

GLENDAM SAMARA DIAS SANTOS

**ESPERMIOGÊNESE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES
EM *LAGRIA VILLOSA* COM INFERÊNCIAS TAXONÔMICAS
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE: LAGRIINAE)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237e
2013

Santos, Glenda Samara Dias, 1988-
Espermiogênese e morfologia dos espermatozoides em
Lagria villosa com inferências taxonômicas (Coleoptera :
Tenebrionidae: Lagriinae) / Glenda Samara Dias Santos. –
Viçosa, MG, 2013.
viii, 24f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Lino Neto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 22-24

1. Besouro. 2. Espermatogênese em animais. 3. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.76

GLENDAM SAMARA DIAS SANTOS

**ESPERMIOGÊNESE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES
EM *LAGRIA VILLOSA* COM INFERÊNCIAS TAXONÔMICAS
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE: LAGRIINAE)**

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

APROVADA: 15 de março de 2013

Lucio Antonio de Oliveira Campos

Jane Carla Soares Moreira

José Lino Neto
Orientador

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural pelo ensino de qualidade.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Ao Prof. Lino, meu grande amigo, pela oportunidade de crescimento. Agradeço pelas horas dedicadas à minha formação acadêmica, pela orientação e por ter acreditado em mim. Não há palavras que demonstre toda a minha gratificação. Os conselhos e os “puxões de orelha” foram de grande valia!

À minha querida Claudinha pela coorientação, ensinamentos durante o curso e amizade. Ao Fernandinho pelo exemplo de profissionalismo, amizade, pela confiança que em mim depositou quando cheguei à Viçosa. Pela paciência e comprometimento no meu treinamento. Meu muito obrigada!

Aos colegas de laboratório: Ana Paula, Aline, André, Helen e Marcelo!

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV. À Elizabeth Alves Pena (Beth), pelo profissionalismo e competência.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, em especial Artur Vieira, Karla Ribeiro e Gilmar Valente, pela atenção e ajuda sempre que solicitadas.

À Prof^a Sônia Nair Bão e toda a sua equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão da UnB.

Ao Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos, por aceitar participar da banca, pela disponibilidade e sugestões que foram essenciais para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Jane Carla Soares Moreira por aceitar participar da banca, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento e aprendizado.

Ao Rogério, por ter nos ajudado muito coletando os lagrêdeos.

No âmbito familiar, agradeço aos tios, tias, primos e primas que, de uma forma ou de outra, sempre estiveram presentes na minha vida e muito

me estimularam, mesmo sem saber ao certo do que se tratava a minha pesquisa. Agradeço à minha vovó Lourdes (*in memoria*), por ter sido a minha segunda mãe, pelo exemplo de simplicidade e honestidade! À minha vó Irene, pelo apoio e por sempre acreditar em mim! E em especial, agradeço à minha mãe, Janete, pelo amor que sempre demonstrou, por todas as dificuldades que passou ao me criar. E também, ao seu companheiro Waguiinho.

À minha grande amiga-irmã, Helen. Nestes dois anos choramos, sorrimos e crescemos juntas. Obrigada por ter sido várias vezes o meu porto seguro! Temos momentos que valem por uma vida toda! Conte sempre comigo!

Às minhas amadas flores: Ana Carolina, Ana Cláudia, Marta, Talitta, Thaís e ao cravinho Marcinho. Obrigada por todos os encontros, apoio e conversas!

Às meninas da minha república: Camilla, Mayana e Naysa! Obrigada pela companhia e por escutarem as minhas murmurações!

A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural.

A todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte desse projeto, o meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

Glenda Samara Dias Santos, filha de Janete Ribeiro Dias e Klenderson José Santos, nasceu em Divinópolis, Minas Gerais, em 18 de setembro de 1988.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2006 em colégio público. Em fevereiro de 2007 iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Fundação Educacional de Divinópolis (FUNEDI/UEMG), Divinópolis, MG, concluindo em 17 de janeiro de 2011. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica pela PROUEMG. Em março de 2011 ingressou no curso de mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo a dissertação em fevereiro de 2013. Já em dezembro de 2012 foi aprovada no curso de Doutorado também em Biologia Celular e Estrutural – UFV.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Ordem Coleoptera	1
1.2. Superfamília Tenebrionoidea.....	2
1.3. Família Tenebrionidae	2
1.4. Espermatogênese em Tenebrionidae.....	3
1.5. Diversidade dos espermatozoides dos insetos	5
1.6. Ultraestrutura e filogenia.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivo geral.....	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1. Suspensão de espermatozoides para microscopia de luz	7
3.2. Montagem total e cortes histológicos dos cistos	7
3.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	8
3.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	8
4. Resultados	9
5. Discussão	17
6. Conclusão.....	20
7. Referências bibliográficas.....	22

RESUMO

SANTOS, Glenda Samara Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **ESPERMIOGÊNESE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES EM *LAGRIA VILLOSA* COM INFERÊNCIAS TAXONÔMICAS (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE: LAGRIINAE)**
Orientador: José Lino Neto. Co-Orientadora: Cláudia Vânia Miranda de Oliveira.

Tenebrionidae, com mais de 19 mil espécies descritas, é uma das famílias mais especiosas de Coleoptera, o que tem dificultado o estabelecimento de uma hipótese consensual sobre sua sistemática. Os tenebrionídeos tem sido divididos nos ramos Tenebrionoide e Lagrioide. Neste último estão os lagrídeos, os quais foram inicialmente considerados uma família, Lagriidae, mas trabalhos posteriores tem os colocado dentro de Tenebrionidae como subfamília, Lagriinae. Neste trabalho, descrevemos características morfológicas do sistema reprodutivo, da espermiogênese e dos espermatozoides do lagrídeo, *Lagria villosa*, visto que este tipo de caracteres tem contribuído para a sistemática de vários grupos de insetos, incluindo os besouros. Nesta espécie, cada testículo tem, em média, 60 folículos e o cisto até 1.200 espermatozoides. Diferente de outros quatro tenebrionídeos já estudados, nos quais cada testículo tem seis folículos e o cisto até 512 espermatozoides. No final da espermiogênese, os espermatozoides encontram-se arranjados antiparalelamente nos feixes, característica até agora observada apenas em tenebrionídeos. Nos espermatozoides, a região de cabeça é formada por um acrossomo, em três camadas, e um núcleo de cromatina bastante compacta. O flagelo é simétrico e constituído pelo axonema de 9 + 9 + 2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Algumas características aqui descritas suportam trabalhos prévios que classificam os lagrídeos em uma subfamília (Lagriinae) de Tenebrionidae (p.ex. a disposição antiparalela dos espermatozoides nos feixes), e outras que apoiam a divisão dos tenebrionídeos nos ramos Lagrioide e Tenebrionoide (p.ex. os números de folículos por testículos e de espermatozoides por feixe).

ABSTRACT

SANTOS, Glenda Samara Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **SPERMIOGENESIS AND SPERM MORPHOLOGY IN *LAGRIA VILLOSA* WITH TAXONOMIC INFERENCES (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE: LAGRIINAE)** Adviser: José Lino Neto. Co-Adviser: Cláudia Vânia Miranda de Oliveira.

Tenebrionidae, with more than 19,000 species, is one of the most specious families of Coleoptera, which has made it difficult to establish a consensual hypothesis about its systematics. The tenebrionids have been divided into branches Tenebrionoide and Lagrioide. The latter contains the lagriids, which initially were considered a family, Lagriidae, but later works had placed them within Tenebrionidae as the subfamily Lagriinae. In this paper, we describe the morphological characteristics of the reproductive system, spermatogenesis and sperm of the lagriid, *Lagria villosa*, since this type of character has contributed to systematic several groups of insects, including beetles. In this specie, each testis is formed by approximately 60 follicles and the cyst up to 1,200 spermatozoa. At the end of spermatogenesis, the spermatozoa are arranged antiparallely in the bundles, characteristic observed only in others tenebrionids. In the spermatozoa, the head region is formed by an acrosome with three layers, and a nucleus of highly compact chromatin. The flagellum is symmetrical and consists of the axoneme of 9 + 9 + 2 microtubules, two mitochondrial derivatives and two accessory bodies. Some features described here support those work that rank lagrídeos in a subfamily (Lagriinae) of Tenebrionidae (e.g. the antiparallel arrangement of the sperm bundles), others support the division of tenebrionids in the branches Lagrioide and Tenebrionoide (e.g. the number of follicles per testis and sperm in the bundles).

1. Introdução Geral

1.1. Ordem Coleoptera

Os Coleoptera, conhecidos como besouros, formam o maior grupo de insetos com cerca de 350.000 espécies descritas, representando aproximadamente 1/4 de todos os organismos vivos (Hunt *et al.*, 2007). São extremamente diversificados e estão distribuídos em praticamente todas as regiões do mundo (Johnson & Triplehorn, 2005), o que tem fascinado vários estudiosos, incluindo Charles Darwin (1809-1882) e o renomado biólogo britânico, J.B.S Haldane (1892-1964), um dos elaboradores da teoria sintética da evolução (Vanin & Ide, 2002).

Os besouros são os únicos insetos que possuem élitros, modificações das asas anteriores em estruturas rígidas e esclerotizadas, que os protegem da dessecação e de choques mecânicos. Eles protegem, ainda, as asas membranosas, permitindo que os besouros explorem ambientes inacessíveis a outros grupos de insetos (Grimaldi & Engel, 2006; Johnson & Triplehorn, 2005). Também é observada uma grande diversidade no tamanho dos besouros, variando de menos que 1 mm, como os Ptiliidae, até 200 mm, como o cerambycídeo *Titanus giganteus*, maior inseto do mundo, encontrado na Amazônia (Gullan & Cranston, 2012). A alimentação dos besouros é diversificada, no entanto a hematofagia nunca foi observada no grupo.

Segundo Ponomarenko (1995), o surgimento da linhagem dos Coleoptera provavelmente se deu há cerca de 265 milhões de anos, sendo os primeiros registros do Permiano Inferior. Os besouros divergiram a partir de um ancestral comum com Neuropterida e a grande diversificação do grupo ocorreu a partir do Jurássico, há 160 milhões de anos, período em que já existiam os grupos de Coleoptera mais derivados, como Chrysomelidae, Cerambycidae e Curculionidae (Grimaldi & Engel, 2006).

A ordem Coleoptera é dividida nas subordens Archostemata, Myxophaga, Adephaga e o grande grupo Polyphaga (Johnson & Triplehorn, 2005). Este último, com cerca de 300 mil espécies descritas, contém mais de 90% dos besouros (Grimaldi & Engel, 2006; Ide & Vanin, 2002). A classificação interna de Polyphaga compreende as superfamílias: Hydrophiloidea, Staphylinoidea, Scarabaeoidea, Buprestoidea, Byrrhoidea, Elateroidea, Bostrichoidea, Cleroidea, Cucujoidea, Chrysomeloidea, Curculionoidea e Tenebrionoidea, com as cinco últimas

constituindo o agrupamento Cucujiformia, que representa mais da metade de todos os coleópteros (Cranston & Gullan, 2012).

Os besouros são distribuídos em mais de 170 famílias (Lawrence *et al.*, 1999), sendo as maiores representadas por Curculionidae, Chrysomelidae, Staphilinidae e Tenebrionidae. Entretanto, há muita controvérsia quanto ao status taxonômico em nível de família (Hunt *et al.*, 2007). Entre os fatores atribuídos a isso estão: a carência de especialistas para a maioria dos grupos e a grande diversidade do grupo, sendo mais investigados àqueles considerados mais importantes.

1.2. Superfamília Tenebrionoidea

Tenebrionoidea é uma superfamília diversa, composta por besouros morfológica e ecologicamente heterogêneos. A classificação interna do grupo ainda é confusa (Slipinski & Lawrence, 1999), pois o elevado número de espécies e a escassez de estudos dificultam o estabelecimento de limites e, conseqüentemente, a composição taxonômica, principalmente em nível de família (Slipinski & Lawrence, 1999; Levkaničová, 2009). Esta superfamília, com aproximadamente 30 mil espécies distribuídas em 30 famílias, é uma das maiores dentre os Coleoptera (Lawrence & Newton, 1995). As famílias que compõem o grupo são: Aderidae, Anthicidae, Archeocrypticidae, Boridae, Chalcodryidae, Ciidae, Ischaliidae, Melandryidae, Meloidae, Mordellidae, Mycetophagidae, Mycteridae, Moedemeridae, Oedemeridae, Promecheilidae, Prostomidae, Pterogeniidae, Pyrochroidae, Pythidae, Ripiphoridae, Salpingidae, Scaptiidae, Stenotrachelidae, Synchronidae, Tenebrionidae, Tetratomidae, Trachelostenidae, Trictenotomidae, Ulodidae e Zopheridae. Sendo as maiores Tenebrionidae e Meloidae (Levkaničová, 2009).

1.3. Família Tenebrionidae

As espécies de Tenebrionidae são altamente variáveis em forma e tamanho, são fundamentalmente detritívoras, alimentando-se de matéria de origem vegetal ou animal em decomposição. Os adultos são altamente esclerotizados de coloração escura. Alguns tenebrionídeos são pragas de grãos armazenados e farinha e tendem a ser bastante destrutivos. Dentre as espécies mais conhecidas estão:

Tribolium castaneum e *Tenebrio molitor* (Gallo *et al.*, 1988, Johnson & Triplehorn, 2005).

Tenebrionidae é umas das famílias mais especiosas de Tenebrionoidea com mais de 19 mil espécies distribuídas em dois mil gêneros (Aalbu *et al.*, 2002). Embora existam trabalhos utilizando dados moleculares, morfológicos e comportamentais, ainda permanecem muitas dúvidas quanto à classificação taxonômica em nível de gênero e, principalmente, de subfamília (Doyen & Tschinkel, 1982; Levkaničová, 2009). A classificação interna de Tenebrionidae envolve 10 subfamílias: Phrenapatinae, Zolodininae, Pimeliinae, Cossyphodinae, Nilioninae, Tenebrioninae, Alleculinae, Diaperinae, Coelometopinae e Lagriinae (Doyen *et al.*, 1990; Lawrence & Newton, 1995). Dentre estas, Nilioninae, Alleculinae e Lagriinae se destacam por terem uma classificação confusa.

Os tenebrionídeos são divididos nos ramos Tenebrionoide e Lagrioide. Este último é considerado o mais basal dentro da família, e nele se encontram os lagrídeos. Estes foram inicialmente considerados uma família independente (Lagriidae), mas atualmente são classificados por alguns autores como subfamília Lagriinae dentro de Tenebrionidae (ver, Matthews, 2003; Bouchard *et al.*, 2005).

1.4 Espermatogênese em Tenebrionidae

Características do sistema reprodutivo, da espermatogênese e da morfologia dos espermatozoides tem sido comumente usadas para ajudar a estabelecer relações filogenéticas entre os insetos (Baccetti & Dallai, 1978; Jamieson *et al.*, 1999; Lino-Neto *et al.*, 2000; Zama *et al.*, 2001). Nos tenebrionídeos, *Tenebrio molitor* (Fig. 12.1b, Chapman, 1998), *Palembus dermestoides* (Almeida & Cruz-Landim, 2000), *Tribolium castaneum* e *Zophobas confusa* (observação pessoal), cada testículo é formado por seis folículos (ou lóbulos) conectados ao ducto deferente por seis curtos ductos eferentes. Cada folículo é preenchido por grupos de células germinativas em diferentes fases da espermatogênese. A espermatogênese segue uma sequência comum para os insetos em geral. Cada espermatogônia passa por sucessivas divisões mitóticas, resultando em um grupo (denominado cisto) de espermatócitos primário. Em seguida, estes espermatócitos sofrem duas divisões meióticas sucessivas resultando em espermátides. Estas, após profunda diferenciação morfológica (a espermiogênese), culminam em espermatozoides (ver

Dumser, 1980). Nos insetos em geral, a espermiogênese culmina com espermatozoides organizados em um feixe por cisto, com todos os núcleos voltados para o mesmo lado do feixe e em *registro* (Figs 1A,B) (Virkki, 1969; Dumser, 1980). Entretanto, nos tenebrionídeos, a medida que as espermátides se alongam, os núcleos migram para duas regiões opostas na periferia do cisto, culminando na formação de feixes de espermatozoides com metade dos núcleos para um lado e metade para o outro (Figs 1C,D em Dias *et al.*, 2012).

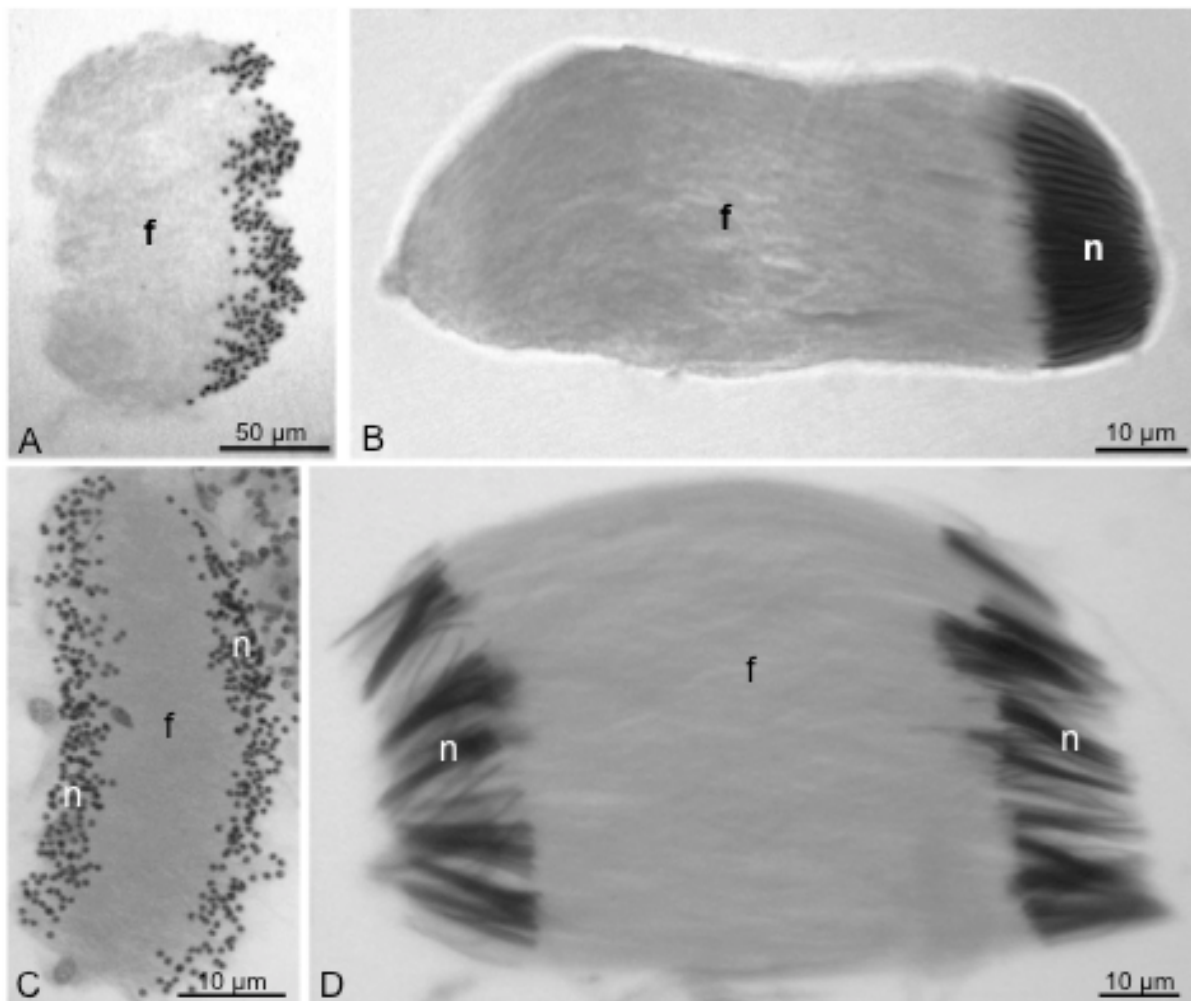


Fig. 1 Cistos de em estágios inicial (A) e final (B) da espermiogênese do Curculionidae *Sitophilus zeamais*. Observe todos os núcleos situados em apenas um lado do cisto. Dois cistos em montagem total no estágio inicial (C) e final (D) da espermiogênese no Tenebrionidae *Zophobas confusa*. Abreviações: (n) núcleos, (f) flagelos. A partir de Dias *et al.*, 2012.

1.5 Diversidade dos espermatozoides dos insetos

Em insetos, considerando os diversos tipos celulares, o espermatozoide é, de longe, o mais diversificado (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Possivelmente indicando uma rápida e divergente evolução morfológica. O comprimento dessa célula varia de 1,7 μm , como no térmita *Reticulitermes lucifugus* (Baccetti *et al.*, 1981) a 58.000 μm , como em *Drosophila bifurca* (Pitnik *et al.*, 1995). A forma pode ser tão diversa quanto são as espécies que o produz, pois pode ser esférico em algumas e em outras helicoidal, cônico, ameboide, lenticular, fusiforme, barriforme, ou ter uma forma que não pode ser descrita com uma palavra ou em uma ou poucas sentenças (Phillips, 1970). Segundo Phillips (1970), no mínimo em princípio, é possível determinar, a partir da análise de uma única célula espermática, o filo, a ordem, o gênero e a espécie do macho no qual esta célula foi produzida. Isso é semelhante ao que pode ser feito com o grão de pólen, mas o mesmo não é o caso para células somáticas (Dallai & Afzelius, 1980). Por isso, dados morfológicos dessas células, associados a outros dados, por exemplo, moleculares e da morfologia externa, podem formar um conjunto de caracteres mais consistente e confiável para a compreensão das relações filogenéticas dos insetos.

1.6 Ultraestrutura e filogenia

As variações ultraestruturais dos espermatozoides também tem sido comumente utilizadas para resolver dúvidas sobre a filogenia de vários grupos de insetos, incluindo os besouros (Burrini *et al.*, 1987; Baccetti & Daccordi, 1988; Jamieson *et al.*, 1999).

Ake Franzén (1955) foi o primeiro a realizar estudos utilizando a morfologia e ultraestrutura destas células no estabelecimento de relações filogenéticas (ver Birkhead *et al.*, 2009). E em seguida, vários autores deram continuidade a esta linha de pesquisa. Em Coleoptera, um dos primeiros trabalhos comparativos de morfologia dos espermatozoides foi descrito por Dlugosz & Harrold (1952) em *Pitnus tectus* (Ptnidae). No qual os espermatozoides apresentam estrutura típica daquela observada nos Pterygota em geral. Isto é: a presença de um axonema 9 + 9 + 2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios (Jamieson *et al.*,

1999). Em Tenebrionidae, conforme a literatura, o primeiro espermatozoide observado foi o de *Tenebrio molitor* por Baccetti *et al.*, (1973).

Os tenebrionídeos, curculionídeos e crisomelídeos estão entre os maiores grupos que compõem a secção Cucujiformia. Há mais de 20 anos foi descrita a morfologia dos espermatozoides de várias espécies de Curculionoidea (Burrini *et al.*, 1987) e Chrysomelidae (Baccetti & Daccordi, 1988). Entretanto, para os tenebrionídeos, ainda são pouquíssimos os trabalhos sobre a ultraestrutura dessas células. Até o momento apenas o trabalho de Baccetti *et al.*, (1973), com *Tenebrio molitor*, mencionado a cima e de *Tribolium castaneum* (Dias *et al.*, 2010) descrevem sucintamente a ultraestrutura dessas células.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Identificar caracteres que possam ser utilizados em estudos de sistemática deste grupo de insetos e ampliar as informações sobre a morfologia dos espermatozoides de Tenebrionidae visando.

2.2 Objetivo específico

Descrever características morfológicas de testículo, da espermiogênese e dos espermatozoides de *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae), discutindo-as sob o ponto de vista taxonômico.

3. Materiais e Métodos

Machos adultos de *L. villosa* (Lagriinae) foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV) a partir de colônias mantidas na UFV (20° 45' 14" S, 42° 52' 55" W 648 m), Minas Gerais, Brasil.

3.1. Suspensão de espermatozoides para microscopia de luz

Gotas de suspensão de espermatozoides, extraídos de vesícula seminal, foram espalhadas sobre lâminas histológicas e fixadas com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 15-20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e, por último, em água destilada e secas à temperatura ambiente. Para medir o tamanho total dos espermatozoides, parte das preparações foram coradas com Giemsa por 15 min e, em seguida, lavada em água corrente e seca à temperatura ambiente. A análise e fotodocumentação dos espermatozoides foram feitas em um fotomicroscópio (Olympus BX-60). Para medir o comprimento dos núcleos, algumas preparações foram coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão PBS, por 20 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e montadas com sacarose 50%. Estas lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60), equipado com filtro BP360-370 nm. Todas as medidas foram feitas usando o programa de análise de imagem *Image Pro-Plus*.

3.2 Montagem total e cortes histológicos dos cistos

Para observar cistos em montagem total, testículos foram dissecados em solução tampão fosfato de sódio e transferidos para uma solução de orceína acética a 2%. Após 20 minutos, os folículos foram colocados em lâminas histológicas com uma gota da solução de orceína acética, dissociados utilizando estiletes, cobertos por lamínulas e, em seguida, fotografados usando microscópio Olympus BX-60.

Para obter os cortes histológicos, os testículos foram dissecados e fixados de 4 a 12 h em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação foram lavados por duas horas no mesmo tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Em seguida, o material foi desidratado em uma série alcoólica crescente, 30%, 50%, 70% e 90% (15 minutos cada um), e depois por dois banhos de 10 minutos cada em álcool 100%. Infiltrado em temperatura ambiente em dois banhos de 4 h cada, sendo o primeiro como uma mistura de historesina e álcool (1:1) e o segundo com historesina pura. Para a inclusão os testículos foram imersos em historesina acrescida do catalizador em moldes de silicone que foram colocados

em placas de Petri e, em seguida, transferidos para estufa a 58 °C, por 24 h. Os cortes semifinos (1,0-0,5 µm de espessura) foram obtidos em micrótomo Leica RM 2155 com navalhas de vidro. Estes foram transferidos para lâminas histológicas que foram coradas com hematoxilina de Harris por 15 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, em seguida coradas com eosina por 1 minuto e lavadas rapidamente em água de torneira. Após secas a temperatura ambiente, os cortes foram protegidos com lamínulas montadas com Entellan para visualização em microscopia óptica e documentação.

3.3 Microscopia eletrônica de transmissão.

Para descrição ultraestrutural dos espermatozoides, vesículas seminais de machos adultos de *L. villosa* foram dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixadas, por 24 h, em solução de glutaraldeído a 2,5%, ácido pícrico 0,2%, sacarose 3% e CaCl₂ 5 mM em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o material foi lavado com o mesmo tampão, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 h, desidratado em série crescente de acetona e infiltrado e incluído em resina Epoxi (Epon 812). Os cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo automático Sorval MT2-B com navalha de diamante, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo a 2%. As análises e os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Testículos foram fixados por 24 h em glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, e lavados em solução salina tamponada (*PBS = phosphate buffered saline*), pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% e ferricianeto de potássio a 0,8%, por 2h. Após lavados novamente em PBS, foram submetido à desidratação em uma série crescente de acetona (30-100%). Em seguida, as amostras foram secas no aparelho de ponto crítico (BAL-TEC – CPD030), utilizando CO₂ líquido. Posteriormente, as amostras foram afixadas em suportes de cobre, com fita adesiva contendo carbono, metalizadas com uma fina

camada de ouro e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss LEO VP1430).

4 Resultados

O sistema reprodutivo masculino de *L. villosa* consiste de um par de testículos, cada um formado por aproximadamente 60 folículos fusiformes (Figs 2A,B, 4A). Cada folículo desemboca em um ducto eferente e é completamente preenchido por cistos em diferentes fases da espermatogênese (Figs 2C, 4A). No mesmo cisto todas as células germinativas se encontram na mesma fase da espermatogênese e, àqueles cistos em estágios mais avançados, se encontram mais próximo ao ducto eferente (Fig. 4A).

No início da espermiogênese, as espermatídes, ainda arredondadas, encontram-se distribuídas uniformemente por todo o cisto (Fig. 3A). Em seguida, inicia-se a formação dos flagelos e, conseqüentemente, o alongamento das células com os núcleos, ainda esféricos, migrando para duas regiões opostas na periferia do cisto (Fig. 3B). Nas fases subseqüentes, os flagelos continuam a crescer e os núcleos passam de esféricos à fusiformes (Fig. 3C) e, por fim, adquirem o formato longo, como são observados nos espermatozoides (Fig. 3D,E). No final da espermiogênese, devido a migração nuclear para regiões opostas, tem-se a formação de feixes com os espermatozoides dispostos antiparalelamente dentro dos cistos com os núcleos posicionados tanto nas extremidades, como ao longo de praticamente todo o feixe (Figs 3D,E). Nesta espécie observamos até 1.200 espermatozoides por cisto, o que corresponde a 11 ciclos de divisões (2^{11}) (Fig. 3F). Os cistos migram ao longo do folículo em direção ao ducto eferente durante a espermatogênese (Fig. 4A), onde eles se rompem e os espermatozoides são liberados para o ducto eferente não mais organizados em feixes (Fig. 4B).

Os espermatozoides de *L. villosa* são finos e longos, medindo por volta de 78 μm de comprimento (Fig. 5A,B). A região de cabeça, claramente distinguível daquela de flagelo, mede 8 μm de comprimento e é composta pelo acrossomo e núcleo (Fig. 5A-C).

O complexo acrossomal, durante a espermiogênese, inicia a partir da vesícula pré-acrossomal (Fig. 5D-G). Esta se alonga, formando a vesícula

acrossomal (Fig. 5H-J) e, simultaneamente, forma-se o perforatorium (Fig. 5H-J) e, no final, a camada extra-acrossomal (Fig. 5H,J). Esta última, na região apical do acrossomo, exibe uma estrutura tipo um capuz (Fig. 5H,J). No espermatozoide, a vesícula acrossomal é cônica, reveste o perforatorium e, os dois, encontram-se apoiados na extremidade anterior do núcleo, mediados por uma camada de material de fraca eletrondensidade (Fig. 5J). Em corte longitudinal observa-se que a região basal da vesícula acrossomal é assimétrica, por apresentar um dos lados dilatado (Fig. 5J). O perforatorium é compacto, tem a região próxima ao núcleo larga que se estreita até região mediana, tornando-se afilado na extremidade anterior (Fig. 5J). Em corte transversal, tanto a vesícula acrossomal quanto o perforatorium são acentuadamente achatados (Fig. 5I).

O núcleo possui a cromatina compacta e bastante eletrondensa. Ele apresenta-se circular em corte transversal (Fig. 6A) e, a medida que se aproxima da extremidade anterior, torna-se afilado e fusiforme, adquirindo o mesmo formato do acrossomo (Fig. 6B). A base do núcleo é chanfrada, tem uma cavidade central e se associa lateralmente às extremidades anteriores dos derivados mitocondriais e, em sua ponta, ao axonema (Fig. 6C-H). Nas espermátides, a extremidade anterior do axonema (ou centríolo) é conectada ao núcleo por um material denominado adjunto do centríolo (Fig. 6I,J). Material também encontrado nos espermatozoides, entre os dois derivados e entre estes e o núcleo (Fig. 6C-H).

Os dois derivados mitocondriais começam em diferentes alturas, um no início da chanfradura nuclear e o outro aproximadamente no meio dessa região (Fig. 6C-H). Em corte transversal eles são simétricos em forma e diâmetro (Fig. 7A-D), apresentam-se piriformes, com a região mais dilatada adjacente ao axonema, e tem diâmetro maior do que aquele do axonema (Fig. 7A). Mais da metade da área de cada derivado é preenchida por material paracristalino, situado na região mais dilatada (Fig. 7A,B). A área restante do derivado, a região afilada e oposta ao axonema, é ocupada pelas cristas mitocondriais (Fig. 7C). A medida que se aproxima da porção final do flagelo, ocorre redução no diâmetro dos derivados e, finalmente, eles terminam juntos e imediatamente antes do axonema (Fig. 7D,E).

O axonema possui o padrão microtubular $9 + 9 + 2$ e inicia-se junto à ponta da chanfrada do núcleo, imediatamente abaixo das extremidades anteriores dos derivados mitocondriais (Fig. 7A). Em corte transversal, observa-se que espaços entre os microtúbulos que formam a parede do axonema são preenchidos por

material intertubular (Fig. 7B). No final do flagelo o axonema, que é o último a terminar, perde sua organização, com todos os seus microtúbulos finalizando praticamente juntos (Fig. 7E).

Os dois corpos acessórios, situados entre os derivados mitocondriais e o axonema, são iguais, eletrondensos e fusiformes em corte transversal (Fig. 7A,B).

Além dos componentes acima citados, cortes transversais do flagelo mostram duas estruturas conectivas em forma de cálice (Fig. 7B). A região em forma de bojo, dessas estruturas, associa-se a um derivado mitocondrial e a um corpo acessório, enquanto a haste conecta-se ao material intertubular do axonema.

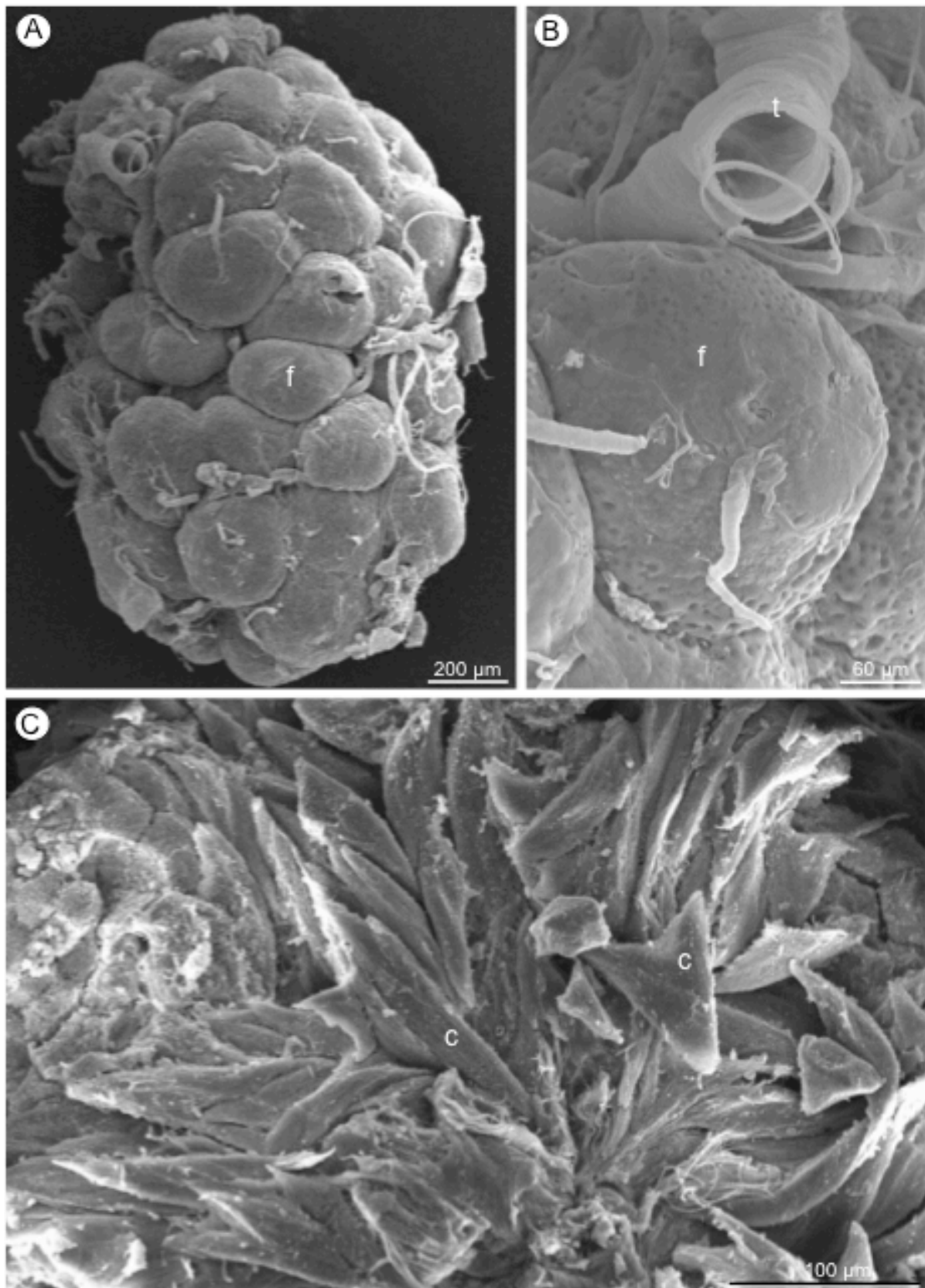


Fig. 2 Micrografias eletrônica de varredura do testículo de *L. villosa*. **(A)** Testículo formado por cerca de 60 folículos (f). **(B)** Folículo em maior aumento. (t) traqueia. **(C)** Testículo fraturado mostrando cistos (c) em diferentes fases da espermatogênese.

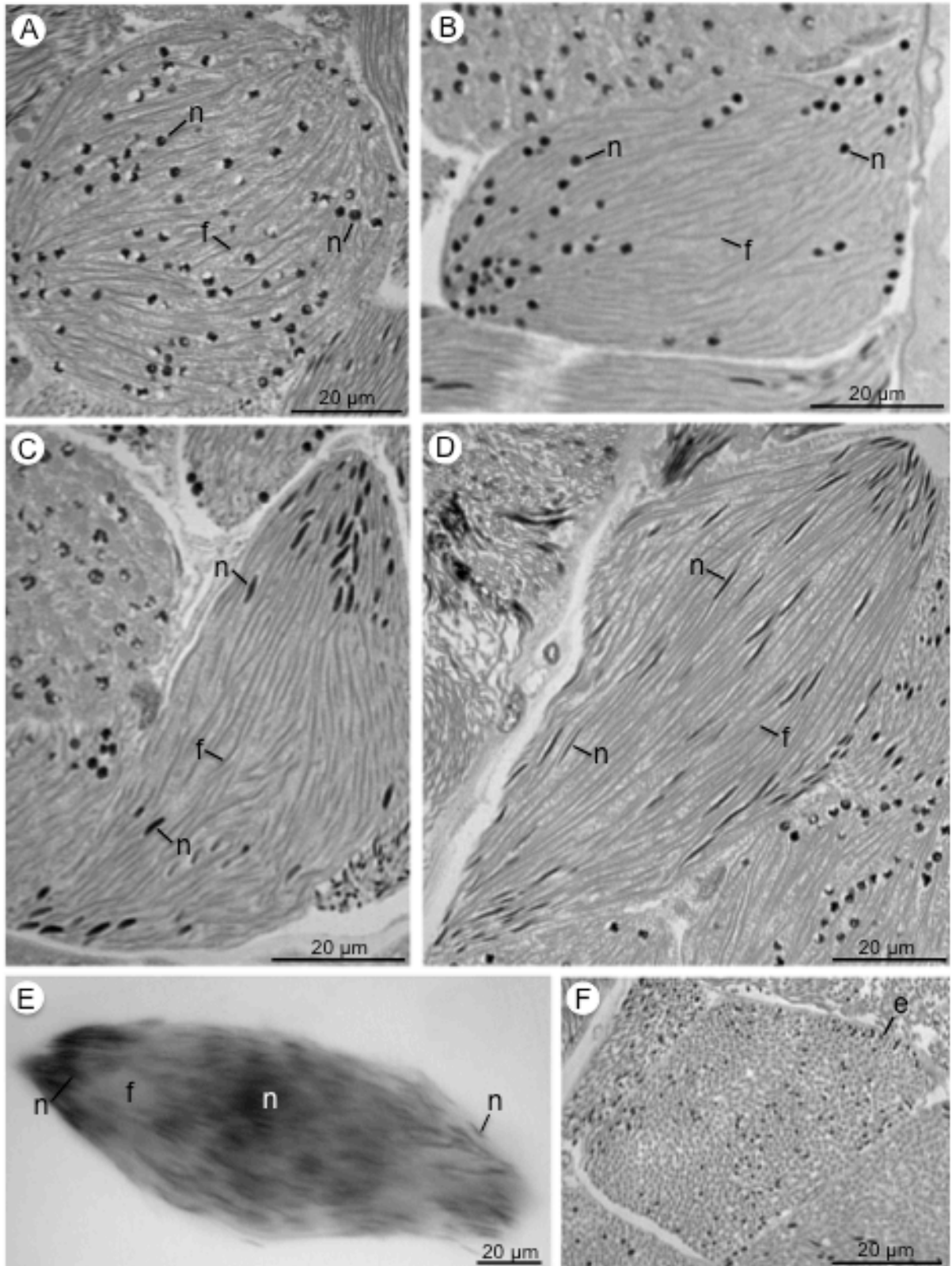


Fig. 3 Cistos em microscopia de luz de *L. villosa*. (A-D) Secções longitudinais de cistos em estágios progressivos de espermiogênese. As espermátides estão posicionados antiparalelamente com os núcleos distribuídos ao longo do cisto. (E) Cisto em montagem total. (F) Secção transversal de um cisto mostrando cerca de 1.100 espermátides (s) em estágio adiantado da espermiogênese. Abreviaturas: (n) núcleo, (f) flagelo, (e) espermátides.

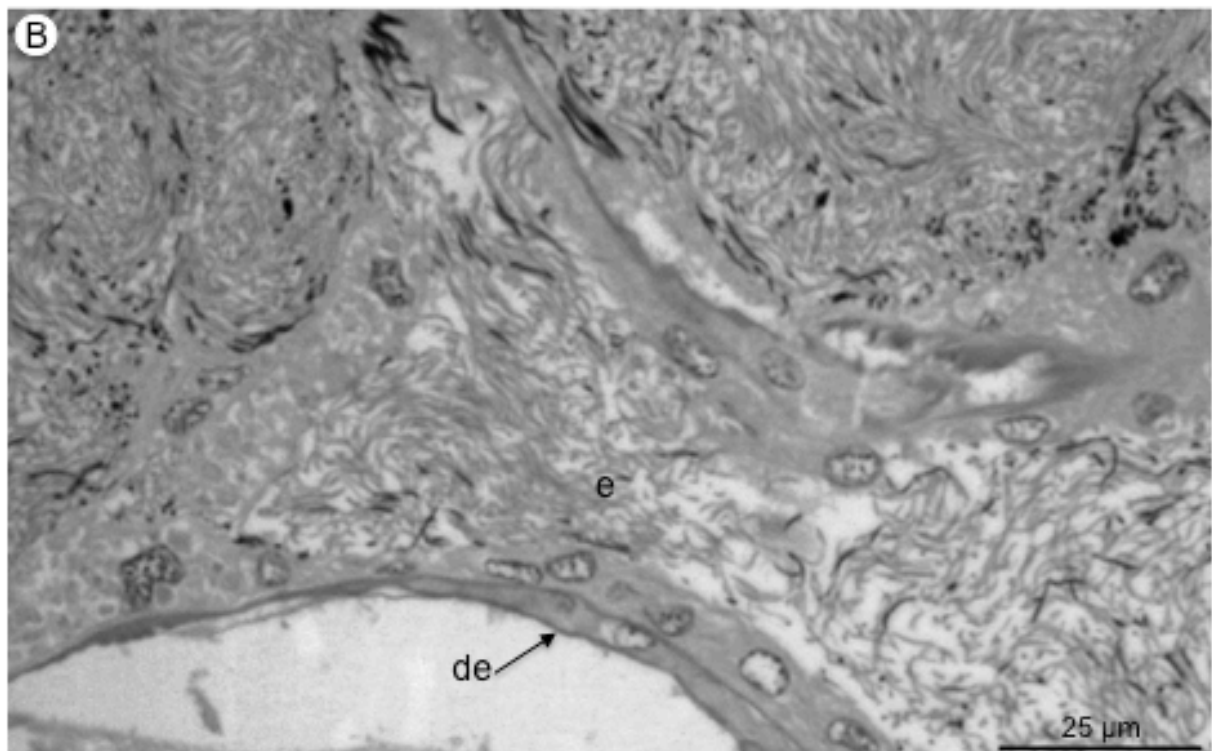
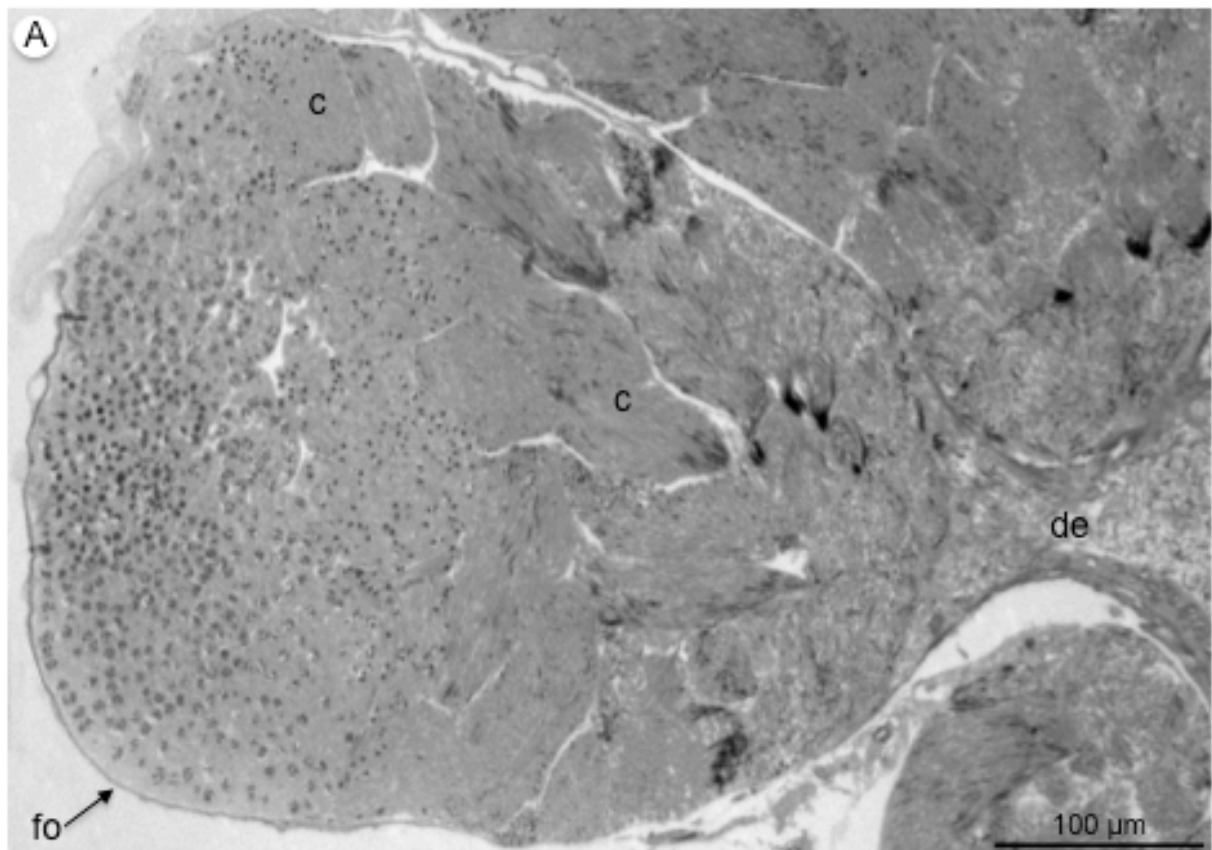


Fig. 4 (A) Corte longitudinal de um folículo testicular de *L. villosa* em microscopia de luz mostrando cistos em diferentes estágios da espermatogênese. **(B)** Região de um ducto eferente mostrando que os espermatozoides não estão mais organizados em feixes. Abreviaturas: (fo) folículo, (de), ducto eferente, (e) espermatozoide.

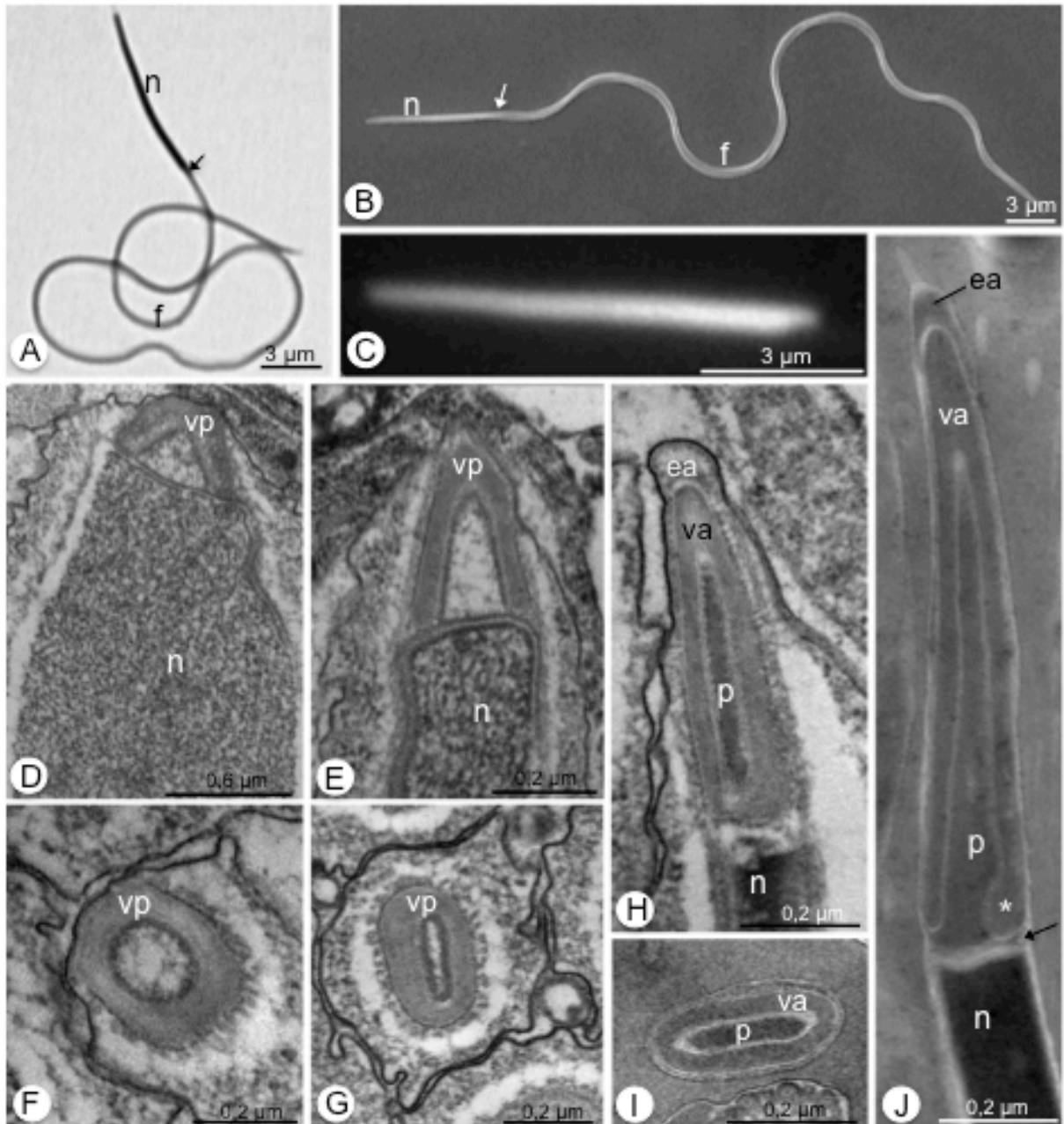


Fig. 5 (A,B) Espermatozoides em microscopia de luz (A) e eletrônica de varredura (B) de *L. villosa*. A seta indica a região de transição núcleo-flagelo. (C) Núcleo corado com DAPI. (D-J) Secções longitudinais (D,E,H,J) e transversais (F,G,I) mostrando a região acrossomal em diferentes estágios de desenvolvimento em espermátides (D-H) e em espermatozoide (I,J). Em J, o asterisco indica a dilatação na base da vesícula acrossomal e a seta a camada de material de baixa eletrondensidade. Abreviaturas: (n) núcleo, (f) flagelo, (vp) vesícula pré-acrossomal, (va) vesícula acrossomal, (ea) camada extra-acrossomal, (p) perforatorium.

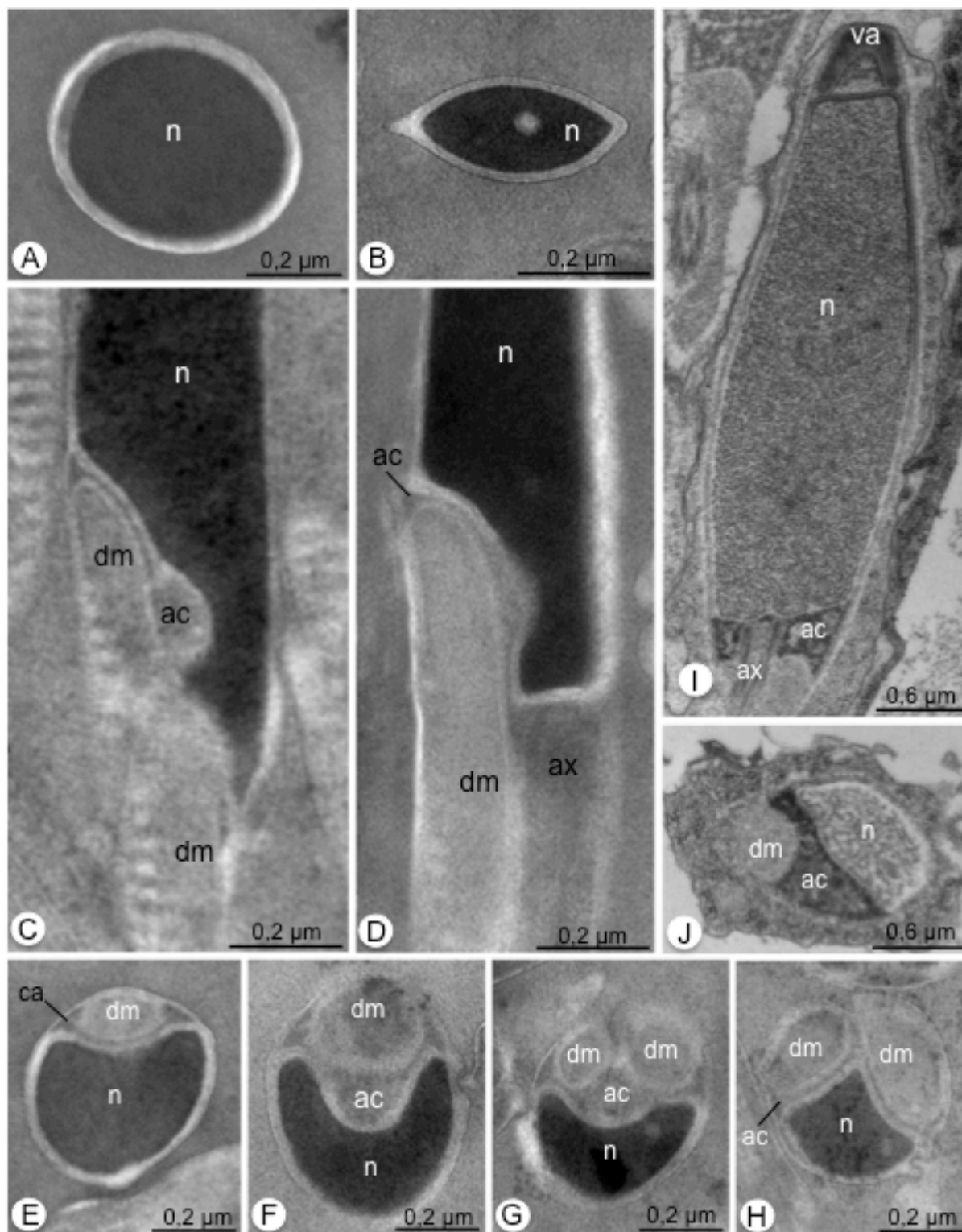


Fig. 6 Espermátides em microscopia eletrônica de transmissão de *L. villosa*. (A,B) Secções transversais mostrando que o núcleo é circular (A), mas fusiforme na região anterior (B). (C,D) Secções longitudinais da região de transição núcleo-flagelo. (E-H) Secções transversais da transição núcleo-flagelo da região anterior para a posterior. (I) Espermátides em secções longitudinal (I) e transversal. Observe, na transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo entre um derivado mitocondrial e o núcleo. Abreviaturas: (n) núcleo, (dm) derivados mitocondriais, (ac) adjunto do centríolo, (ax) axonema.

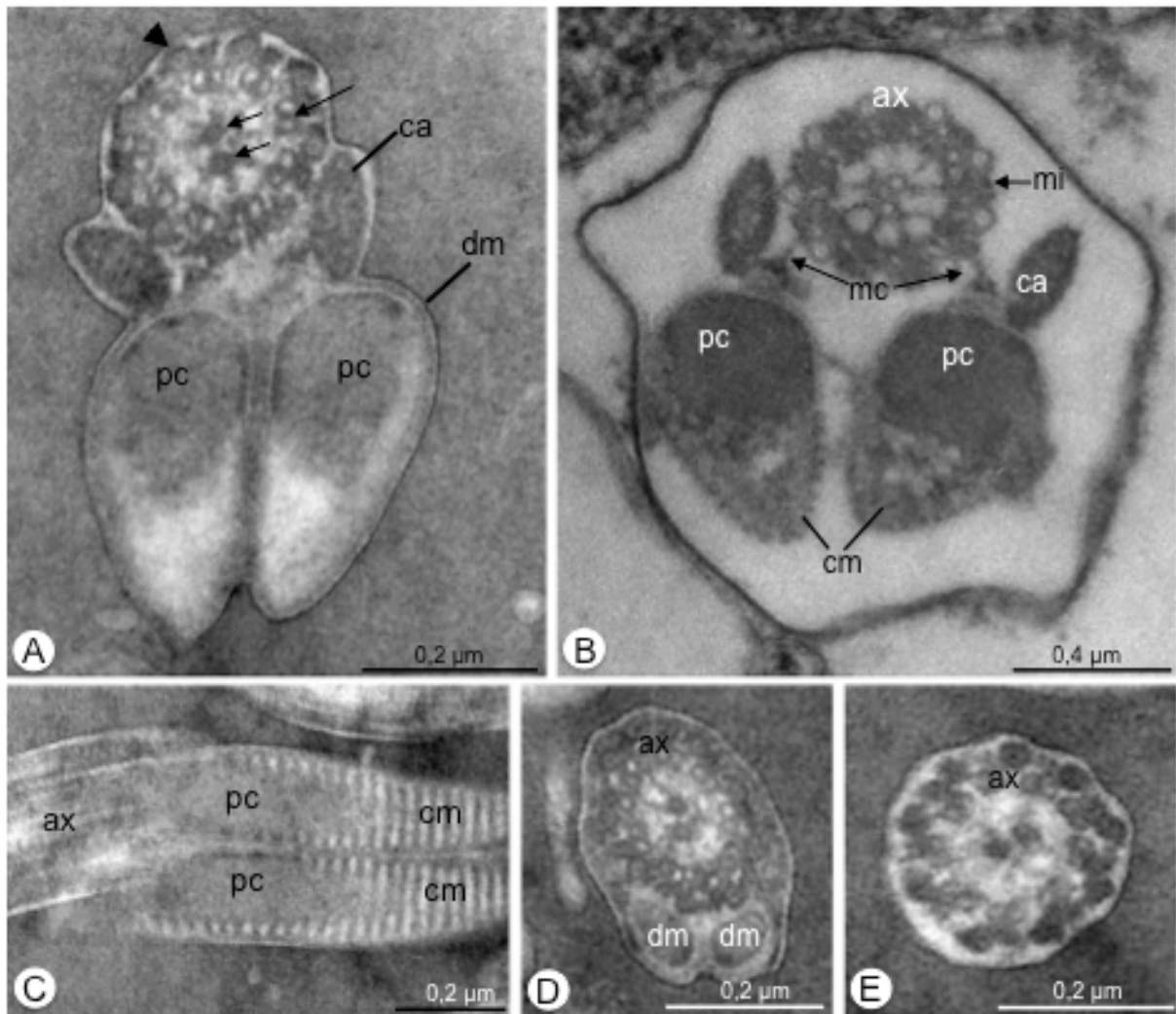


Fig. 7 (A,B) Secções transversais do flagelo de *L. villosa*, mostrando o axonema formado por nove duplas de microtúbulos (seta maior), um par central (seta curta) e nove acessórios (cabeça de seta). **(C)** Secção oblíqua do flagelo mostrando a região das cristas mitocondriais. **(D,E)** Secções transversais da região final do flagelo mostrando que os dois derivados mitocondriais terminam juntos e antes do axonema. Abreviaturas: (pc) material paracrystalino, (mc) material conectivo, (mi) material intertubular.

5. Discussão

As espermátides se posicionando com os núcleos voltados para lados opostos do cisto e culminado com a formação de feixes com os espermatozoides dispostos antiparalelamente, como ocorre em *L. villosa*, é uma característica observada, até agora, apenas em outros tenebrionídeos (Dias *et al.*, 2012). Esse compartilhamento pode ser esperado se, de fato, os lagrídeos forem grupo irmão daqueles tenebrionídeos, assim podendo ser classificados como Tenebrionidae (Doyen & Tschinkel 1982; Bouchard *et al.* 2005). Por outro lado, observamos características

que diferenciam *L. villosa* das espécies de tenebrionídeos já estudadas como, por exemplos, os núcleos dos espermatozoides distribuídos ao longo de, praticamente, todo o feixe, até 1.200 espermatozoides por cisto (2¹¹) e cerca de 60 folículos por testículos. Enquanto nos demais tenebrionídeos estudados até o momento, os núcleos dos espermatozoides se posicionam apenas nas duas extremidades do feixe, ocorre até 512 espermatozoides por cisto (2⁹) (Dias *et al.*, 2012) e cada testículo é formado por apenas seis folículos (Chapman, 1998).

Os espermatozoides de *L. villosa* tem a estrutura básica semelhante aquela observada em outros Coleoptera, principalmente aqueles da secção Cucujiformia (Baccetti *et al.*, 1973; Burrini *et al.*, 1987; Werner & Simmons, 2011). São filiformes, o complexo acrossomal, além da vesícula e do perforatorium, tem uma camada extra-acrossomal e, o flagelo, apresenta, um axonema com 9 + 9 + 2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Entretanto, a morfologia dessas células exibem algumas características, principalmente no flagelo, que distingue *L. villosa* de outros Coleoptera e outras que a distingue de outros tenebrionídeos.

Os espermatozoides de *L. villosa*, com 70 µm de comprimento, é menor do que aqueles dos demais tenebrionídeos estudados. P. ex., os de *Tribolium castaneum* mediram cerca de 90 µm (Dias *et al.*, 2010), *Palembus dermestoides* 100 µm, *Zophobas confusa* 107 µm (Dias *et al.*, 2012) e *Tenebrio molitor* 310 µm (Baccetti *et al.*, 1973). Mesmo quando comparados com aqueles de várias espécies de Curculionoidea (Burrini *et al.*, 1987) e de Crysomelidae (Baccetti & Daccordi, 1988), eles ainda são os menores espermatozoides descritos.

Embora o complexo acrossomal dos espermatozoides de *L. villosa* possua três camadas, ele é facilmente diferenciado mesmo dos tenebrionídeos *Tr. castaneum* (Dias *et al.*, 2010) e *Te. molitor* (Burrini *et al.*, 1987), por ter a base da vesícula acrossomal assimétrica devido à dilatação em um dos lados. Ainda, o formato bastante achatado do acrossomo é outra característica que também diferencia os espermatozoides de *L. villosa* daqueles de, por exemplo, *Tr. castaneum* (Dias *et al.*, 2010), onde essa estrutura apresenta-se circular em corte transversal.

O núcleo dos espermatozoides de *L. villosa*, medindo 8 µm de comprimento, também é menor do que aqueles observados nos tenebrionídeos *Tr. castaneum* e *P. dermestoides* (10 µm), *Zophobas confusa* (17 µm) e *Te. molitor* (20 µm). Ainda, o

núcleo fusiforme, em corte transversal, apenas na extremidade anterior difere os espermatozoides de *L. villosa* daqueles de *Tr. castaneum*, na qual todo o núcleo apresenta-se fusiforme (Dias *et al.*, 2010).

A extremidade nuclear chanfrada e associada lateralmente às extremidades anteriores dos derivados mitocondriais e ao axonema, como ocorre nos espermatozoides de *L. villosa*, de *Te. molitor* (Baccetti *et al.*, 1973) e de *Tr. castaneum* (Dias *et al.*, 2010), indicam proximidade filogenética entre esses tenebrionídeos. Por outro lado, esta característica os diferencia de Curculionoidea (Burrini *et al.*, 1987) e de Crysomelidae (Baccetti & Daccordi, 1988), nos quais as extremidades anteriores dos derivados mitocondriais e do axonema encontram-se inseridas em uma cavidade na base do núcleo. Isso é esperado se curculionídeos e crisomelídeos forem grupos mais próximos entre si do que qualquer um deles com os tenebrionídeos, como proposto, p.ex., Hunt *et al.* (2007).

Na maioria dos insetos, na região de transição núcleo-flagelo dos espermatozoides, tem-se uma estrutura, geralmente eletrondensa, denominada adjunto do centríolo. Foi sugerido que a principal função do adjunto do centríolo seja manter os elementos flagelares associados ao núcleo (Phillips 1970; Baccetti & Afzelius, 1976). Em alguns Coleoptera, tem-se que esta estrutura ocorre nas espermátides, mas não é encontrada nos espermatozoides. Em *L. villosa* observa-se um material eletrondenso entre os dois derivados e entre eles e o núcleo, aparentemente conectando estes elementos. Assim, considerando que seja essa a função desse material e que um adjunto centriolar está presente em espermátides, pode-se supor que os espermatozoides de *L. villosa*, e possivelmente de outros besouros, possuem adjunto centriolar, embora bastante reduzido.

Em tenebrionídeos, como em crisomelídeos e curculionídeos, secções transversais dos elementos flagelares oferecem bons caracteres diagnósticos. Por exemplo, a simetria marcada dos derivados mitocondriais diferencia facilmente *L. villosa* de *Te. molitor* (Baccetti *et al.*, 1973) e *Tr. castaneum* (Dias *et al.*, 2010), nas quais a área de um dos derivados é, pelo menos, duas vezes maior àquela do outro derivado. Os tenebrionídeos geralmente são organizados nos ramos Lagrioide e Tenebrionoide (ver: Doyen & Tschinkel, 1982), com *L. villosa* no primeiro grupo e *Te. molitor* e *Tr. castaneum* no segundo. A diferença entre os derivados mitocondriais (simétricos em *L. villosa* e assimétricos em *Te. molitor* e *Tr. castaneum*) pode ser mais uma característica apoiando esse arranjo. Ainda, os corpos acessórios

reduzidos e fusiformes, como observados nos flagelos de *L. villosa* em secção transversal, são muito semelhantes aqueles de *Te. molitor* (Baccetti *et al.*, 1973) e *Tr. castaneum* (Dias *et al.*, 2010), também mostrando as afinidades entre estas espécies. Por outro lado, os corpos acessórios de Curculionoidea (Burrini *et al.*, 1987) e Crysomelidae (Baccetti & Daccordi, 1988) são facilmente diferenciados dos de tenebrionídeos, principalmente por apresentarem, em um ou nos dois, uma expansão tipo "puff". Finalmente, as duas estruturas conectando o axonema aos derivados mitocondriais e corpos acessórios, observados em *L. villosa*, também ocorrem em *Te. molitor* e *Tr. castaneum*, considerando que estas pertencem a subfamílias distintas, possivelmente essa é mais uma característica compartilhada pelos tenebrionídeos em geral.

Considerando o acima exposto, percebe-se que a morfologia dos espermatozoides de *L. villosa* retrata as relações filogenéticas dessa espécie e, possivelmente, da subfamília Lagriinae, com outros tenebrionídeos. Por exemplo, acrossomo com uma terceira estrutura, a camada extra-acrossomal, é também observado nos espermatozoides de outros besouros da secção Cucujiformia. Já a ausência da expansão tipo "puff" nos corpos acessórios e a forma que o núcleo se associa aos derivados mitocondriais e o axonema, diferenciam os tenebrionídeos, incluindo esta espécie, dos Curculionoidea (Burrini *et al.*, 1987) e dos Crysomelidae (Baccetti & Daccordi, 1988). Ainda, o formato achatado do acrossomo e a base assimétrica da vesícula acrossomal, bem como a simetria (em forma e diâmetro) dos derivados mitocondriais, diferenciam os espermatozoides de *L. villosa* daqueles de *Tr. castaneum* e de *Te. molitor*, infelizmente os dois únicos tenebrionídeos que tiveram, até então, os espermatozoides descritos.

6. Conclusão

Os caracteres: (1) disposição antiparalela dos espermatozoides no feixe, (2) componentes flagelares associados lateralmente a base nuclear e (3) formato dos corpos acessórios apoiam a classificação dos lagrídeos como subfamília Lagriinae dentro dos Tenebrionidae, da mesma forma que, (4) o número de espermatozoides por cisto, (5) o número de folículos por testículo, (6) a assimetria dos derivados mitocondriais e (7) a assimetria da base e o formato do acrossomo, indicam que os

lagridios pertencem a um ramo distinto daquele dos tenebrionídeos acima mencionados (Fig. 8).

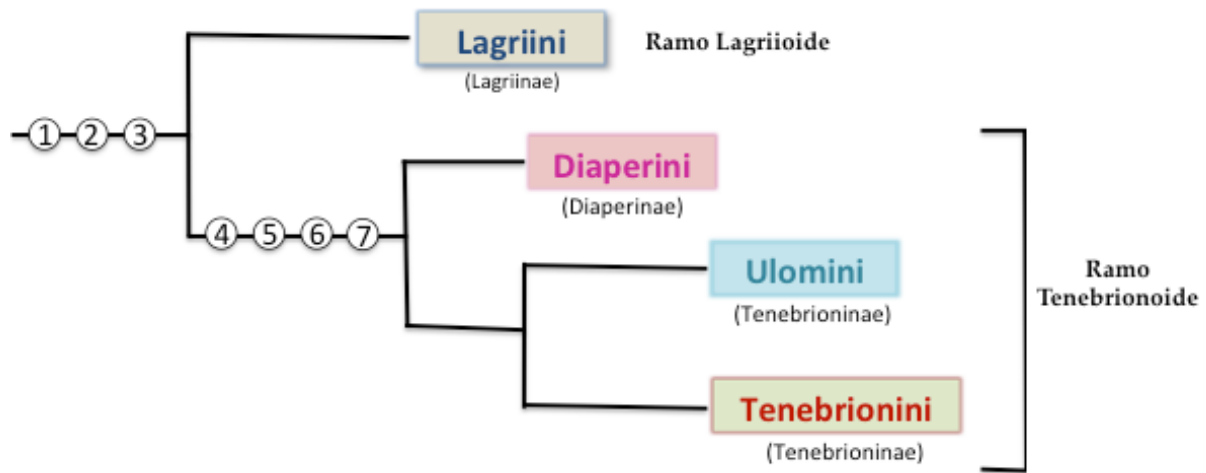


Fig. 8 Cladograma indicando os caracteres que apoiam os lagridios como uma subfamília de Tenebrionidae (1, 2 e 3) e aqueles que suportam a classificação deles em uma ramo distinto (4, 5, 6 e 7).

7. Referências bibliográficas:

- Aalbu R L, Triplehorn C A, Campbell J W, Brown K W, Somerby R A, Thomas D B. 2002. Tenebrionidae Latreille 1802. In: American Beetles. Volume 2. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. CRC Press, Boca Raton, 463–509 pp.
- Almeida M C. & Cruz-Landim C. 2000. Spermiogenesis in *Palembus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) with emphasis on the formation of mitochondrial derivatives. Brazilian Journal Morphological Sciences, 17, 75–80.
- Baccetti B, Burrini A G, Dallai R, Giusti F, Mazzini M, Renieri T, Rosati F, Selmi G. 1973. Structure and function in the spermatozoon of *Tenebrio molitor*. The spermatozoon of Arthropoda XX. Journal of Mechanochemistry & Cell Motility, 2, 149–61.
- Baccetti B. & Afzelius B A. 1976. The biology of the sperm cell. Monographs in Developmental Biology, 10, 1–254.
- Baccetti B. & Dallai R. 1978. The evolution of myriapod spermatozoa. Abhandlungen. Naturwissenschaftlicher Vereins in Hamburg, 21, 203–217.
- Baccetti B, Dallai R, Callaini G. 1981. The spermatozoa of arthropoda, *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. International Journal of Invertebrate Reproduction, 3, 87–99.

- Baccetti B. & Daccordi M. 1988. Sperm structure and phylogeny of the Chrysomelidae. In: Jolivet P, Petitpierre E, Hsiao TH. Biology of Chrysomelidae. Academic Press.
- Birkhead T R, Hosken D J, Pitnick S. 2009. Sperm Biology: An Evolutionary Perspective. Academic Press.
- Bouchard P, Lawrence J F, Davies A E, Newton A F. 2005. Synoptic classification of the world Tenebrionidae (Insecta: Coleoptera) with a review of family-group names. *Annales Zoologici*, 4, 499–530.
- Burrini A G, Magnano L, Magnano A R, Scala C, Baccetti B. 1987. Spermatozoa and phylogeny of Curculionoidea (Coleoptera). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 17, 1–50.
- Chapman R F. 1998. The insects structure and function. Cambridge University Press, New York. USA.
- Dallai R. & Afzelius B A. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: Results obtained with a new fixative. *Journal of Structural Biology*, 103, 164–179.
- Dias G, Gomes L F, Lino-Neto J. 2010. Sperm Morphology of *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). Disponível: <http://www.csbmm2011.com.br/arearestrita/arquivos/16873.pdf>
- Dias G, Yotoko K S C, Gomes L F, Lino-Neto J. 2012. Uncommon formation of two antiparallel sperm bundles per cyst in tenebrionid beetles (Coleoptera). *Naturwissenschaften*, 99, 773–777.
- Dlugosz J, Harrold J W. 1952. The spermatozoon of the spider beetle *Ptinus tectus* Boieldieu as seen by light and electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, B 64, 353–366.
- Doyen J T, Tschinkel W R. 1982. Phenetic and cladistic relationships among tenebrionid beetles (Coleoptera). *Systematic Entomology*, 7, 127–183.
- Doyen J T, Matthews E G, Lawrence J F. 1990. Classification and annotated checklist of the *Australian* genera of Tenebrionidae (Coleoptera). *Invertebrate Taxonomy*, 3, 229–260.
- Dumser J B. 1980. The regulation of spermatogenesis in insects. *Annual Review of Entomology*, 25, 341–369.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho R P L, Batista G C; Berti Filho E, Parra J R P, Zucchi R A, Alves S B, Vendramin J D. 1988. Manual de entomologia agrícola. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Grimaldi D. & Engel M S. 2006. Evolution of the Insects. Cambridge University Press, New York.

- Gullan P J. & Cranston P. 2012 Os insetos: Um resumo de Entomologia, 4^a edição, Roca, São Paulo.
- Hunt T, Bergsten J, Levkaničová Z, Papadopoulou A, St. John O, Wild R, Hammond P M, Ahrens D, Balke M, Caterino M S, Gómez-Zurita J, Ribera I, Barraclough T G, Bocakova M, Bocak L, Vogler A P. 2007. A Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a Superradiation. *Science*, 318,1913–1916.
- Jamieson B G M. 1987. The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jamieson B G M, Dallai R, Afzelius B A. 1999. Insect: their spermatozoa and phylogeny. *Science*, Enfield, NH.
- Lawrence J F, Newton A F. 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). *Biology, Phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*.
- Lawrence J F, Hastings A M, Dallwitz M J, Paine T A, Zurcher J E. 1999. Beetles of the World. A key and information system for families and subfamilies. CSIRO, Division of Entomology, Canberra, Australia.
- Levkaničová Z. 2009. Molecular phylogeny of the superfamily Tenebrionoidea (Coleoptera: Cucujiformia). PhD thesis, Palacký University in Olomouc.
- Lino-Neto J, Báo S N, Dolder H. 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zoologica*, 81, 205–211.
- Matthews E G. 2003. The Palorus group – a new subfamily of Tenebrionidae. *Spixiana*, 26, 49–55.
- Phillips D M. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *Journal Cell Biology*, 44, 243–277.
- Phillips D M. 1974. Spermogenesis. Academic, New York, USA.
- Pitnick S, Spicer G S, Markow T A. 1995. “How long is a giant sperm? *Nature*, 375, 109–109.
- Ponomarenko A G. 1995. The geological history of beetles: Biology, Phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson.
- Slipinski S A. & Lawrence J F .1999. Phylogeny and classification of Zopheridae *sensu novo* (Coleoptera: Tenebrionoidea) with a review of the genera of Zopheridae (excluding Monommatini). *Annales zoologici*, 49, 1–53.

- Triplehorn C A. & Johnson N F. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the study of insects. 7. ed. Thomson Brooks/Cole, USA.
- Vanin S A. & Ide S. 2002. Classificação comentada de Coleoptera. In: Costa C, Vanin S A, Lobo J M, Melic A, (org). Projeto de Red Iberoamericana de Biogeografia y Entomologia Sistemática, 193–205.
- Virkki N. 1969. Sperm bundles and phylogenesis. Zeit. Zellforsch, 101, 13–27.
- Werner M & Simmons L W. (2011) Ultrastructure of spermatozoa of *Onthophagus taurus* (Coleoptera, Scarabaeidae) exhibits heritable variation. Naturwissenschaften, 98, 213–223
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). Journal of Hymenoptera Research, 10, 261–270.