniques revealed that in the spermatheca of *Atta capiguara* ants, the internal secretory epithelium is positive for proteins, indicating their production on a large scale. The proteins have an important role in the constitution of the secretion, which provides an ideal microenvironment for maintenance and viability of the spermatozoa during the time where they are stored inside the spermatheca, corroborating data by Gardner (2004) for crickets' spermathecae of *Schistocerca americana* and *Dissosteira carolina* and by Ortiz and Camargo-Mathias (2006, 2007) for *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex landolti balzani* and *Cyphomyrmex muelleri* ant species.

The tests for polysaccharides indicated that the secretory cells, located in the interior of the spermatheca of *Atta capiguara* had little or no reaction in some regions, with the same occurring in the spermathecal gland. Gardner (2004) verified that the spermathecae of *S. americana* and *D. carolina* had a weak or moderate reaction to the PAS test, where only the internal cuticle that covers the structure had a strong reaction for acidic polysaccharides, which was also observed in the spermathecal gland as well as in the internal secretory epithelium of *Atta capiguara*, corroborating data found by Ortiz and Camargo-Mathias (2006, 2007) for ant species *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* and *Acromyrmex landolti balzani*.

The small quantity of polysaccharides found in the spermatheca of *Atta capiguara*, as well as in other insect species, could suggest that they would be only taking part in the formation of complexes with other substances, such as glycoproteins, providing an energy source for the spermatozoa while inside these structures, necessary for their metabolism, including right before the fecundation. Blum *et al.* (1962) demonstrated in studies with bee males, that the spermatozoa were able to quickly oxidise the free sugars present in the seminal fluid of the males. These same authors reported that minutes after the ejaculation the fructose

concentration would reduce to around 80%. According to them, this information would indicate that the use of glycosidic material would be limited to those individuals where the fecundation occurs internally.

The results obtained indicated the presence of lipids in the spermatheca of gynes (virgin queens) of *Atta capiguara*. However, Gardner (2004) observed a weak reaction in the spermathecae of *S. americana* and *D. Carolina*, as did Ortiz and Camargo-Mathias (2006, 2007) in the spermathecae of *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens* and *Atta sexdens piriventris*.

The data found for lipids could also suggest that these, as well as the polysaccharides, are being produced with the objective of forming complexes with other substances that would also play a role in spermatozoa maintenance inside the reservoir. The low and moderate amounts of polysaccharide and lipids found, contrary to high amounts of proteins, would suggest that the nature of the spermathecal secretion would be basically of protein origin, but with the possibility of formation of lipid and polysaccharide complexes.

There have been few chemical studies performed using the secretion produced by the spermathecal cells, as well as the secretion from inside the spermatheca, however, most of them show that the secretion is of a glycoprotein nature (Clements; Potter, 1967; Bhatnagar; Musgrave, 1971; Ahmed; Gillot, 1982 a, b, Ortiz; Camargo, Mathias, 2006, 2007).

To better understand the molecular biology of the organisms, sequences of mitochondrial DNA have been often used, including the Formicidae family, to establish filogenetic relations between genera, tribes and subfamilies. However, the large amount of A/T nucleotides in the mitochondrial genome of Hymenoptera, as it was observed in the ant species studied in this work, makes it hard to use this region, unless it is considered a mutation of G/C nucleotides, increasing in this way the amount of A/T nucleotides, as occurs in honeybees (Koulianos; Crozier, 1999).

The region of the intergenic spacer (IGS) possesses the most variation between atines ants and it is characterized by having the highest amount of A/T and the lowest index of homoplasy, which can also be observed in the sequences of *Atta capiguara* ants. According to Moritz *et al.* (1987), non-codifying regions of the

mitochondrial DNA tend to be less conservative and to present a higher evolution rate than the codifying regions.

The IGS regions are used as a molecular marker that permits the determination of evolution rates between specimens. They are formed in a very efficient genic region to find patterns of biological diversification between subspecies of attines ants, establishing comparative studies based on size differences of the IGS and its composition in nucleotidic bases, permitting phylogeny interference (Liu; Beckenbach, 1992).

The COI and COII regions, as well as Leu-tRNA regions, in this species, are highly maintained, facilitating the alignment of sequences among them. The Cytochrome Oxidase genes I and II are excellent tools for the phylogenetic comparison of genera and species inside the Attini tribe. This region has been used with success in other basic phylogenetic studies with Hymenoptera, but with similar problems regarding the high amount of A/T bases, which was also observed in the present study, being inadvisable to use this region for phylogentic studies of the highest levels (Liu; Beckenbach, 1992).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant nº 03/05485-0. The authors wish to thanks Antônio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte, Gerson Mello Souza, Cristiane Márcia Mileo and Joaquim Martins for their technical support.

REFERENCES

Ahmead, L.; Gillot, C. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) I. Morphology, histology and histochemistry. *Int. J. Invert. Rep.* 4: 81-295, 1982a.

Ahmead, L.; Gillot, C. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) II. Ultrastructure. *Int. J. Invert. Rep.* 4: 297-309, 1982b.

Bekkevold, D.; Frydenberg, J.; Boomsma, J. J. Multiple mating and facultative polygyny in the Panamanian leafcutter ant *Acromyrmex echinator*. *Ecology and Sociobiology.* 46: 103-109, 1999.

Bhatnagar, R. D.; Musgrave, A. J. Aspects of the histophysiology of the spermathecal gland of *Stophilus granarius* (L) (Coleóptera). *Canad. J. Zool.* 49: 275-277, 1971.

Blum, M. S.; Glowska, Z.; Taber, S. Chemistry of the drone honey bee reproductive system. II. Carbohydrates in the reproductive organs and semem. *Annals of the Entomological Society of America.* 55: 135-139, 1962.

Boomsma, J. J.; Fjerdingstad, E. F.; Frydenberg, J. Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leafcutter ants. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 226: 249-254, 1999.

Chapman, R. F. *The insects: structure and function.* New York, Elsevier, 1998. 770 p.

Clements, A. N.; Potter, S. A. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 13: 1825-1836, 1967.

Cruz-Landim, C. Spermiphagy in the spermatheca of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1986 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Anat. Histol. Embryol.* 6: 339-343, 2002.

Dallai, R. Fine structure of the spermathecae of *Apis Mellifera*. *J. Insect Physiology.* 21: 89-109, 1975.

Davey, K. G. The female reproductive tract. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.) *Comprehensive Insect Physiology: Embryogenesis and Reproduction*. Pergamon Press, v. 1, 1985.

Engelman, F. *The physiology of insect reproduction*. Pergamon, Oxford. 1970.

Fjerdingsstad, E. J.; Boomsma, J. J.; Thorén, P. Multiple paternity in the leafcutter ant *Atta colombica* – a microsatellite DNA study. *Heredity.* 80: 118-126, 1998.

Fowler, H. G.; Pereira-da-Silva, V.; Forti, L. C.; Saes, N. B. Population dynamics of leaf-cutting ants. A brief review. In: *Fire Ants and Leaf Cutting Ants: Biology and Management* (eds. LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K.), p. 123-145. Westview Press, Boulder, 1986.

Gardner, G. E. *Morphological and histological aspects of the spermatheca as they relate to sperm organization in the grasshopper species Schistocerca americana and Dissosteira carolina (Orthoptera: Acrididae)*. 2004, 41f. Thesis (Degree of Master of Science) - Faculty of North Carolina State University, Raleigh, 2004.

Gillot, C.; Friedel, T. Contribution of male produced proteins to vitellogenesis in *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Insect Physiology.* 23: 145-151, 1977.

Gillot, C. Insecta. In *Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. III. Accessory Sex glands. Edited by K.G. Adiyodi and R.D. Adiyodi. John Wiley & sons Ltd., U.K., p. 356-471, 1988.

Gillot, C. Male accessory gland secretions: Modulations of female reproductive physiology and behaviour. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 163-184, 2003.

Grodner, M. L.; Steffens, W. Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the boll weevil. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 97: 116-120, 1978.

Gupta, B. L.; Smith, D. S. Fine structural organization of the spermatheca in the cockroach *Periplaneta americana*. *Tissue and Cell.* 1: 295-324, 1969.

Happ, G. M.; Happ, C. M. Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Tissue and Cell.* 2: 443-466, 1970.

Happ, G. M.; Happ, C. M. Fine structure of the spermathecae of the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. *Cell Tissue Res.* 162: 253-269, 1975.

Hölldobler, B.; Wilson, E. O. *The ants*. Harvard University Press, 1990. 732p.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004. 540p.

Kaulenas, M. S. *Insect accessory reproductive structures: function, structures, and development*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.

Kerr, W. Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da tribo Attini (Hymenoptera: Formicoidea). *Rev. Brasil. Biol.* 1: 45-48, 1962.

Koulianos, S.; Crozier, R. H. Current intraspecific dynamics of sequence evolution differs from long-term trends and can account for the AT-richness of honeybee mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 49: 44-48. 1999.

Lay, M.; Zissler, D.; Hartmann, R. Ultrastructural and functional aspects of the spermatheca of the African Migratory Locust *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche and Fairmaire) (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 349-361, 1999.

Liu, H.; Beckenbach, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insect. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 41-52, 1992.

Mancini, K.; Dolder, H. Morphology of the lepidopteran spermatheca. *Acta Microsc.* 12: 595-596, 2003.

Mayhé-Nunes, A. J. *Estudo de Acromyrmex (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética.* 1991. 122f. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Moritz, C.; Dowling, T. E.; Brown, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevant for population biology and systematics. *Annual. Review of Ecology Systematics.* 18: 269-292, 1987.

Ortiz, G.; Camargo-Mathias, M. I. Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae). *American Journal of Agricultural and Biological Science.* 1: 58-65, 2006.

Ortiz, G.; Camargo-Mathias, M. I. Spermatheca of four species of ants of the tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological specialization. *Research Journal of Biological Sciences.* 2: 5-12, 2007.

Pavon, L. F. *Glândulas mandibulares de operárias de formigas Atta sexdens rubropilosa (Forel, 1908): morfologia e expressão gênica (Hymenoptera: Formicidae).* 2006. 128f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

Peeters, C.; Ito, F.; Gebin, B.; Fannes, W.; Billen, J. Queens-worker divergence in the spermatheca of Ponerinae and Myrmicinae ants. In: *IUSSI CONGRESS*, 13. 1999. Adelaide. p. 3699.

Snodgrass, R. E. *Principles of Insect Morphology*. McGraw-Hill Book Company. New York., 1935.

Tombes, A. S.; Roppel, R. M. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera, Curculionidae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* 1: 141-152, 1972.

Villavaso, E. J. The role of the spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*. *J. Insect. Physiol.* 21: 1457-1462, 1975.

Weber, N. A. *Gardening ants: the Atines*. Philadelphia: the American Philosophical Society, 1972. 146p.

V. DISCUSSÃO GERAL

Informações sobre a anatomia interna das formigas permanecem ainda parcialmente desconhecidas, visto que o maior interesse no estudo desses insetos está voltado para o controle, principalmente das formigas do gênero *Atta*, consideradas insetos praga. Trabalhos sobre a morfologia da espermateca desses insetos são de considerável importância.

A espermateca das formigas, de maneira geral, tem sido considerada uma importante estrutura para o sucesso adaptativo destes indivíduos, visto que a mesma é responsável pela recepção e estocagem dos espermatozoides, desde o momento da cópula até a fecundação dos ovos, além de ser a fonte de origem dos novos indivíduos da colônia.

A espermateca é o local para onde os espermatozoides do macho são transferidos no momento da cópula e ali permanecem até o momento da fecundação dos ovos. Dentre as funções a ela atribuídas, alguns autores consideram-na o local onde ocorreria a capacitação dos espermatozoides, processo que envolveria tanto mudanças estruturais no próprio espermatozoide quanto na secreção contida no interior da espermateca (CHAPMAN, 1998).

Davey (1985), revisando trabalhos realizados com reprodução de insetos, concluiu que os espermatozoides poderiam ser estocados dentro do lúmen da espermateca, em condições viáveis, por longos períodos. O mesmo autor verificou ainda que em abelhas e formigas esse período poderia ultrapassar vários anos e, em

formigas do gênero *Atta*, especificamente, ter-se-iam informações de rainhas mantidas em laboratórios que viveram e permaneceram com espermatozóides viáveis por um período de aproximadamente 20 anos (AUTUORI, 1950).

Informações contidas nos trabalhos disponíveis na literatura, tratando da morfologia das espermatecas nos insetos, mostram que estas são de origem ectodérmica, derivadas da invaginação da porção ventral do integumento abdominal e sendo revestidas internamente por cutícula (SNODGRASS, 1935). A espermateca seria composta por uma categoria celular especializada, as células epidérmicas, de grande versatilidade e diversidade bioquímica e morfológica (HAPP; HAPP, 1975). De acordo com estes autores, as células epiteliais secretoras da espermateca desempenhariam três funções: (1) produção da cutícula que reveste o lúmen do reservatório, (2) produção e exportação de secreções para o lúmen do órgão e (3) manutenção de um microambiente apropriado para a sobrevivência dos espermatozóides.

Os insetos, de maneira geral, possuem apenas uma espermateca e isto também ocorre com as rainhas de formigas das espécies aqui estudadas, a saber: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

A espermateca é um órgão geralmente descrito como tendo a forma de uma bolsa, onde desembocam glândulas com função secretora a ela associadas: as glândulas espermatecais, que têm como função a produção de secreções que proporcionarão um microambiente com pH apropriado, constituição iônica ideal, além de outros fatores necessários à sobrevivência dos espermatozóides. Usando o mesmo sistema de classificação proposto por Noirot e Quenedey (1974) para os insetos, as células da glândula espermatecal de formigas seriam da classe III, com a presença de ductos cuticulares penetrando nas mesmas. Em alguns insetos onde esta glândula não existe o próprio epitélio que reveste o interior da espermateca executa a função secretora (DAVEY, 1985; ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

As células secretoras das espermatecas dos insetos possuem uma cavidade em forma de cálice no seu domínio apical, e a membrana é repleta de

microvilosidades. Essas dobras aumentam o domínio celular disponível para trocas, o que indica um envolvimento do epitélio secretor na reabsorção do conteúdo do lúmen. Microvilosidades nas células epiteliais da espermateca foram descritas em algumas espécies de Blattaria (GUPTA; SMITH, 1969), Coleoptera (TOMBES; ROPPEL, 1972; HAPP; HAPP, 1975), Lepidoptera (MANCINI; DOLDER, 2003), Orthoptera (LAY *et al.*, 1999), Hymenoptera (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007) e nas abelhas sem ferrão *Melipona bicolor* (CRUZ-LANDIM, 2002). Nos estudos realizados por Ortiz e Camargo-Mathias (2006, 2007), a presença de estruturas semelhantes a microvilos pode ser observada nas células do epitélio secretor interno de *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Atta sexdens piriventris*, o que poderia sugerir a ocorrência de troca de substâncias entre as células epiteliais e o lúmen spermatecal.

Nas espécies de formigas dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Cyphomyrmex*, aqui analisadas, confirmou-se que a espermateca tem a mesma forma de bolsa bilobada descrita para os insetos em geral, porém, com fusão parcial dos dois lobos na porção mediana da estrutura. E ainda que em *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* esta bolsa é mais larga do que alta (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

É comum observar-se a presença de corpo gorduroso ao redor de órgãos dos insetos, assim como ocorre ao redor das espermatecas de *Atta capiguara* e *Cyphomyrmex muelleri*; no entanto, não se pode precisar se este corpo gorduroso teria alguma influência sobre a espermateca ou se desempenharia apenas função de preenchimento do abdômen. Pavon *et al.* (2006), estudando glândulas mandibulares de operárias de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, verificaram que o corpo gorduroso presente ao redor destas estruturas poderia estar envolvido no fornecimento de elementos que comporiam a secreção das mesmas. A presença do corpo gorduroso rodeando as espermatecas de *Atta capiguara* e *Cyphomyrmex muelleri* poderia exercer esta mesma função. No caso de *Locusta migratória*, o corpo gorduroso que recobre a espermateca, segundo os autores, provavelmente teria função protetora, tanto na pupa quanto no adulto (LAY *et al.*, 1999).

Nos insetos a espermateca difere na forma, tamanho e número, o que representaria a adaptação específica da biologia reprodutiva de cada grupo (LAY *et*

al., 1999). No entanto, se forem considerados apenas os elementos celulares da espermateca de representantes de algumas ordens de insetos, como Coleoptera (HAPP; HAPP, 1975), Blattaria (GUPTA; SMITH, 1969), Diptera (CLEMENTS; POTTER, 1967, DALLAI *et al.*, 1993), Orthoptera (AHMED; GILLOT, 1982; LAY *et al.*, 1999), muitos pontos de congruência podem ser encontrados.

Nas espermatecas das espécies aqui estudadas, pode ser verificado que as regiões com função secretora encontram-se distribuídas sob duas formas e em diferentes locais: a) externamente ao órgão, como células agrupadas formando estruturas semelhantes a ácinos ou como filamentos secretores, localizados na fusão dos lobos espermatecais, e b) internamente, na forma de epitélio secretor simples cúbico e/ou prismático, revestindo parcial ou completamente a parede do reservatório. Assim, no presente estudo, observou-se que a secreção espermatecal poderia ter os seguintes locais de origem: a) na glândula espermatecal localizada na porção externa (*Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*), b) no epitélio secretor localizado na porção interna do reservatório (*Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*) ou c) em ambas as regiões (*Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani*).

As diferenças na espessura do epitélio das espermatecas, segundo alguns autores, estariam relacionadas com sua função, se secretor ou de revestimento. O epitélio da espermateca dos insetos é classificado em três tipos básicos, de acordo com a localização das células secretoras (GILLOT, 1988). No primeiro tipo, as células secretoras formariam uma glândula distinta do reservatório, como seria o caso da maioria dos Hymenoptera e muitos Coleoptera (DALLAI, 1975; HAPP; HAPP, 1975) e das espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007). No segundo tipo as células secretoras restringir-se-iam a uma região particular do epitélio, como em *Aedes aegypti* (CLEMENTS; POTTER, 1967) e no caso das formigas *Atta sexdens sexdens* e *Atta capiguara* estariam localizadas apenas na região de fusão dos lobos espermatecais (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007). No terceiro tipo, encontrado em *Periplaneta americana*, as células secretoras estariam

distribuídas internamente por toda a parede do reservatório (GUPTA; SMITH, 1969), o que também foi observado nas espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex landolti balzani* (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

A glândula espermatecal, em *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens* e *Atta capiguara* encontrou-se localizada precisamente na região de fusão dos dois lobos do reservatório e em *Acromyrmex landolti balzani*, sobre toda a superfície do reservatório, e apresentou a forma de agrupamentos celulares semelhantes a ácinos. Em *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, esta glândula encontrou-se localizada precisamente na região de fusão dos dois lobos do reservatório, porém como filamentos longos terminando em fundo cego. No entanto, nas espermatecas de rainhas *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, células com características secretoras localizadas externamente à espermateca estavam ausentes.

O presente estudo mostrou que as espermatecas das espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* possuem as paredes do reservatório mais finas em espessura devido à ausência de um epitélio secretor interno. Em *Atta sexdens sexdens* e *Atta capiguara* a parede sofre um espessamento na região da glândula espermatecal. Em *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* ela possui um epitélio de revestimento simples com células pavimentosas. No caso de *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex landolti balzani*, a parede do reservatório é extremamente espessada devido à presença do epitélio secretor interno revestindo completamente o seu interior. Pelo fato da região responsável pela produção de secreção encontrar-se internamente, a secreção produzida pelas células seria liberada diretamente no interior do reservatório por meio de exocitose, onde vesículas originadas do domínio apical das células seriam liberadas no lúmen da espermateca. Esse mesmo processo já foi observado e descrito ocorrendo nas espermatecas de *Rhodnius prolixus* (CAMARGO; MELLO, 1970).

A fina espessura do reservatório das espermatecas nos insetos, segundo alguns autores, dar-se-ia pelo fato de que o espermatozóide necessitaria ser mantido

em um meio regulado e esse processo seria realizado não somente pelas secreções produzidas pelas células das diferentes porções da espermateca, mas também pela hemolinfa. Assim, a fina espessura da parede do reservatório poderia permitir a passagem de produtos vindos da hemolinfa para o lúmen da espermateca, sugerindo a ocorrência de certa permeabilidade do epitélio a esses elementos (GILLOT; FRIEDEL, 1977).

A presença do epitélio secretor interno, observado nas espermatecas das rainhas de formigas *Atta sexdens piriventris*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex landolti balzani*, poderia sugerir que a fisiologia para manutenção dos espermatozóides viáveis seria diferente daquela observada em *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, onde apenas a glândula espermatecal externa foi observada.

Nos insetos em geral a glândula espermatecal tem sido descrita como sendo constituída por células que apresentam canalículos intra e extracitoplasmáticos (GUPTA; SMITH, 1969; DAVEY, 1985).

Davey (1985) descreveu que as células secretoras das espermatecas dos insetos armazenariam muitos dos seus produtos no próprio citoplasma, os quais seriam posteriormente conduzidos pelos canalículos até o interior do reservatório.

Em *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, as células secretoras externas da espermateca, tanto dos ácinos quanto dos filamentos, formariam um canalículo coletor central, onde provavelmente desembocariam os canalículos intracitoplasmáticos que coletariam a secreção produzida por essas células, bem como a transportariam até o lúmen do reservatório. Quando enfocamos as rainhas de *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani*, que possuem tanto glândula espermatecal quanto epitélio secretor interno, faz-se importante salientar que os canalículos só foram observados nas células da glândula espermatecal, pois o epitélio secretor interno faria a liberação da secreção por meio de vesículas de exocitose.

Nas espermatecas das espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex*

coronatus e *Cyphomyrmex muelleri*, aqui estudadas, as células secretoras possuem canalículos intra e extracitoplasmáticos e os estudos histoquímicos sugeriram que a secreção produzida sofreria algum tipo de modificação durante o caminho percorrido desde a saída de seu local de produção intracelular, passando pelos canalículos, até chegar no lúmen do reservatório, pois foi observado que a secreção final liberada pelas glândulas espermatecais externas para o interior do reservatório não possuiria a mesma composição daquela que foi inicialmente produzida na célula.

A modificação da composição da secreção, em alguns insetos, já foi descrita por alguns autores, que reportaram que a secreção produzida pela célula secretora seria mais densa no início dos canalículos extracitoplasmáticos, tornando-se mais fluída à medida que percorresse os mesmos, o que facilitaria sua passagem para o lúmen espermatecal (GUPTA; SMITH, 1969; DAVEY, 1985).

As técnicas de microscopia eletrônica de transmissão permitiram observar ao redor dos canalículos intracitoplasmáticos da glândula espermatecal de rainhas *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta capiguara* grandes quantidades de mitocôndrias, de diferentes formas e tamanhos, sugerindo uma grande demanda de energia para transferir a secreção celular para o interior dos canalículos, por onde a mesma seria transportada até o reservatório.

Em *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta capiguara*, esta técnica revelou ainda a presença de interdigitações, ou seja, especializações do domínio latero-apical, que uniriam as células epiteliais de revestimento do reservatório, possibilitando maior distensão do epitélio quando a espermateca estivesse repleta de espermatozoides. A presença deste tipo de junção é típica de epitélios que estão sujeitos a constantes distensões impedindo a ruptura de células e da parede, além de atuar como uma barreira de permeabilidade seletiva, mediando o tráfego de material em ambas as direções (intra e extracelular) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Nestas espécies foi observada a presença de espessa lâmina basal, onde o epitélio de revestimento do reservatório encontrar-se-ia apoiado. Embora espessa, ela não deveria ser considerada uma barreira completa para a passagem de material entre as células do epitélio de revestimento e o meio externo da espermateca, devido ao fato de pequenas vesículas terem sido observadas atravessando esta estrutura.

Camadas de musculatura revestem externamente a espermateca de todas as espécies aqui descritas, sendo que as mesmas apresentaram-se relativamente finas, com exceção das espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex landolti* e *Cyphomyrmex muelleri*, nas quais foram observadas camadas musculares mais espessas. A presença de musculatura nessas estruturas, provavelmente auxilie no movimento dos espermatozóides dentro da espermateca e também na expulsão dos mesmos no momento da fecundação dos ovos, contraindo a estrutura como um todo (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

Cutícula revestindo internamente o reservatório e produzida pelas células que compõem o epitélio de revestimento também foi observada na maioria das espécies aqui estudadas, porém, em *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, as quais possuem apenas epitélio secretor interno, ela não foi observada, indicando desta forma que os espermatozóides no interior do reservatório permaneceriam em contato direto com as células do epitélio secretor (ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

Em *A .s. rubropilosa* e *Atta capiguara* a microscopia eletrônica mostrou que a espessa cutícula nestas espécies possui aspecto laminado, onde são observadas camadas menos eletrondensas intercaladas com outras de maior eletrondensidade. A porção cuticular que fica em contato direto com o lúmen do reservatório espermatecal, e também a mais eletrondensa, parece ter constituição diferenciada, provavelmente uma endocutícula fibrilar, pois nessa região verificou-se a presença de material eletrondenso originado das células do epitélio de revestimento do reservatório. A presença de filamentos intermediários, provavelmente de natureza polissacarídica (quitina), também foi observada na cutícula que reveste todo o interior do reservatório de *Atta capiguara*.

Para melhor entendimento, as informações obtidas através do estudo morfológico das espermatecas de todas as espécies de formigas aqui estudadas foram resumidas na tabela 1, que traz as principais diferenças e semelhanças encontradas entre as mesmas.

Histoquimicamente, os dados aqui obtidos revelaram que nas espermatecas das formigas *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani*, as quais possuem epitélio secretor interno, o mesmo mostrou-se fortemente positivo para os testes de proteínas, indicando a produção deste elemento em grandes quantidades, e que estas devem ter papel importante na constituição da secreção que mantém e viabiliza os espermatozóides durante o tempo em que ficam estocados no interior da espermateca. A espermateca de *Cyphomyrmex muelleri* também foi positiva para este teste, principalmente a glândula espermatecal, os espermatozóides e a secreção contida no reservatório, sendo que o epitélio de revestimento e a musculatura que envolve a espermateca externamente apresentaram-se fracamente corados. Gardner (2004), estudando as espermatecas de gafanhotos das espécies *Schistocerca americana* e *Dissosteira carolina*, observou que as mesmas apresentaram-se positivas para proteínas.

Os testes para polissacarídeos indicaram que as células do epitélio secretor interno das espermatecas de *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex landolti balzani* reagiram com fraca positividade ou mesmo não reagiram em determinadas regiões, sendo que a mesma situação foi observada na glândula espermatecal de *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani*. Puderam ser observados apenas pequenos depósitos PAS positivos, sob a forma de granulação, no interior do citoplasma destas células, indicando baixos níveis de produção desses elementos nestas espécies. Gardner (2004) verificou que as espermatecas de *S. americana* e *D. carolina* reagiram fraca ou moderadamente ao PAS, sendo que apenas a cutícula que reveste internamente a estrutura mostrou forte positividade, o que também foi verificado, tanto na glândula espermatecal quanto no epitélio secretor interno de *Acromyrmex landolti balzani* e *Atta capiguara*.

Já nas espermatecas de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* foi possível verificar grande quantidade de polissacarídeos no citoplasma das células do epitélio pavimentoso do reservatório, os quais participariam da constituição da própria secreção espermatecal para manutenção dos espermatozóides. Porém, o baixo nível de polissacarídeos encontrado na maioria das espermatecas das formigas dos

gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, aqui estudados, assim como de outras espécies de insetos, poderia sugerir que estes elementos estariam apenas formando complexos, por exemplo, glicoprotéicos, proporcionando aos espermatozóides energia para ser consumida durante sua permanência no interior destas estruturas. Blum *et al.* (1962) demonstraram, em estudos com machos de abelhas, que os espermatozóides destes insetos conseguiriam rapidamente oxidar os açúcares livres presentes no líquido seminal e mostraram que minutos após a ejaculação a concentração de frutose seria reduzida para cerca de 80%.

Schoeters e Billen (2000) também fizeram algumas considerações sobre a presença de açúcares específicos no trato genital de alguns insetos. A presença de polissacarídeos, participando do metabolismo dos espermatozóides, foi citada como fonte de energia. Existem ainda estudos com outros animais, que não os insetos, onde mostrou-se a necessidade da presença de polissacarídeos nas secreções do trato genital, tanto feminino quanto masculino (YANAGIMACHI, 1988).

No presente estudo, os resultados obtidos indicaram maior presença de lipídios nas espermatecas das rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta sexdens piriventris* e *Atta capiguara*, muito embora algum lipídio tenha reagido fracamente no citoplasma das células secretoras de *Atta laevigata* e *Atta sexdens sexdens*. Porém, os espermatozóides armazenados no interior da espermateca de *Atta sexdens sexdens* mostraram-se fortemente positivos ao teste devido à grande quantidade deles no interior do reservatório. A fraca reação ao teste para lipídios também foi observada por Gardner (2004) nas espermatecas de *S. americana* e *D. carolina*.

Ultraestruturalmente, nas células secretoras da espermateca de *Atta sexdens rubropilosa* os lipídios aparecem em pequenas quantidades sob a forma livre no citoplasma, sob a forma de complexos com as proteínas ou ainda, ao redor das invaginações e no interior do lúmen dos canalículos intracitoplasmáticos. Pode-se observar ainda que nas regiões mais periféricas das células, onde os canalículos já não apresentam muitas invaginações ao redor do lúmen, a quantidade de lipídios observada é pouca ou nenhuma, o que pode sugerir novamente que a secreção realmente mude sua composição à medida que percorre as regiões intra e extracelulares dos canalículos.

Os dados histoquímicos e ultra-estruturais encontrados para lipídios mostraram a sua baixa produção pelas espermatecas das espécies aqui estudadas, sugerindo que estes, assim como os polissacarídeos, deveriam ser produzidos apenas com a finalidade de formar complexos com outros elementos que também iriam atuar na manutenção dos espermatozóides. As baixas quantidades de polissacarídeos e de lipídios encontradas nas espermatecas de formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, em contraposição com as altas quantidades de proteínas, permitiriam sugerir que a natureza da secreção spermatecal seria basicamente de origem protéica, porém havendo a possibilidade da formação de complexos lipídicos e polissacarídicos.

Blum *et al.* (1967), em alguns estudos com o sistema reprodutor de abelhas, verificaram que especificamente os fosfolipídios serviriam como fonte de energia oxidativa para respiração celular.

Existem poucos estudos químicos realizados com as secreções produzidas pelas células spermatecais, bem como com a secreção presente no interior da spermateca, e alguns deles confirmaram que ela é de natureza glicoprotéica. (CLEMENTS; POTTER, 1967; BHATINAGAR; MUSGRAVE, 1971; AHMED; GILLOT, 1982 a, b; ORTIZ; CAMARGO-MATHIAS, 2006, 2007).

Estudos prévios com o sistema reprodutor masculino de formigas de algumas espécies do gênero *Atta* demonstraram que nestes indivíduos os espermatozóides estão distribuídos no interior dos testículos e são, certamente, em número muito menor do que aquele observado no interior das espermatecas, visto que as rainhas são fecundadas por vários machos e, conseqüentemente, os espermatozóides encontram-se agrupados e compactados, dificultando a sua individualização (BACCETI, 1972; DALLAI; AFZELIUS, 1993).

Os espermatozóides da maioria dos insetos são descritos como estruturas alongadas e filamentosas (BACCETI, 1972; DALLAI; AFZELIUS, 1993), fato este que também foi observado na maioria das espécies de formigas aqui analisadas. Eles consistem de estruturas que, ao contrário do observado em alguns insetos, não atingem tamanhos exagerados, como é o caso daqueles cujos espermatozóides seriam várias vezes maiores que o tamanho do próprio corpo do inseto que os produziu (PEROTTI, 1969; AFZELIUS *et al.*, 1976).

Os estudos histoquímicos realizados mostraram que os espermatozóides das formigas aqui estudadas possuem polissacarídeos e proteínas como constituição básica, visto que lipídios foram pouco observados.

Para melhor visualização, os resultados histoquímicos encontram-se resumidos na tabela 2.

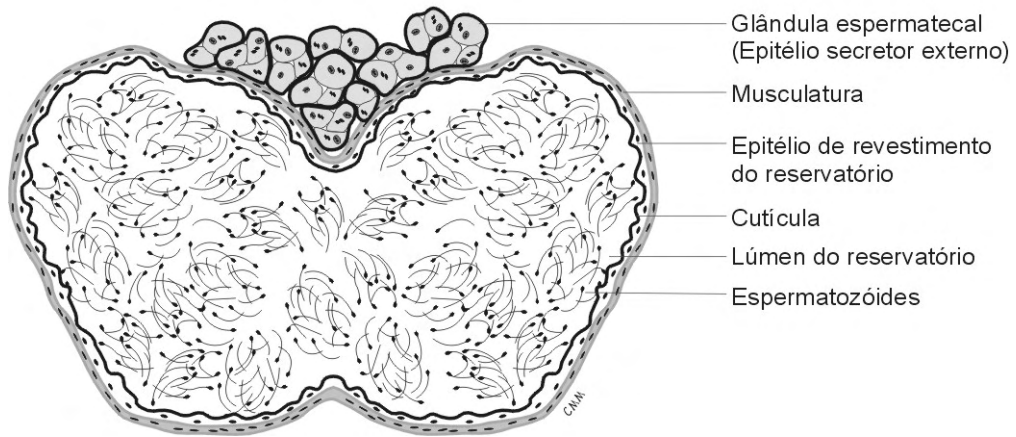
Assim, o presente estudo mostrou que as espermatecas das espécies de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* apresentam somente glândula espermatecal (porção secretora externa), as espécies *Atta sexdens sexdens* e *Acromyrmex landolti balzani* possuem tanto glândula espermatecal quanto epitélio secretor interno, e as espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti* possuem apenas epitélio secretor interno.

Visto que *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti* possuem epitélio secretor localizado exclusivamente na região interna da espermateca, poder-se-ia sugerir que, nestas espécies, a própria espermateca seria auto-suficiente para produzir os elementos da secreção que manteria os espermatozoides viáveis, sem necessitar tanto da participação de elementos exógenos vindos da hemolinfa. Esta menor ou quase nenhuma dependência do fornecimento de elementos exógenos à espermateca, os quais contribuiriam para fornecer um microambiente adequado para os espermatozoides até o momento da fecundação dos ovos, provavelmente poderia proporcionar maiores chances de sobrevivência da espécie, mesmo quando em condições ambientais desfavoráveis.

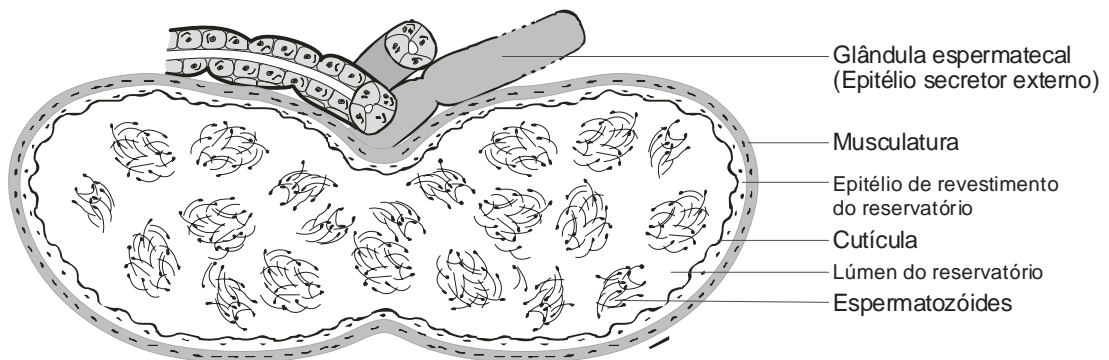
Portanto, levando-se em consideração a morfologia e localização das células da glândula espermatecal e do epitélio secretor interno, as espermatecas das espécies aqui estudadas foram classificadas em:

Tipo I: Apresenta apenas glândula espermatecal (externa).

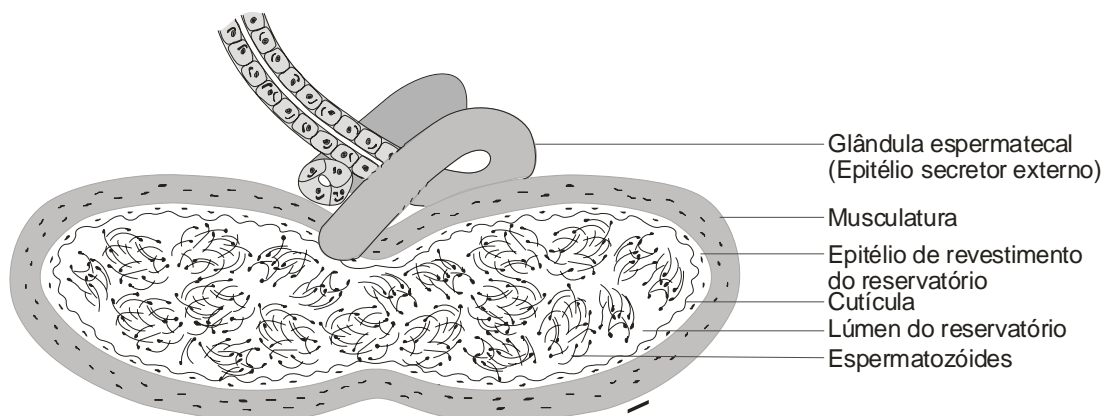
Atta sexdens rubropilosa e Atta laevigata



Acromyrmex coronatus

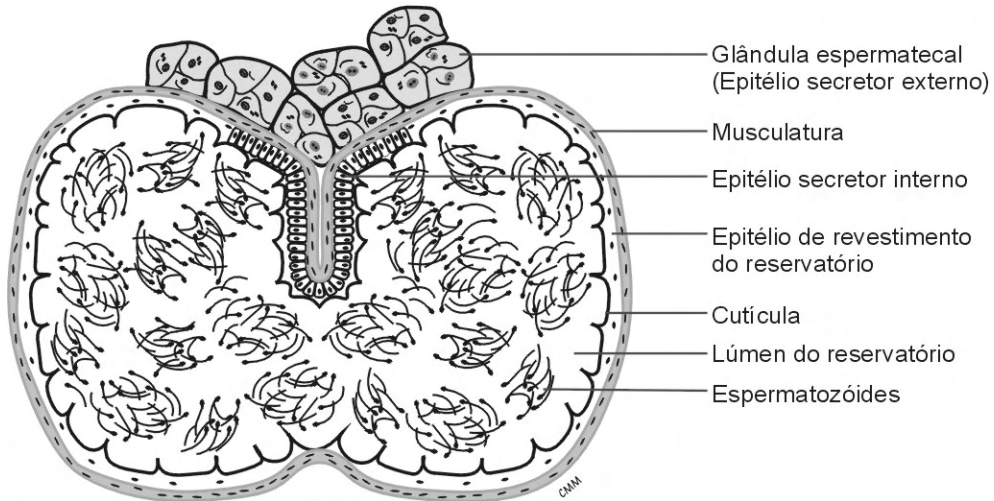


Cyphomyrmex muelleri

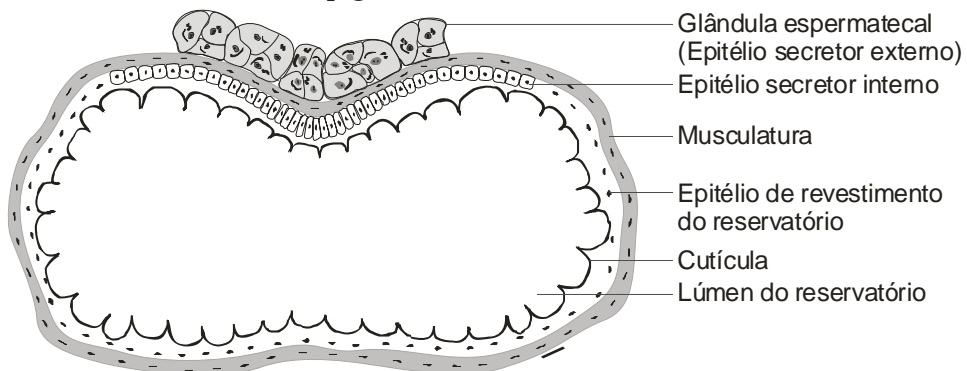


Tipo II: Apresenta glândula espermatecal e epitélio secretor interno.

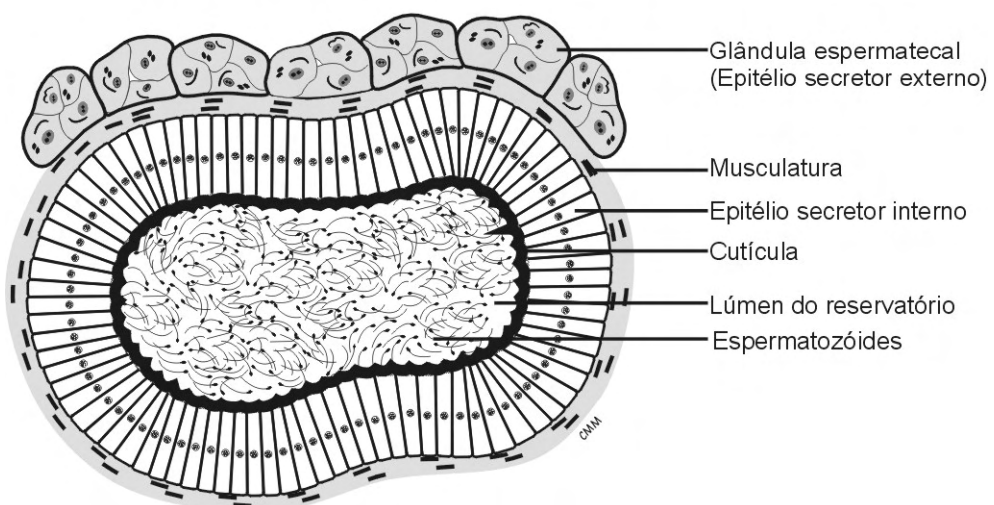
Atta sexdens sexdens



Atta capiguara

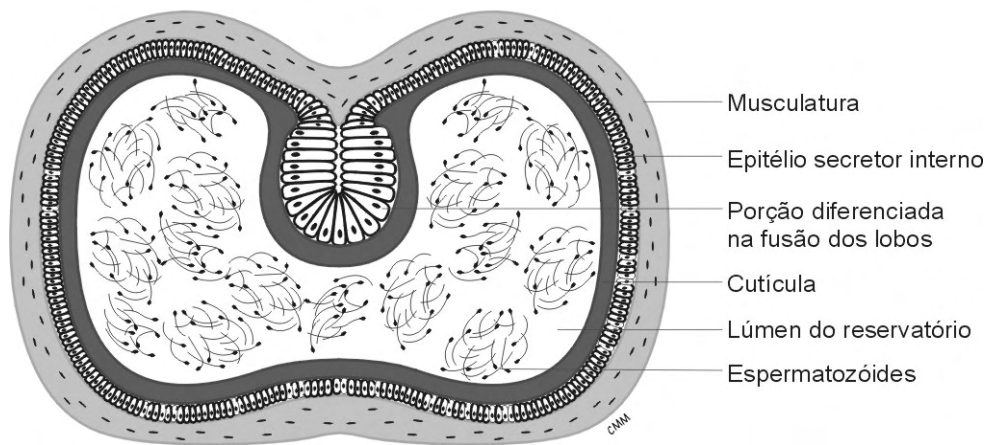


Acromyrmex landolti balzani

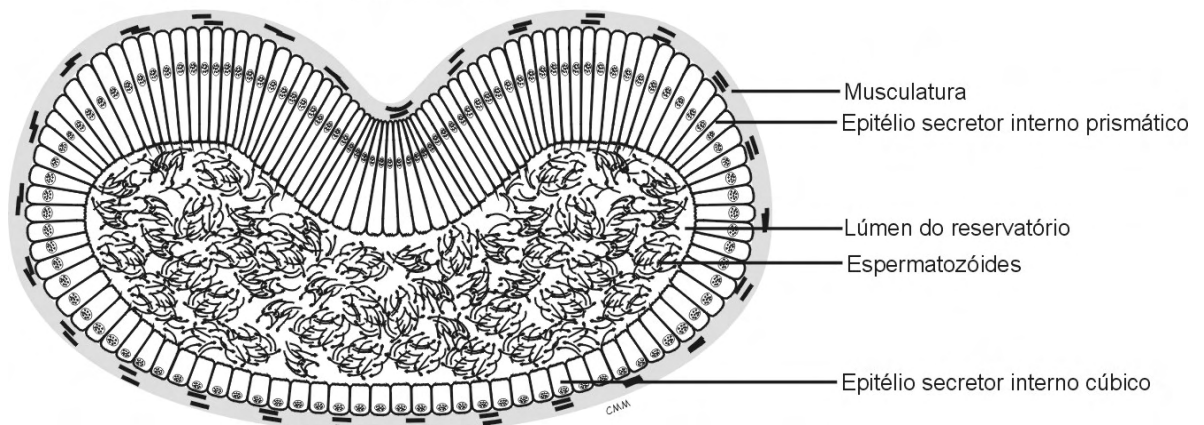


Tipo III: Apresenta apenas epitélio secretor interno.

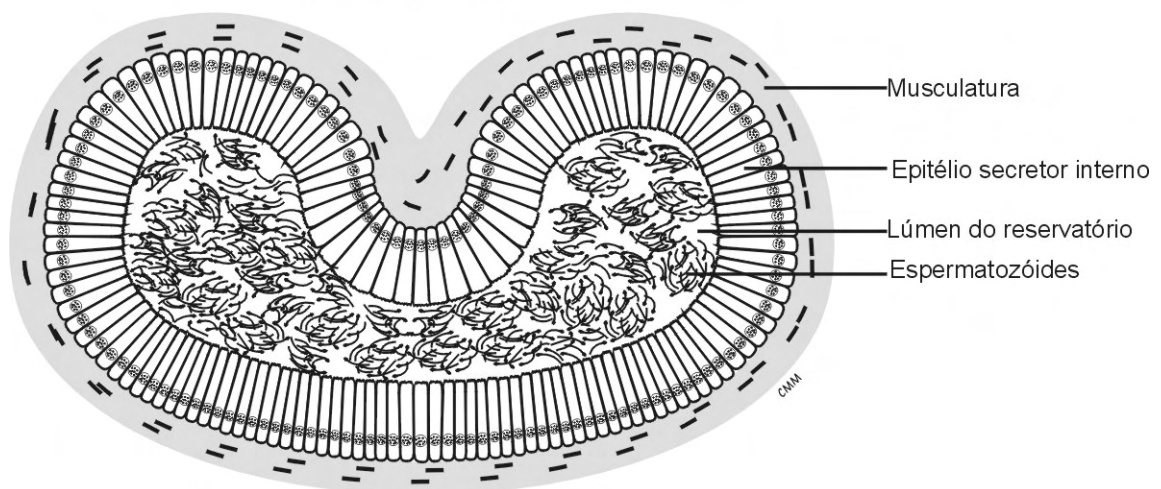
Atta sexdens piriventris



Acromyrmex balzani



Acromyrmex landolti



Para o auxílio do entendimento da biologia molecular dos organismos, seqüências de DNA mitocondrial têm sido freqüentemente utilizadas, inclusive nas formigas (Formicidae), para estabelecer relações filogenéticas entre os gêneros, as tribos e as subfamílias. Entretanto, a grande quantidade de nucleotídeos A/T no genoma mitocondrial dos Hymenoptera, assim como foi observado nas espécies de formigas aqui estudadas, dificulta o uso desta região, a não ser que este fato seja considerado uma mutabilidade suficientemente alta de nucleotídeos G/C, aumentando a quantidade de bases A/T, como ocorre nas abelhas de mel (KOULIANOS; CROZIER, 1999).

A região do espaçador intergênico (IGS) possui a maior variação entre as formigas atines e é caracterizada por apresentar o mais alto conteúdo de A/T e o mais baixo índice de homoplasia, o que também pode ser verificado nas seqüências das formigas *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, *Cyphomyrmex muelleri*, *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*, aqui obtidas. Segundo Moritz *et al.* (1987), regiões não codificadoras do DNA mitocondrial tendem a ser menos conservadas e a apresentar uma taxa evolutiva maior do que regiões codificadoras.

A região do IGS é utilizada como marcador molecular que permite determinar taxas evolutivas entre espécimens, constituindo-se numa região gênica muito eficiente para encontrar padrões de diversificação biológica entre subespécies de formigas atines, estabelecendo estudos comparativos fundamentados em diferenças de tamanho do IGS e sua composição em bases nucleotídicas, permitindo a inferência de filogenia (LIU; BECKENBACH, 1992).

As regiões do COI e COII, assim como a região do Leu-tRNA, nestas espécies, mostraram-se altamente conservadas, facilitando o alinhamento das seqüências entre si. Os genes Citocromo Oxidase I (COI) e II (COII) são excelentes para comparação filogenética de gêneros e espécies dentro da tribo Attini. Esta região tem sido utilizada com sucesso em outros estudos filogenéticos básicos de Hymenoptera, porém com problemas similares de alto conteúdo de bases A/T, também observados no presente estudo, o que torna desaconselhável o uso desta

região para estudos filogenéticos de nível mais elevado (LIU; BECKENBACH, 1992).

As análises filogenéticas realizadas a partir das seqüências dos loci mitocondriais estudados geraram uma única árvore mais parcimoniosa (em anexo no final da discussão), onde foi possível verificar que *Cyphomyrmex muelleri*, espécie na qual a espermateca possui apenas glândula espermatecal (externa), seria a mais basal entre as atines estudadas, seguida por *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii*, respectivamente. As espécies pertencentes aos gêneros *Atta*, a saber: *Atta laevigata* e *Atta sexdens rubropilosa*, que possuem apenas glândula espermatecal (externa), *Atta sexdens sexdens* e *Atta capiguara*, que possuem tanto glândula espermatecal como epitélio secretor interno e *Atta sexdens piriventris*, que possui apenas epitélio secretor interno, e *Acromyrmex*, a saber: *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, com a espermateca apenas com epitélio secretor interno, destacaram-se como as mais derivadas dentro do grupo, dados estes que corroboram outros estudos filogenéticos realizados (WEBER, 1982, WETTERER *et al.*, 1998).

Através dos dados morfológicos e moleculares obtidos para as espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Cyphomyrmex muelleri*, não se poderia ainda, baseando-se apenas na morfologia das espermatecas, afirmar que a evolução tivesse trabalhado com estas formigas no sentido de substituir as células secretoras externas (glândula espermatecal) pelas internas, e nem que tivesse ocorrido uma externalização destas células secretoras, pois tanto a espermateca da espécie *Cyphomyrmex muelleri*, considerada a mais basal dentro do grupo, quanto as de *Atta laevigata* e *Atta sexdens rubropilosa*, consideradas as mais derivadas, apresentaram glândula espermatecal. E ainda dentro do grupo das mais derivadas, as espécies do gênero *Acromyrmex* apresentaram apenas epitélio secretor interno, enquanto que as *Atta* apresentaram ou a glândula espermatecal (externa), ou o epitélio secretor interno ou ainda ambos.

O que se poderia sugerir é que tenha ocorrido uma evolução paralela, isto é, independente de características similares ou idênticas, em linhagens relacionadas, que usualmente se acredita ser baseada em modificações dos mesmos passos de desenvolvimento. Uma vez que espécies aparentadas possuem programas de

desenvolvimento similares, o paralelismo é freqüente entre espécies aparentadas e tendências de evolução paralela são evidentes em quase todo grande grupo (FUTUYMA, 2002).

Não é surpreendente que a evolução paralela seja comum. Se espécies aparentadas possuem padrões similares de desenvolvimento, é provável que se modifiquem similarmente se sujeitas às mesmas pressões seletivas (FUTUYMA, 2002).

VI. CONCLUSÕES

1) Nas formigas *Atta*, *Acromyrmex* e *Cyphomyrmex*, analisadas neste estudo, a espermateca tem a forma de bolsa bilobada com fusão parcial dos lobos na porção mediana da estrutura. Nas espécies *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* ela é mais larga do que alta;

2) Nestas espécies as regiões secretoras encontraram-se sob duas formas e diferentes localizações: a) como células agrupadas formando estruturas semelhantes a ácinos ou como filamentos secretores, localizados externamente na fusão dos lobos espermatecais (glândula espermatecal), e b) como um epitélio simples cúbico e/ou prismático revestindo parcial ou completamente o interior do reservatório;

3) A glândula espermatecal foi observada nas espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani*, como agrupamentos celulares, e em *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri*, como filamentos longos terminando em fundo cego. Nas espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti* as células secretoras externas estavam ausentes.

4) O epitélio secretor interno foi observado nas espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex landolti*

balzani, revestindo completamente o interior da espermateca, e em *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, restrito ao local de fusão dos lobos espermatecais, e ainda em *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani* a presença da glândula espermatecal também foi observada;

5) Nas espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* a secreção espermatecal tem origem na glândula espermatecal. Nas espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti* a secreção tem origem no epitélio secretor interno ao reservatório e em *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara* e *Acromyrmex landolti balzani* tanto na glândula espermatecal quanto no epitélio secretor interno.

6) Nas espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex landolti balzani*, *Acromyrmex coronatus* e *Cyphomyrmex muelleri* os canalículos intracitoplasmáticos das células secretoras externas da espermateca, tanto dos ácinos quanto dos filamentos, desembocariam em um canalículo coletor central que coletaria a secreção produzida por essas células, bem como a transportaria até o lúmen do reservatório;

7) O fato da porção secretora estar localizada internamente nas espermatecas das espécies *Atta sexdens piriventris*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti*, poderia sugerir que a secreção produzida pelas células seria liberada diretamente no interior do reservatório por exocitose, sem haver participação de outras células localizadas externamente ao órgão, dando-lhe maior autonomia;

8) A secreção presente no interior das espermatecas das espécies de formigas aqui analisadas é de natureza glicoprotéica;

9) Os dados morfológicos e moleculares das espermatecas para as espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta sexdens sexdens*, *Atta sexdens piriventris*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex balzani*, *Acromyrmex landolti* e *Cyphomyrmex muelleri*, não permitiram ainda afirmar que a evolução tivesse

substituído as células secretoras externas (glândula espermatecal) pelas internas, e nem que tenha ocorrido uma externalização destas, pois tanto a espermateca da espécie *Cyphomyrmex muelleri* (mais basal), quanto as de *Atta laevigata* e *Atta sexdens rubropilosa* (mais derivadas), apresentaram glândula espermatecal (externa). Dentro do grupo das derivadas, as espécies de *Acromyrmex* apresentaram apenas epitélio secretor interno, enquanto que as do gênero *Atta* apresentaram ou a glândula espermatecal, ou o epitélio secretor interno ou ainda ambos;

VII. REFERÊNCIAS

AFZELIUS, B. A.; BACCETTI, B.; DALLAI, R. The giant spermatozoon of *Notonecta*. **Journal of Submicroscopic Cytology**, Bologna, n. 8, p. 1149-1161, 1976.

AHMEAD, L.; GILLOT, C. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) I. Morphology, histology and histochemistry. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, Amsterdam, n. 4, p. 281-295, 1982a.

AHMEAD, L.; GILLOT, C. The spermathecae of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) II. Ultrastructure. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, Amsterdam, n. 4, p. 297-309, 1982b.

ALLARD, D.; *et al.* Differentiation of the reproductive tract between dominant and subordinate workers in the Japanese queenless ant *Diacamma* sp. **Acta Zoologica**, Estocolmo, v. 86, p. 159-166, 2005.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva *Atta spp.* (Hymenoptera: Formicidae). Número de formas aladas e redução de saúveiros iniciais. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 19, p. 325-331, 1950.

AVISE, J. C.; *et al.* Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press, 2001.

BACCETTI, B. Insects sperm cell. **Advances in Insects Physiology**, London, n. 9, p. 315-395, 1972.

BAO, S. N.; DOLBER, H. Ultrastructural study in spermathecae of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, n. 15, v. 2, p. 223, 1998.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Leaf-cutting ants (Formicidae, *Attini*) prune their fungus to increase and direct its productivity. **Functional Ecology**, Oxford, n. 1, v. 10, p. 55-61, 1996.

BEKKEVOLD, D.; FRYDENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Multiple mating and facultative polygyny in the Panamanian leafcutter ant *Acromyrmex echinator*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 46, p. 103-109, 1999.

BERRY, D. J. Material direction of oogenesis and early embryogenesis in insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, n. 27, p. 205-227, 1985.

BHATINAGAR, R. D.; MUSGRAVE, A. J. Aspects of the histophysiology of the spermathecal gland of *Stophilus granarius* (L) (Coleóptera). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, n. 49, p. 275-277, 1971.

BLUM, M. S.; GLOWSKA, Z.; TABER, S. Chemistry of the drone honey bee reproductive system. II. Carbohydrates in the reproductive organs and semem. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 55, p. 135-139, 1962.

BLUM, M. S.; GLOWSKA, Z.; TABER, S. Composition and possible significance of fatty acids in the lipid classes in honey bee semen. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 13, p. 1301-1308, 1967.

BOOMSMA, J. J.; FJERDINGSTAD, E. F.; FRYDENBERG, J. Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leafcutter ants. **Proceedings of the Royal Society of London B**, London, v. 226, p. 249-254, 1999.

BORGMEIER, T. Estudos sobre *Atta* (Hym., Formicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n. 48, p. 239-264, 1950.

CAMARGO, J. M. F.; MELLO, M. L. S. Anatomy and histology of the genital tract, spermatheca, spermathecal duct and glands of *Apis mellifera* queens (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, Versailles, v. 1, p. 351-373, 1970.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. New York: Elsevier, 1998. 770 p.

CLEMENTS, A. N.; POTTER, S. A. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 13, p. 1825-1836, 1967.

CRUZ-LANDIM, C. Spermiphagy in the spermatheca of *Melipona bicolor* Lapeletier, 1986 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 91, n. 6, p. 339-343, 2002.

CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the spermathecal gland of *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 1, n. 19, p. 9-16, 2002.

DALLAI, R. Fine structure of the spermathecal gland of *Apis Mellifera*. **Redia**, Firenze, v. 53, p. 413-425, 1972.

DALLAI, R. Fine structure of the spermathecae of *Apis Mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, n. 21, p. 89-109, 1975.

DALLAI, R.; AFZELIUS, B. Axonemal structure and insect phylogeny. **Bollettino di Zoologia**, Napoli, n. 60, p. 423-429, 1993.

DAVEY, K. G. The female reproductive tract. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.) **Comprehensive Insect Physiology: Embryogenesis and Reproduction**. Oxford: Pergamon Press, v. 1, 1985.

EMERY, C. Études sur le Myrmicinae. **Annales de la Societe Entomologique de Belgique**, Bruxelles, v. 56, p. 94-105, 1912.

ENGELMAN, F. **The physiology of insect reproduction**. Pergamon: Oxford. 1970.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenesis: an approach using of bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FJERDINGSTAD, E. J.; BOOMSMA, J. J.; THORÉN, P. Multiple paternity in the leafcutter ant *Atta colombica* – a microsatellite DNA study. **Heredity**, London, v. 80, p. 118-126, 1998.

FOWLER, H. G.; *et al.* **Population dynamics of leaf-cutting ants. A brief review.** In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.) *Fire ants and leaf cutting ants*: Boulder: Westview, 1986. p. 123-145.

FOWLER, H. G. Taxa of Neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (*Moellerius*) (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Científica**, São Paulo, v. 16, p. 281-296, 1988.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002. 661p.

GARDNER, G. E. **Morphological and histological aspects of the spermatheca as they relate to sperm organization in the grasshopper species *Schistocerca americana* and *Dissosteira carolina* (Orthoptera: Acrididae).** 2004. 41f. Thesis (Degree of Master of Science) - Faculty of North Carolina State University, Raleigh, 2004.

GILLOT, C.; FRIEDEL, T. Contribution of male produced proteins to vitellogenesis in *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 23, p. 145-151, 1977.

GILLOT, C. **Entomology**. New York: Plenum, 1980. 729p.

GILLOT, C. Insecta. In: ADIYODI, K. B; ADIYODI, R. D. (Ed.). **Reproductive Biology of Invertebrates**. Vol. III. New York: John Wiley & sons; 1988, v. 3, p. 356-471.

GILLOT, C. Male accessory gland secretions: Modulations of female reproductive physiology and behaviour. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 48, p. 163-184, 2003.

GONÇALVES, C. R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). **Studia Entomologica**, Petrópolis, v. 4, p. 1-4, 1961.

GRODNER, M. L.; STEFFENS, W. Evidence of a chemotatic substance in the spermathecal gland of the boll weevil. **Transactions of the American Microscopical Society**, Lawrence, v. 97, p. 116-120, 1978.

GUPTA, B. L.; SMITH, D. S. Fine structural organization of the spermatheca in the cockroach *Periplaneta americana*. **Tissue and Cell**, Essex, v. 1, p. 295-324, 1969.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Texas, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAPP, G. M.; HAPP, C. M. Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Tissue and Cell**, Essex, v. 2, p. 443-466, 1970.

HAPP, G. M.; HAPP, C. M. Fine structure of the spermathecae of the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 162, p. 253-269, 1975.

HAPP, G. M.; HAPP, C. M. Cytodifferentiation in the accessory glands of *Tenebrio molitor*. III. Fine structure of the spermathecal accessory gland in pupa. **Tissue and Cell**, Essex, v. 9, p. 711-732, 1977.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. 123p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p.137A. 1965.

KAULENAS, M. S. **Insect accessory reproductive structures: function, structures, and development**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.

KERR, W. Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da tribo Attini (Hymenoptera: Formicoidea). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 45-48, 1962.

KOULIANOS, S.; CROZIER, R. H. Current intraspecific dynamics of sequence evolution differs from long-term trends and can account for the AT-richness of honeybee mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 49, p. 44-48. 1999.

KUSNEZOV, N. Zoogeografia de las hormigas en Sudamerica. **Acta Zoologica Lilloana**, Tucuman, v. 19, p. 3-186, 1963.

LAY, M.; ZISSLER, D.; HARTMANN, R. Ultrastructural and functional aspects of the spermatheca of the African Migratory Locust *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche and Fairmaire) (Orthoptera: Acrididae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 28, p. 349-361, 1999.

LIU, H.; BECKENBACH, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insect. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 1, p. 41-52, 1992.

MANCINI, K.; DOLDER, H. Morphology of the lepidopteran spermatheca. **Acta Microscopica**, Caracas, v. 12, p. 595-596, 2003.

MANN, T. **Spermatophores**: development, structure, biochemical attributes and role in the transfer of spermatozoa. Berlin: Springer Verlag, 1984. (Zoophysiology, 15)

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1970. 167p.

MARTIN, M. M.; WEBER, N. A. The cellulose utilizing capability of the fungus cultured by the Attini ant *Atta colombica tonsipes*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 62, p. 1386-1387, 1969.

MATSUDA, R. **Morphology and Evolution of the Insect Abdomen**. Oxford: Pergamon Press, 1976.

MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil**: subsídios para uma análise filogenética. 1991. 122f. Tese (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevant for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 269-292, 1987.

MUELLER, U. G.; REHNER, S.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v. 281, p. 2034-2038, 1998.

MUELLER, U. G.; et al. The origin of the atines ant-fungus symbiosis. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 76, n. 02, p. 169-197, 2001.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v 19, p. 61-80, 1974.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. **Annales de la Société Entomologique de France**, Paris, v. 27, p. 123-128, 1991.

OLIVEIRA, D. A.; PUJOL-LUZ, J. R. Estrutura das espermatecas dos gêneros *Barbiellinia* Bezzi e *Chiromyza wiedemann* (Díptera, Stratiomyidae, Chiromyzinae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 22., 1999, Recife. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**, p.165.

ORTIZ, G.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae). **American Journal of Agricultural and Biological Science**, New York, v. 1, p. 58-65, 2006.

ORTIZ, G.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Spermatheca of four species of ants of the tribe Attini (Hymenoptera: Myrmicinae). Morphological specialization. **Research Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 2, p. 5-12, 2007.

PASSERA, L. **L'organisation sociale des Fourmis**. Toulouse: Bios Université Paul Sabatier, Ed. Privat, 1984.

PAVON, L. F. **Glândulas mandibulares de operárias de formigas *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908): morfologia e expressão gênica (Hymenoptera: Formicidae)**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Churchill: Edinburgh, 1985. 530p.

PEETERS, C.; *et al.* Queens-worker divergence in the spermatheca of Ponerinae and Myrmicinae ants. In: **IUSSI INTERNATIONAL CONGRESS OF THE IUSSI**, 13., 1999. Adelaide. p. 3699.

PEREIRA, R. C. *et al.* Fatores ambientais e ocorrência Attini em reflorestamento de eucalipto. In: **INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13**, 1997. Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia. Ilhéus: UESC, 1997. p. 76.

PEROTTI, M. Ultrastructure of the mature sperm in *Drosophyla melanogaster*, Meig. **Journal of Submicroscopic Cytology**, Bologna, v. 1, p. 171-196, 1969.

POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. Factors influencing the growth of *Attamyces-bromatificus*, a symbiont of Attini ants. **British Mycological Society**, Cambridge, v. 87, p. 205-213, 1986.

RANDO, J. S. S.; FORTI, L. C. Ocorrência de formigas *Acromyrmex* Mayr, 1865, em alguns municípios do Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 27, p. 129-133, 2005.

RICH, P. V.; RICH, T. H. The Central American dispersal route: Biotic history and paleogeography. In: JANZEN, D. H. **Costa Rica Natural History**. Chicago: University of Chicago Press, 1983.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. The importance of the spermathecal duct in bumblebees. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.46, p. 1303-1312, 2000.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 20, p. 337-370, 1995.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; *et al.* A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 1463-1472, 2004.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill, 1935.

SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic analyses using parsimony, version 4.0b10**. Washington DC: Smithsonian Institution, 2003.

SUZUKI, K. Comparative morphology of the internal reproductive system of the Chrysomelidae (Coleoptera), p. 317-355. In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. (Ed.). **Biology of Chrysomelidae**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1988.

TABER, S.; BLUM, M. S. The preservation of honeybee semen. **Science**, Washington, v. 131, p. 1734-1735, 1960.

THOMPSON, J. D., HIGGINGS, D. G., GIBBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Symposium Series**, Texas, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMBES, A. S.; ROPPEL, R. M. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera, Curculionidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 1, p. 141-152, 1972.

VARNA, B. K. Taxonomic value of spermathecal capsules as subfamily characters among the Chrysomelidae (Coleoptera). **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 17, p. 189-192, 1955.

VILLAVASO, E. J. The role of the spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 21, p. 1457-1462, 1975.

WARD, P. S.; BRADY, S. G. Phylogeny and biogeography of the ant subfamily Myrmeciinae (Hymenoptera: Formicidae). **Invertebrate Systematics**, Melbourne, v. 17, p. 361-386, 2003.

WEBER, N. A. **Gardening ants: the Atines**. Philadelphia: the American Philosophical Society, 1972. 146p.

WEBER, N. A. Fungus Ants. In: HERMANN, H. (Ed.). **Social Insects**. New York: Academic Press, 1982, p. 255-363.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 9, p. 42-47, 1998.

WHEELER, W. C. **Ants: Their Structure, Development and Behavior**. New York: Columbia Univ. Press, 1910. 663p.

WIGGLESWORTH, V. B. The hormonal regulation of growth and reproduction of insects. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 2, p. 247-236, 1964.

WILSON, E. O. **The Insect Societies**. Cambridge: Belknap Press, 1971. 548p.

YANAGIMACHI, V. B. Mammalian fecundation. In: KNOBIL, E. NEIL. J. (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p.135-185.