

**FRANCISCO WITALLO SOUSA DO NASCIMENTO**

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E  
ESPERMATOZOIDES DE *Discodon minutum* Pic, 1928 (COLEOPTERA:  
CANTHARIDAE)**

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

Orientador: José Lino-Neto

Coorientadora: Glenda Samara Dias Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N244m  
2024 Nascimento, Francisco Witallo Sousa do, 1995-  
Morfologia do sistema reprodutor masculino e  
espermatozoides de *Discodon minutum* Pic, 1928 (Coleoptera:  
Cantharidae) / Francisco Witallo Sousa do Nascimento. –  
Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Entomologia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 41-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.482>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Besouros - Reprodução - Morfologia. 2. Besouros -  
Espermatozoides - Morfologia. 3. Cantharidae. 4. Elateriformia.  
I. Lino Neto, José, 1959-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.7644


**FRANCISCO WITALLO SOUSA DO NASCIMENTO**

**MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E DOS  
ESPERMATOZOIDES DE *Discodon minutum* Pic, 1928 (COLEOPTERA:  
CANTHARIDAE)**

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


APROVADA: 26 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 FRANCISCO WITALLO SOUSA DO NASCIMENTO  
Data: 31/07/2024 13:14:33-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Francisco Witallo Sousa do Nascimento  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 JOSE LINO NETO  
Data: 12/08/2024 13:46:45-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

José Lino-Neto  
Orientador

*À minha vó Zélia, que ficaria orgulhosa por  
esse passo que estou dando*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela excelência e por incentivar a qualidade nas pesquisas.

Ao Prof. Dr. José Lino-Neto, pela orientação, paciência e conhecimentos compartilhados, que me foram não só úteis na pesquisa, mas também me fizeram enxergar uma ciência dinâmica e incrível que podemos fazer.

À Profa. Dra. Glenda Dias, pela orientação e amizade, sempre me trazendo novos pontos-de-vista sobre cada assunto ou problemática discutida, em conversas recheadas de risadas e descontração.

Aos doutores integrantes da banca, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

À minha família, que mesmo distante, me apoia e me incentiva a não desistir dos meus sonhos. Agradeço à minha mãe, Rosimeire, por ser todo suporte que eu preciso e a razão de eu sempre estar fazendo meu melhor. Agradeço às minhas irmãs, Indyara e Nayara, pelo apoio e amizade, e ao meu irmão, William, que está comigo mesmo distante. Agradeço ao meu pai, Wilson, por torcer pelo meu sucesso e ter estado presente sempre que possível. Agradeço às minhas avós, Zélia e Marlúcia, por sempre terem me incentivado a cumprir meus sonhos e pela preocupação comigo.

Aos meus amigos da vida, por não me abandonar nem com toda a distância desse mundo. Agradeço ao Daniel, meu irmão de vida aqui em Viçosa, se não fosse por ele eu não teria conhecido esse programa e essa pesquisa não existiria. Valeu demais por todo apoio, parceria, conversas, confiança e confidencialidade. Agradeço aos melhores, Caio, Leo, Mateus, Rafael, Caio, Nicolas e José, não só por sempre perguntarem quando que eu volto pra Fortaleza, mas também por toda a amizade e incentivo que recebo de vocês. Agradeço às amigadas que ultrapassaram o limite da

graduação, especialmente Gabi, Keilla, Letícia, Manu e Ester. Agradeço aos “zoolabers”.

Aos colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular, que se tornaram meus amigos na vida. Agradeço ao Vinícius, por me apresentar a rotina no laboratório, pela companhia nas primeiras coletas e por se tornar uma das pessoas mais incríveis que eu conheci em Viçosa. Agradeço ao Maurício, meu irmão da pós (de outro programa), por todos os momentos em que aprendemos juntos e nos ajudamos, seja em assuntos acadêmicos ou na vida. Agradeço à Camila, pela parceria e amizade, e por mostrar o quanto o profissionalismo é importante no meio acadêmico. Agradeço ao Paulo, pelas dicas profissionais (à sua maneira). Agradeço ao Henrique, pelos incentivos na carreira profissional, seja na academia ou na educação, e pelos conselhos, que me foram e são de grande valor. Agradeço à Maura, por todo apoio e ajuda às pesquisas, e por todas os momentos de descontração que nossas conversas têm. Agradeço ao Dayvson, por ter se sido um grande parceiro e amigo, sempre me motivar e dar dicas de como me tornar um profissional (e marombeiro) melhor. Agradeço à Ana, por sempre se fazer presente, me apoiar sempre e pelas conversas sem sentido que deixavam o dia mais alegre.

Aos amigos que fiz em Viçosa, por todo o suporte que me deram nesta estadia longe de casa. Agradeço aos “viçosos” Samuel, Douglas, Alex, Vanessa e Mateus, que foram a minha família nesta cidade, me proporcionando momentos históricos e apoio emocional, amo vocês. Agradeço à Ane, à Ana Cris, e à Maísa, por toda a amizade e conversas jogadas fora, que com certeza não foram nenhum desperdício de tempo.

Ao Grupo de Estudos em Entomologia Insectum, por contribuir de forma excepcional para a minha formação como pessoa e como profissional. Agradeço a todos os integrantes que passaram comigo pelo Insectum, especialmente Gabi, Laís, Jéssica e Vinícius.

*“Eu não quero acreditar, eu quero saber”.*  
(Carl Sagan)

## RESUMO

NASCIMENTO, Francisco Witallo Sousa do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Morfologia do sistema reprodutor masculino e espermatozoides de *Discodon minutum* Pic, 1928 (Coleoptera: Cantharidae).** Orientador: José Lino-Neto. Coorientadora: Glenda Samara Dias Santos.

Cantharidae é uma família bastante diversa de besouros conhecidos como besouros-soldados. Classificada na superfamília Elateroidea e infraordem Elateriformia, possui representantes nos mais diversos ambientes terrestres. Dentro da família existem problemas de delimitação taxonômica em nível de espécie, gênero e subfamília. A morfologia do sistema reprodutor e dos espermatozoides traz informações com valor taxonômico e revelam aspectos da biologia reprodutiva. No entanto, tais características morfológicas são pouco conhecidas nos Cantharidae. Desta forma, descrevemos a morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides do cantarídeo *Discodon minutum* Pic, 1928. Os machos foram dissecados e seus sistemas reprodutores foram fixados e processados para microscopia de luz, a partir dos quais fez-se lâminas histológicas e lâminas com espermatozoides, para a posterior análise. O sistema reprodutor de *D. minutum* é formado por dois testículos, cada um com 28-30 folículos ovalados, dois vasos deferentes e três pares de glândulas acessórias, assim como um ducto ejaculatório com a porção mediana funcionando como uma bomba ejaculatória. Possui ainda duas vesículas seminais atípicas formadas por evaginações na base dos vasos deferentes, com função de armazenamento de espermatozoides e de secreção. Os espermatozoides estão completamente desenvolvidos já nos folículos, e possuem núcleo lateral aos elementos do flagelo, configuração semelhante a observada em outros elateroideos. As células císticas são bem desenvolvidas e podem desempenhar um papel na formação e manutenção dos feixes espermáticos do tipo espermatodesmata.

Palavras-chave: Anatomia. Besouro-soldado. Reprodução. Taxonomia. Elateriformia.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Francisco Witallo Sousa do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Morphology of the male reproductive system and spermatozoa of *Discodon minutum* Pic, 1928 (Coleoptera: Cantharidae)**. Advisor: José Lino-Neto. Co-advisor: Glenda Samara Dias Santos.

Cantharidae is a very diverse family of beetles known as soldier beetles. Classified in the superfamily Elateroidea and infraorder Elateriformia, it has representatives in the most diverse terrestrial environments. Within the family, there are problems of taxonomic delimitation at the species, genus, and subfamily levels. The morphology of the reproductive system and spermatozoa provides information with taxonomic value and reveals aspects of reproductive biology. However, such morphological characteristics are little known in Cantharidae. Thus, we describe the morphology of the male reproductive system and spermatozoa of the cantharide *Discodon minutum* Pic, 1928. The males were dissected, and their reproductive systems were fixed and processed for light microscopy, from which histological slides and slides with spermatozoa were made for later analysis. The reproductive system of *D. minutum* consists of two testes, each with 28-30 oval follicles, two vasa deferentia and three pairs of accessory glands, as well as an ejaculatory duct with the median portion functioning as an ejaculatory pump. It also has two atypical seminal vesicles formed by evaginations at the base of the vas deferens, with the function of storing sperm and secretion. The sperm are fully developed in the follicles and have a nucleus lateral to the flagellar elements, like that observed in other elateroids. The cyst cells are well-developed and may play a role in the formation and maintenance of spermatodesmata-type sperm bundles.

Keywords: Anatomy. Soldier beetle. Reproduction. Taxonomy. Elateriformia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime macho de <i>Discodon minutum</i> Pic, 1928. ....	17
Figura 2. Sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> .....	21
Figura 3. Esquema do sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> .....	22
Figura 4. Sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> . ....	23
Figura 5. Histologia dos testículos, vasos eferentes e vasos deferentes de <i>D. minutum</i> .....	24
Figura 6. Histologia dos vasos deferentes e vesículas seminais de <i>D. minutum</i> . ....	25
Figura 7. Histologia das glândulas acessórias de <i>D. minutum</i> . ....	29
Figura 8. Junções dos vasos deferentes, das vesículas seminais e das glândulas acessórias com o ducto ejaculatório de <i>D. minutum</i> . ....	31
Figura 9. Espermatozoides e feixe espermático de <i>D. minutum</i> ... ..	31

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Características gerais e sistemática Cantharidae, Elateriformia e Elateroidea ..	11
1.2. Ecologia e comportamento de Cantharidae .....	12
1.3. Sistema reprodutor masculino de Elateriformia .....	13
1.4. Morfologia espermática de Coleoptera .....	14
2. OBJETIVOS .....	15
2.1. Objetivo geral .....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Coleta e identificação dos espécimes de <i>D. minutum</i> .....	16
3.2. Fotodocumentação dos espécimes de <i>D. minutum</i> .....	16
3.3. Dissecção, fotografia e esquematização do sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> .....	17
3.4. Suspensão e morfometria dos espermatozoides de <i>D. minutum</i> .....	17
3.5. Processamento e descrição histológica de luz do sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> .....	18
4. RESULTADOS .....	19
4.1. Descrição anatômica do sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> .....	19
4.2. Descrição histológica do sistema reprodutor masculino de <i>D. minutum</i> .....	20
4.3. Morfologia dos espermatozoides de <i>D. minutum</i> .....	30
5. DISCUSSÃO .....	33
6. CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Características gerais e sistemática Cantharidae, Elateriformia e Elateroidea

Cantharidae Imhoff, 1856 é uma família de coleópteros pertencente à subordem Polyphaga, infraordem Elateriformia e superfamília Elateroidea. Seus integrantes são conhecidos popularmente como besouros-soldados (do inglês, *soldier beetles*) ou cantarídeos. Esses besouros somam mais de 6000 espécies descritas (Kazantsev & Brancucci, 2007), sendo a segunda maior família de Elateroidea, atrás apenas de Elateridae (Bouchard *et al.*, 2011).

Os besouros da infraordem Elateriformia são distinguidos principalmente por características dos estágios larvais. Beutel (1995) destaca a presença de uma sutura epicraniana transversal, um processo antenal curto e largo, uma projeção ventral no protórax e uma projeção dorsal no mesotórax e a ausência de um processo frontal na cabeça. A posição de Elateriformia dentro de Polyphaga ainda não está totalmente elucidada, porém análises recentes consideram-na uma das primeiras infraordens a se divergir entre os Polyphaga (Bocak *et al.*, 2014; Beutel *et al.*, 2019). Estudos recentes destacam fortemente a sua composição em pelo menos quatro superfamílias: Buprestoidea, Dascilloidea, Byrrhoidea e Elateroidea (Zhang *et al.*, 2018; Beutel *et al.*, 2019). Há discussões acerca da inclusão de uma quinta superfamília, Scirtoidea, que parece ser parafilética (Beutel *et al.*, 2019). Historicamente, havia também a superfamília Cantharoidea, cujas famílias foram incorporadas em Elateroidea nos estudos filogenéticos recentes (Beutel *et al.*, 2019). A monofilia de Elateroidea é sustentada por caracteres morfológicos de adultos e larvas (Lawrence & Newton, 1982; Lawrence, 1988; Lawrence *et al.*, 2010).

Elateroidea possui 16 famílias extantes (Lawrence *et al.*, 2010; Bouchard *et al.*, 2011; 2020) e cerca de 25 mil espécies descritas (Slipinski *et al.*, 2011). Os besouros elateroideos apresentam uma região de ancoragem que conecta a placa esternal à coxa do terceiro par de pernas, o que torna esses besouros capazes de pular quando se sentem ameaçados ou quando estão se movendo em substratos acidentados (Kundrata *et al.*, 2019). Os Elateroidea possuem antenas de serrilhadas à filiformes, corpo alongado e exoesqueleto pouco esclerotizado (Kundrata *et al.*, 2014). Além disso, têm antepifaringe e pré-lábio adjacentes e repleto de

microtríquios inframandibulares, características compartilhadas com Dascilloidea e que deve estar associada a hábitos alimentares, como ingestão de líquidos e digestão extraoral (Anton & Beutel, 2012). Características como neotenia, principalmente em fêmeas, e bioluminescência são importantes dentro de Elateroidea, porém ausente em algumas famílias, como Cantharidae (Kundrata *et al.*, 2014).

Das famílias de Elateroidea, Lampyridae e Elateridae têm sido apontadas como próximas de Cantharidae, no entanto, as relações filogenéticas dentro da superfamília não são totalmente compreendidas (Bocak *et al.*, 2014; Kundrata *et al.*, 2014; 2019; Douglas *et al.*, 2021), de forma que há muitas confusões entre um estudo filogenético e outro (Motyka *et al.*, 2023).

Distintamente de outras famílias de Elateroidea, Cantharidae apresenta a cabeça não recoberta pelo pronoto, sendo visível dorsalmente. Suas antenas possuem 11 antenômeros, geralmente filiformes, porém há espécies em que são serreadas, pectinadas ou flabeladas (Ramsdale, 2002; 2010). Cabeça normalmente prognata e aparelho bucal com labro membranoso coberto pelo clipeo (Ramsdale, 2002; Evans, 2021). Outras características são: coxa mesotorácica contígua, ventritos em sete (fêmeas) ou oito (machos), fórmula tarsal 5-5-5 e presença de poros de glândulas laterais pares nos segmentos abdominais I a VIII (Ramsdale, 2002; 2010; Evans, 2021).

Cantharidae possui cerca de 5500 espécies descritas (Delkeskamp, 1977; Bocak *et al.*, 2014), e é dividida em cinco subfamílias: Chauliognathinae LeConte, 1861, Silinae Mulsant, 1862, Malthininae Kiesenwetter, 1852, Dymorphocerinae Brancucci, 1980 e Cantharinae Thomson, 1864, todas com representantes descritos para o Brasil. Destas, as mais especiosas no país são Chauliognathinae e Silinae, e a menos é Malthininae (Biffi, 2023a; b). Esta última é também a mais restrita geograficamente no país, cujos representantes são encontrados basicamente na região Sul (Ramsdale, 2002). As relações filogenéticas entre as subfamílias não estão definidas, havendo propostas divergentes (Motyka *et al.*, 2023).

## **1.2. Ecologia e comportamento de Cantharidae**

Os besouros-soldados possuem hábitos alimentares que vão de herbivoria à carnivorina, sendo mais comum que quando adultos sejam onívoros.

Frequentemente, os adultos são encontrados em folhas e flores, sobre as quais forrageiam, alimentando-se de pólen, néctar ou de outros insetos. Os cantarídeos são, portanto, polinizadores e até controladores de pragas (Evans, 2021). Além disso, os adultos costumam exibir cores aposemáticas, o que evita, muitas vezes, que sejam predados (Fender, 1973; Fitton, 1973; Ramsdale, 2002; 2010; Evans, 2021). As larvas, em geral, vivem no solo, na serrapilheira, onde se alimentam de fluidos de ovos e larvas de outros artrópodes (Fitton, 1973; Ramsdale, 2002), além de raízes, a depender da espécie (Evans, 2021).

Representantes de Cantharidae são encontrados em todas as zonas biogeográficas do planeta, excetuando-se a antártica (Ramsdale, 2010). Apesar disso, quase todo conhecimento que temos sobre essa família é oriundo de espécies de regiões temperadas (Pérez-Hernández, 2018).

### **1.3. Sistema reprodutor masculino de Elateriformia**

A genitália externa dos Cantharidae, principalmente de machos, vem sendo considerada importante do ponto de vista taxonômico (Wittmer, 1977; Biffi, 2017; Biffi *et al.*, 2022; Biffi, 2023b), assim como em outros táxons de insetos. Trabalhos recentes sobre a taxonomia dessa família procuraram delimitar os gêneros e espécies através da redescrição das genitálias externas (Biffi, 2017; Biffi & Geisner, 2022). Entretanto, muitas dessas categorizações baseadas na morfologia externa se mostram insuficientes para resolver os problemas taxonômicos que as espécies de besouros-soldados enfrentam. Outras pesquisas, no entanto, têm trazido a morfologia dos órgãos reprodutores internos como caracteres adicionais para a elucidação das relações filogenéticas entre vários táxons de insetos, incluindo Elateroidea (Lino-Neto *et al.*, 2000; Dallai, 2014; Dallai *et al.*, 2016).

Morfologicamente, o sistema reprodutor dos insetos machos, de modo geral, possui um par de testículos, cada qual formado por folículos, suas unidades funcionais, onde são produzidos os espermatozoides. De cada testículo parte um vaso deferente, que pode apresentar uma região dilatada onde os espermatozoides ficam armazenados, chamadas de vesículas seminais. Os vasos deferentes então se unem ao ducto ejaculatório, canal conectado ao edeago, pelo qual os espermatozoides são transferidos para a fêmea. Há ainda glândulas acessórias,

geralmente em pares, que liberam secreções que compõem o fluido seminal (Triplehorn & Johnson, 2005; Gullan & Cranston, 2017; Klowden & Palli, 2023).

Entre os diversos clados de insetos, há variações na estrutura morfológica e anatômica dos sistemas reprodutores (Crowson, 1981; Gullan & Cranston, 2017; Klowden & Palli, 2023). Essas diferenças denunciam a história evolutiva dos táxons e, portanto, pode auxiliar na caracterização das ordens e categorias taxonômicas infraordinárias (Kuznetsova, 2019). Essas diferenças são, principalmente, em relação à quantidade, formato e disposição dos folículos testiculares, vesículas seminais e glândulas acessórias (Crowson, 1981; Kaulenas, 1992; Gullan & Cranston, 2017).

Ainda há poucos estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino em Elateriformia. Kasap & Crowson (1975) trazem uma breve descrição sobre os órgãos reprodutivos internos de Byrrhoidea, Buprestoidea e Elateroidea (considerando algumas de suas famílias como “Cantharoidea”, segundo o senso da época), principalmente, baseados nos dados escassos sobre esses táxons. Os testículos de elateriformes geralmente são livres, formados cada um por folículos de número variável, de um a 150. As glândulas são aos pares, de um a três, e cada par é apresentado sob diferentes denominações na literatura, sendo normatizado por Kasap & Crowson (1975), que as dividiu em glândulas acessórias e glândulas espermatóforas, definindo-as preferivelmente por meio de homologias; o seu uso, porém, não é comum.

#### **1.4. Morfologia espermática de Coleoptera**

Embora seja conhecida a importância taxonômica dos caracteres morfológicos dos espermatozoides em hexápodes (Baccetti & Daccordi, 1988; Burrini *et al.*, 1988; Dallai, 2014; Dallai *et al.*, 2016), há poucos trabalhos sobre morfologia espermática em Elateroidea e nenhum em Cantharidae.

Espermatozoides típicos de insetos Pterygota possuem formato filiforme e são divididos em cabeça anterior (acrossomo e núcleo), flagelo posterior (axonema com 9-9-2 microtúbulos, um par de derivados mitocondriais e um par de corpos acessórios) e uma região intermediária, onde em geral ocorre uma estrutura denominada adjunto de centríolo (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Em Coleoptera, a morfologia espermática é bastante variável, fugindo em muitos grupos

da morfologia convencional (Dias *et al.*, 2020b). Coccinellidae (Dallai *et al.*, 2018; 2019b; Dias *et al.*, 2020a) e Carabidae (Dallai *et al.*, 2019a, 2020), por exemplo, apresentam núcleo disposto paralelamente aos componentes do flagelo, assim como observado para espécies de Buprestidae, Elateridae e Lampyridae (Elateriformia) por Dias *et al.* (2020b).

A espermatogênese em Elateroidea e em outras superfamílias de Elateriformia possui informação escassa na literatura. Em *Selatosomus aeripennis destructor* (Elateridae) (Zacharuk, 1958a) e em *Pyrocoelia tonkinensis* Olivier, 1886 (Lampyridae) (Senarat *et al.*, 2019) foram observadas todas as etapas da espermatogênese nos folículos testiculares dos indivíduos adultos, de espermatogônias a espermatozoides maduros. Algumas pesquisas citam o formato alongado e filiforme dos espermatozoides de elateroideos (Zacharuk, 1958a; Senarat *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020b).

Quase não há menções na literatura sobre a organização dos espermatozoides e transferência espermática em Elateroidea. Os achados são basicamente de Lampyridae (Wing, 1985; van der Reijden *et al.*, 1997; Hayashi & Suzuki, 2003; Fu & Ballantyne, 2021). Alguns estudos, como o de Hayashi & Suzuki (2003) e o de Fu & Ballantyne (2021), trazem informações sobre a transferência de espermatozoides em Lampyridae por meio de espermatóforos. Entretanto, Hayashi & Suzuki (2003) destacam que nem todos os lampirídeos apresentam esse tipo de organização espermática.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Descrever morfologicamente o sistema reprodutor masculino e os espermatozoides de *Discodon minutum* Pic, 1928 (Cantharidae: Silinae).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Descrever a anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino de *Discodon minutum*;

- Descrever a morfologia dos espermatozoides em *D. minutum*;
- Comparar padrões morfológicos do sistema reprodutor e dos espermatozoides de *D. minutum* com táxons proximamente relacionados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta e identificação dos espécimes de *D. minutum***

Os espécimes de *D. minutum* (Fig. 1) foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na vegetação associada a plantações de milho (*Zea mays* L.), no Vale da Agronomia (20°46'01"S 42°52'06"W, 668 m). As coletas ocorreram durante o dia, em todas as épocas do ano, por busca ativa, utilizando sugadores e redes entomológicas. Para a manutenção e transporte dos espécimes foram usados frascos com entrada de ar, o que permite que os insetos permanecessem vivos.

Os besouros coletados foram levados ao Laboratório de Ultraestrutura Celular, Departamento de Biologia Geral (DBG/UFV), onde os espécimes foram anestesiados com dióxido de carbono, triados e identificados (espécie, sexo, local e data da coleta).

A identificação da espécie foi confirmada pelo pesquisador dr. Gabriel Biffi (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, MZUSP/USP), taxonomista da família Cantharidae.

#### **3.2. Fotodocumentação dos espécimes de *D. minutum***

Alguns espécimes foram colocados em uma pequena cubeta com fundo cinza e álcool 70% em gel. As imagens e medidas foram obtidas usando um microscópio estereoscópico Leica M205c, com câmera digital Leica MC170HD acoplada.



Figura 1. Espécime macho de *Discodon minutum* Pic, 1928. Fonte: Autor (2023).

### **3.3. Dissecção, fotografia e esquematização do sistema reprodutor masculino de *D. minutum***

Para a descrição morfológica do sistema reprodutor masculino, os machos adultos foram dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópico Olympus SZH10, em solução-tampão de fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,2 (PBS). O sistema reprodutor foi, então, separado e fixado em solução de glutaraldeído a 2,5% no mesmo tampão por um período de 4 h.

Em seguida, o sistema reprodutor foi fotografado com o auxílio de um microscópio estereoscópico Leica M205c com câmera digital Leica MC170HD acoplada ou com o microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 2000-C, com uma câmera digital Nikon D5100 acoplada e iluminação acessória. Os esquemas foram feitos por meio de programa de ilustração vetorial.

### **3.4. Suspensão e morfometria dos espermatozoides de *D. minutum***

Os espermatozoides foram obtidos a partir dos folículos testiculares e vesículas seminais, dissociados em PBS, sobre lâminas histológicas. Após a secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com água corrente e algumas delas foram coradas com uma solução filtrada de Giemsa em água destilada (1:5),

por 30 minutos, lavadas novamente em água corrente e secadas à temperatura ambiente. Para observar os núcleos das células, outras lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (4,6-diamino-2-fenil-indol) 0,2 mg/mL no tampão PBS durante 40 min e lavadas em água corrente. Em seguida, elas foram cobertas com lamínulas usando uma solução aquosa de sacarose a 50% e acondicionadas em caixas fechadas para impedir a exposição à luz.

Para fotodocumentação e análise dessas lâminas, foi utilizado um microscópio de luz Olympus BX60, com câmera digital Q-Color3 acoplada filtro de excitação BP 360-370 nm.

As medições foram realizadas por meio do programa *ImageJ*, versão 1.53<sup>o</sup> (<https://imagej.nih.gov/ij/>) a partir das imagens obtidas.

### **3.5. Processamento e descrição histológica de luz do sistema reprodutor masculino de *D. minutum***

Os sistemas reprodutores masculinos fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em PBS contendo 3% de sacarose foram preparados para a análise histológica em microscopia de luz. O material foi lavado em água destilada para o processamento: o que seria corado com Giemsa foi pós-fixado em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% por duas horas, enquanto o que seria corado com DAPI não. Na etapa seguinte, todos os sistemas foram desidratados gradualmente, em uma série de banhos alcoólicos crescentes (30%, 50%, 70%, 90%), seguidos por três banhos em álcool absoluto (100%), 10 minutos cada. O material foi infiltrado com Histoiresina (Leica) (base + ativador) em álcool (1:2, 1:1 e 2:1), e, então, com Histoiresina pura. Na sequência, o material foi incluído em moldes contendo uma mistura de Histoiresina com catalisador e então transferidos para uma estufa a 60° C, onde permaneceram por algumas horas até a completa polimerização da resina.

A seguir, foram feitos cortes semifinos, com espessuras entre 0,5 µm e 1,5 µm, com um micrótomo Leica RM 2155 e navalhas de vidro, e foram colocados em lâminas histológicas. As lâminas com material pós-fixado em OsO<sub>4</sub> foram coradas com solução de Giemsa diluído em água destilada (3:15), durante 30 minutos, e lavados em água corrente. As lâminas com material que não foi pós-fixado em OsO<sub>4</sub> foram coradas em DAPI durante 40 min, na ausência de luz, para a visualização dos núcleos dos espermatozoides.

As descrições morfológicas e os registros fotográficos do sistema reprodutor masculino de *D. minutum* foram feitos a partir das análises das lâminas histológicas permanentes, com o auxílio do microscópio Olympus BX60, com câmera digital Q-Color3 acoplada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Descrição anatômica do sistema reprodutor masculino de *D. minutum*

O sistema reprodutor masculino de *D. minutum* apresenta dois testículos livres entre si, um par de vasos deferentes, um par de vesículas seminais, três pares de glândulas acessórias e um ducto ejaculatório comum (Figs. 2A, 3A), que desemboca no meio externo por meio da genitália externa (edeago).

Os testículos são pequenos, medindo aproximadamente 316–390  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Cada um é composto por 28 a 30 folículos (Fig. 4A), ovalados e ligeiramente translúcidos. Envolvendo cada testículo, há, externamente, uma camada de corpo gorduroso de coloração alaranjada (Fig. 2A), e, internamente, uma cápsula de tecido conjuntivo (bainha peritoneal) (Fig. 5A, C). Os folículos testiculares se arranjam em forma de cacho em torno da porção anterior do vaso deferente, onde desembocam por meio de curtos vasos eferentes (Fig. 5A-B).

Os vasos deferentes são translúcidos, delgados, ligeiramente sinuosos e longos. Em toda sua extensão, os vasos deferentes mantêm seu formato tubular, não havendo variações em sua espessura (Fig. 2A, 3A). Na porção posterior de cada vaso deferente, há uma camada muscular que envolve a conexão entre ele e a vesícula seminal correspondente (Fig. 8C-D). As vesículas seminais (Fig. 2B, 3A-B; 4B-C) são translúcidas, têm formato tubular, com sua porção distal ligeiramente abaulada, onde ficam armazenados os espermatozoides. Elas emergem lateralmente na base dos vasos deferentes (Fig. 3A). Em toda sua extensão, há corpo gorduroso alaranjado as envolvendo (Fig. 2A-C). Paralelamente a cada vesícula seminal, há a primeira glândula acessória (tipo 1, g1), de formato espiralado, curta, de coloração dourada quase translúcida (Fig. 2A-C, 3A-B).

Dois outros pares de glândulas acessórias estão conectados ao ápice do ducto ejaculatório, na região envolvida pela camada muscular, na mesma altura em que os vasos deferentes e as vesículas seminais desembocam. As glândulas

acessórias do segundo par (tipo 2, g2) também são espiraladas, mas diferem-se das glândulas acessórias tipo 1 por serem mais espessas e por darem menos voltas, além de possuírem aspecto amarelado translúcido semelhante à dos folículos testiculares (Fig. 2A-B, 3A). Elas se localizam ventralmente, e sua extremidade proximal conecta-se ao ducto ejaculatório na mesma altura que as outras estruturas, porém ventro-medialmente. As glândulas acessórias que formam o terceiro par (tipo 3, g3) são reniformes, localizadas ventralmente e posicionadas juntas na região anterior do ducto ejaculatório (Fig. 2A-C, 3A). Elas são translúcidas, com uma parede mais espessa que as demais glândulas acessórias. Cada glândula acessória tipo 3 forma, nas suas porções mediano-anteriores, um curto canal que desemboca na extremidade proximal da glândula do tipo 2 correspondente, antes da chegada desta ao ducto ejaculatório.

O ducto ejaculatório é comprido, amarelo pálido, reto nas porções anterior e posterior. A sua porção média é espiralada e mais espessa, formando uma bomba ejaculatória (Fig. 2A, 3A).

#### **4.2. Descrição histológica do sistema reprodutor masculino de *D. minutum***

Cortes histológicos dos testículos dos indivíduos adultos mostraram folículos preenchidos por cistos já bem desenvolvidos (Fig. 5A-C), de modo que foram observados apenas espermátides em fase final de alongamento e espermatozoides maduros (Fig. 5A-C). Entre os cistos foram observados resíduos citoplasmáticos decorrentes da diferenciação dos espermatozoides e da morte celular de células císticas (Fig. 5C). Há uma bainha peritoneal, de tecido conjuntivo, e uma fina camada epitelial, que delimitam cada folículo (Fig. 5C).

As células císticas são grandes, com conteúdo citoplasmático volumoso, grandes vesículas (Fig. 5B) e núcleo bem evidente com cromatina predominantemente descondensada (Fig. 9A). No interior dos cistos, os espermatozoides começam a se organizar em feixe (Fig. 5A-B, 9A-B), e, à medida em que os cistos se aproximam da base do folículo, os feixes se reorganizam, dobrando sobre si em forma de rolo (Fig. 5B, 9A). Na região basal dos folículos, os cistos se rompem, tornando livres os feixes espermáticos, que chegam aos vasos eferentes e, então, aos vasos deferentes (Fig. 5A-C).

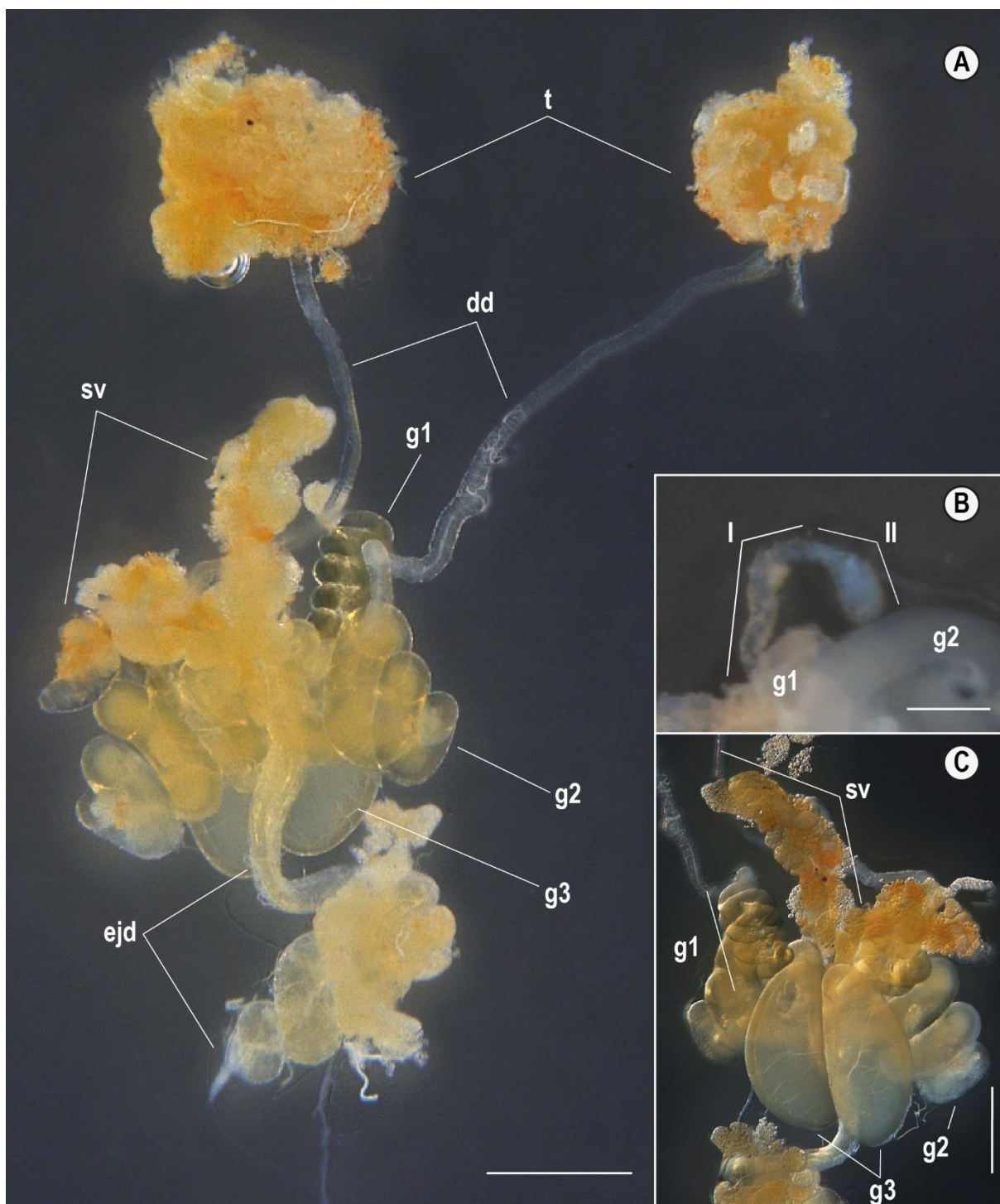


Figura 2. Sistema reprodutor masculino de *D. minutum*. A – Visão geral. B – Detalhe de uma vesícula seminal, mostrando as regiões secretora (I) e de armazenamento (II). C – Detalhe das glândulas acessórias. Legenda: *t*, testículo; *dd*, vaso deferente; *sv*, vesícula seminal; *g1*, *g2* e *g3*, primeiro, segundo e terceiro pares de glândulas acessórias, respectivamente; *ejd*, ducto ejaculatório. Barras de escala: A = 0,5 mm; B = 0,2 mm; C = 0,25 mm. Fonte: Autor (2023).

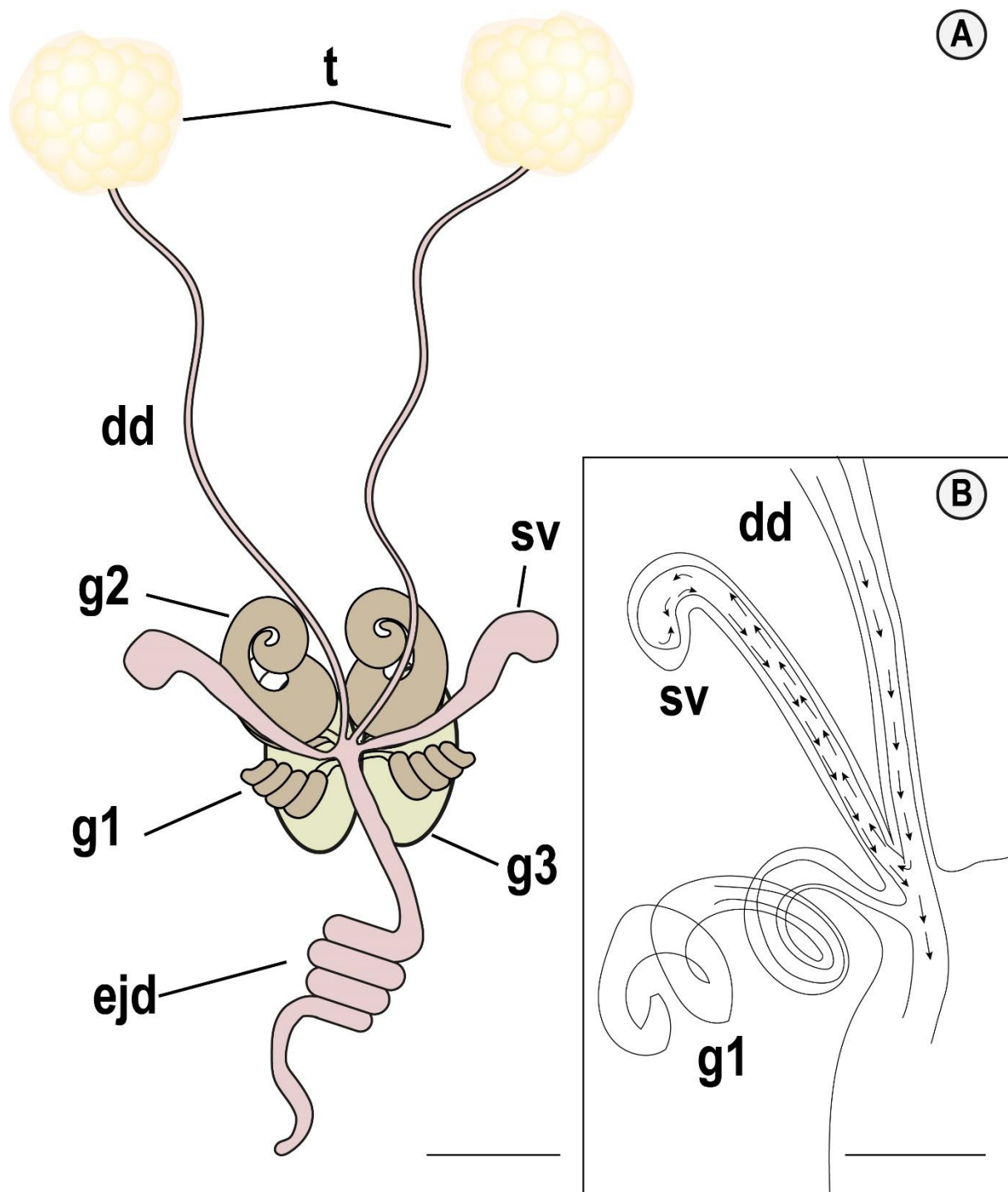


Figura 3. Esquemas do sistema reprodutor masculino de *D. minutum*. A – Visão geral. B – Caminho percorrido pelos feixes de espermatozoides (setas) dos vasos deferentes até as vesículas seminais. Legenda: *t*, testículo; *dd*, vaso deferente; *sv*, vesícula seminal; *g1*, *g2* e *g3*, primeiro, segundo e terceiro pares de glândulas acessórias, respectivamente; *ejd*, ducto ejaculatório. Barras de escala: A = 0,5 mm; B = 0,25 mm. Fonte: Autor (2023).

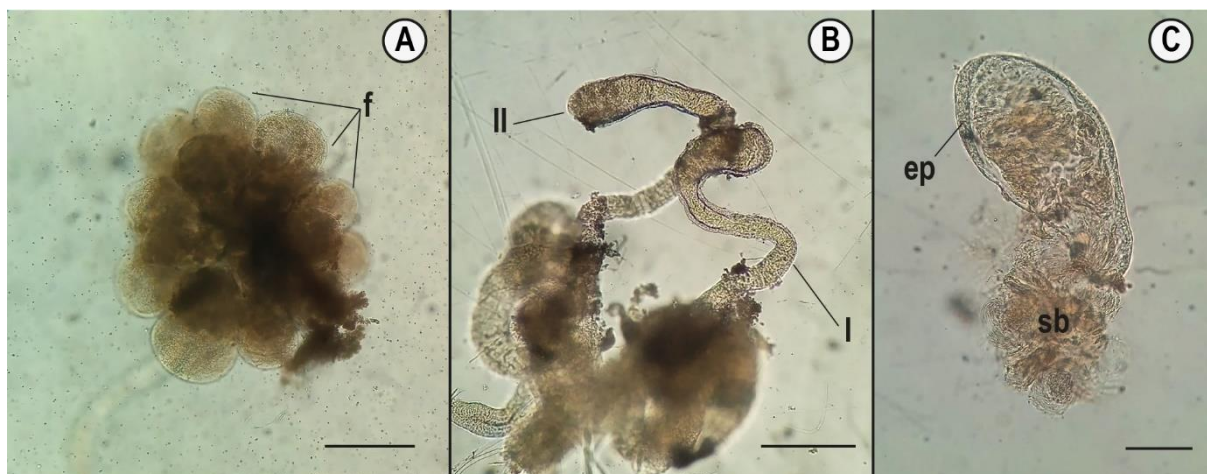


Figura 4. Sistema reprodutor masculino de *D. minutum*. A – Um testículo, mostrando a forma e organização dos folículos (f). B – Detalhe do par de vesículas seminais, indicando a região secretora (I) e a região de armazenamento (II), além das duas glândulas acessórias tipo 1 (g1). C – Detalhe da região de armazenamento de uma vesícula seminal, mostrando o epitélio (ep) e os feixes de espermatozoides (sb). Barras de escala = 0,1 mm. Fonte: Autor (2023).

Histologicamente, foi possível distinguir nos vasos deferentes pelo menos três porções: uma anterior, uma mediana e outra posterior. A porção anterior possui epitélio simples cúbico, com células de núcleo esférico e cromatina descondensada, além de vesículas secretoras grandes, localizadas principalmente no ápice delas (Fig. 6A). Nessa primeira porção, o epitélio é uma continuação daquele epitélio dos vasos eferentes (Fig. 5B-C). A segunda porção, mediana, também com epitélio simples cúbico, diferencia-se pelas células com vesículas secretoras menores e pelo surgimento de uma camada de tecido muscular ao seu redor (Fig. 6A-D). Nessas duas primeiras regiões dos vasos deferentes, assim como nos vasos eferentes, há projeções celulares aparentes (Fig. 5B, 6C). Por fim, a terceira porção é caracterizada pelo alongamento das células epiteliais, tornando-as mais altas do que espessas, sendo caracterizado como epitélio simples prismático (Fig. 6B-E). Nesta região, os núcleos são alongados e posicionados na base das células. A base das células dobra-se e forma labirintos basais (Fig. 6E). Ainda nessa porção, a camada muscular torna-se espessa e há maior associação de tecido gorduroso ao seu redor (Fig. 6B). O lúmen dos vasos deferentes é amplo, e é possível observar uma secreção homogênea, feixes espermáticos e restos celulares (Fig. 6A-B, D). Em todas as regiões dos vasos deferentes, as células epiteliais são funcionalmente merócrinas.

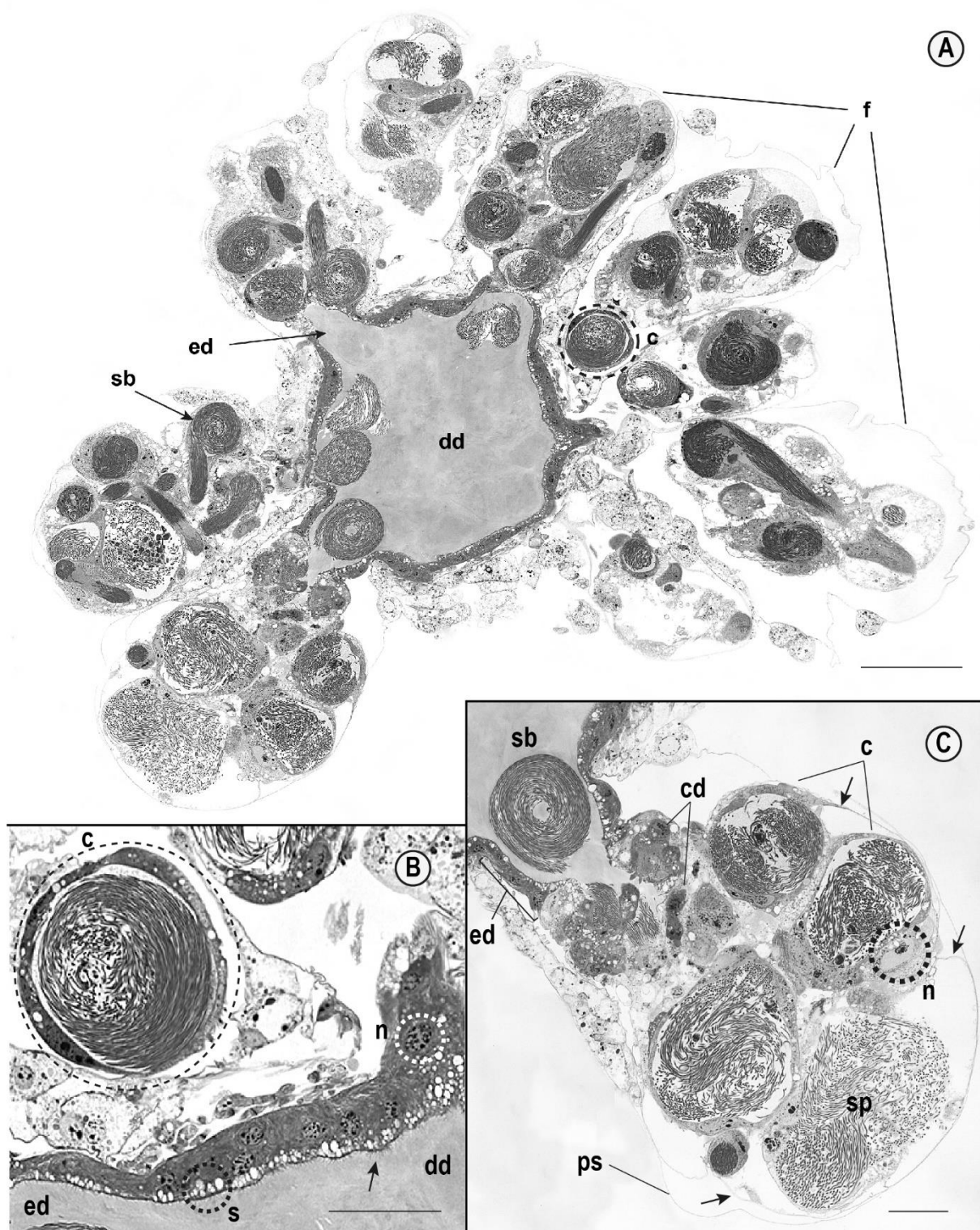


Figura 5. Histologia dos testículos, vasos eferentes e vasos deferentes de *D. minutum*. A – Corte transversal da porção mediana de um testículo, mostrando a conformação dos folículos (f) e como se inserem no vaso deferente. B – Detalhe de um cisto espermático testicular e do epitélio do vaso eferente e da primeira região do vaso deferente (a seta indica os estereocílios) das células epiteliais de revestimento do vaso deferente. C – Detalhe do folículo testicular, setas indicando o epitélio folicular. Legenda: f, folículo; ed, vaso eferente; sb, feixe espermático; dd, vaso deferente; c, cisto; n,

núcleo; s, vesícula de secreção; cd, restos celulares; ps, bainha peritoneal. Barras de escala: A = 50  $\mu\text{m}$ , B = 20  $\mu\text{m}$  e C = 25  $\mu\text{m}$ . Fonte: Autor (2023).

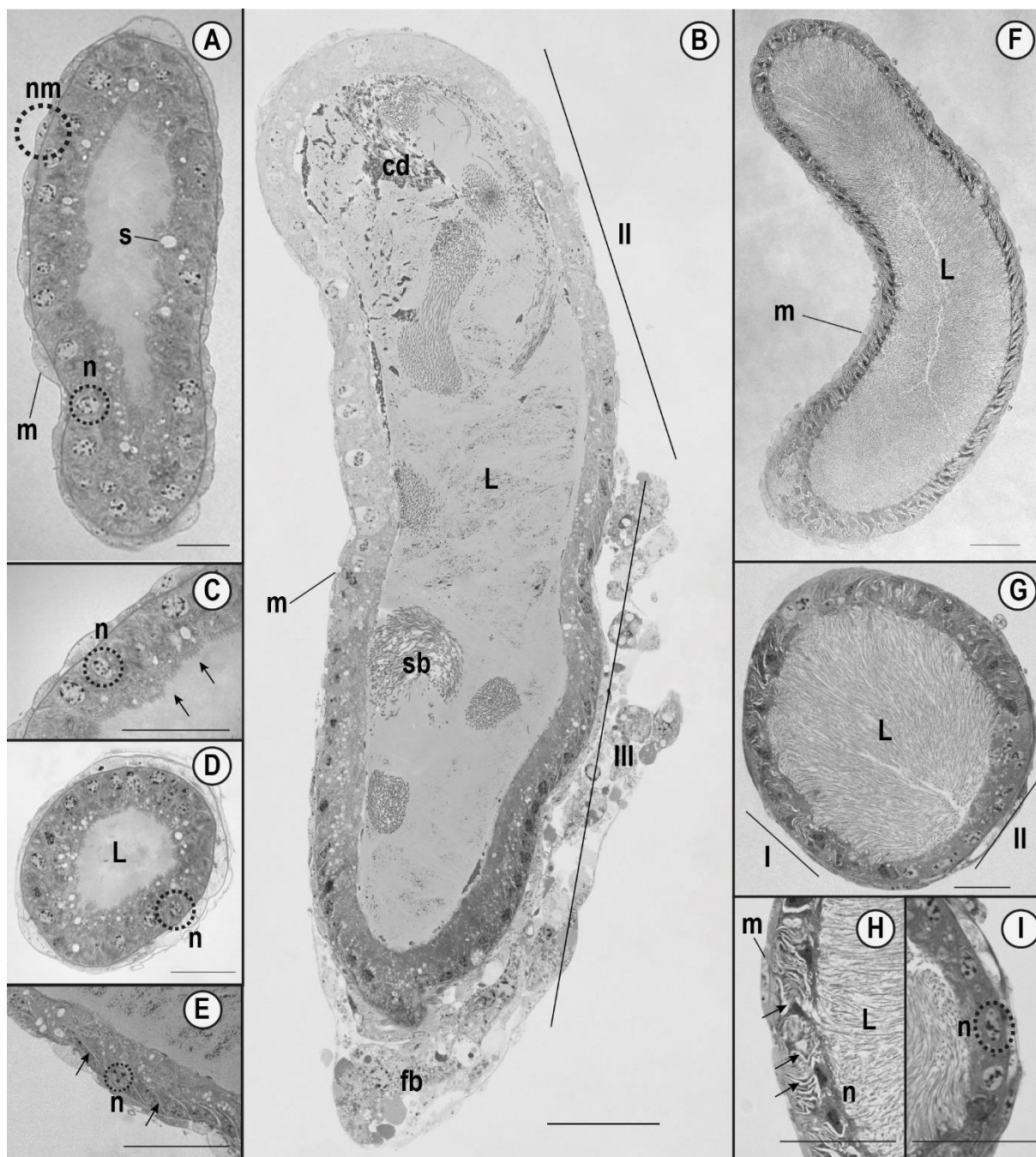


Figura 6. Histologia dos vasos deferentes e vesículas seminais de *D. minutum*. A – E: Vaso deferente. A – Corte longitudinal na porção anterior (porção I) do vaso deferente. B – Corte longitudinal na porção mediana (porção II) do vaso deferente, mostrando a transição do epitélio entre as porções mediana e posterior. C, D – Detalhes do epitélio da porção anterior do vaso deferente, evidenciando os estereocílios (setas). E – Detalhe do epitélio da porção posterior do vaso deferente, destacando os labirintos basais (setas). F – I: Vesícula seminal. F – Corte longitudinal da vesícula seminal na sua porção secretora (I). G – Corte transversal da vesícula seminal, evidenciando os dois tipos de células epiteliais. H – Detalhe do epitélio da porção proximal da vesícula seminal (I), destacando os labirintos

basais (setas). I – Detalhe do epitélio da região distal da vesícula seminal (II). Legenda: *nm*, núcleo de célula muscular; *s*, vesícula secretora; *n*, núcleo de célula epitelial; *L*, lúmen; *sb*, feixe espermático; *cd*, restos celulares; *fb*, corpo gorduroso. Barras de escala: A, D, G = 25  $\mu\text{m}$ ; B, F = 50  $\mu\text{m}$ ; C, E, H-I = 20  $\mu\text{m}$ . Fonte: Autor (2023).

As vesículas seminais possuem epitélio simples, mas com dois tipos celulares, perceptível em corte transversal (Fig. 6G). Na porção secretora (porção I), predominam células com numerosos labirintos basais (Fig. 6F-H). Elas são apócrinas e secretam substância filamentosa que se mistura aos feixes de espermatozoides nessa porção (Fig. 6F-H). Os núcleos são grandes, com cromatina descondensada bem-marcada. Células cúbicas, sem muita diferenciação em relação às células descritas anteriormente e pouco secretoras (Fig. 6G, I) são predominantes na porção de armazenamento (porção II) da vesícula seminal (Fig. 4C), onde os espermatozoides ficam armazenados, mas essas também podem ser encontradas na porção I, em menor número (Fig. 6G, 8D). Externamente, as vesículas seminais são envolvidas por uma camada de tecido muscular, que fica cada vez mais espessa à medida que se aproxima do encontro com os vasos deferentes (Fig. 8C-D).

O segundo par de glândulas acessórias (tipo 2) possui três regiões distintas de epitélio. A primeira (R1), encontrada principalmente na porção mais distal dessas glândulas, é formada por células altas, prismáticas, estreitas e com núcleos pequenos e esféricos, localizados na base das células (Fig. 7F, I). O citoplasma destas células possui muitas vesículas secretoras pequenas de conteúdo esbranquiçado, algumas vesículas maiores na porção apical delas e inclusões escuras (Fig. 7I). Uma outra região epitelial (R2) é formada por células em arranjo simples prismático, como a primeira, porém mais espessas e ligeiramente mais altas (Fig. 7F-H). Seus núcleos são maiores, posicionados geralmente no meio das células, e parecem estar com cromatina condensada (Fig. 7G-H). Estas células possuem grandes vacúolos com secreção clara. A terceira região (R3), presente apenas na porção proximal, após a junção com a glândula tipo 3, é do tipo pseudoestratificado (Fig. 7J). As células são colunares, muito altas e delgadas. Os núcleos estão em alturas diferentes, porém posicionados entre as regiões média e basal das células (Fig. 7J-K). Junto aos núcleos, há muitas vesículas secretoras de diferentes tamanhos, que vão diminuindo à medida que chegam ao ápice da célula.

O ápice tem forma de um longo “pescoço”, com uma aglutinação de vários grânulos bem-marcados no citoplasma (Fig. 7K). Todos os tipos celulares exibem secreção merócrina. Na porção proximal, no lúmen, há diferentes secreções: uma granular (s1), uma fluida homogênea formada por material fortemente corado com Giemsa (s2), uma fluida heterogênea um pouco mais clara (s3) e uma secreção fluida homogênea esbranquiçada (s4) (Fig. 7L). Na Figura 7F é possível ver que as secreções s1, s3 e s4 estão misturadas, sendo que s1 e s3 são secretadas pelo epitélio R1 e s4 é secretado pelo epitélio R2 (Fig. 7H). A secreção s2 é advinda das glândulas tipo 3. Em toda a extensão das glândulas tipo 2 há uma camada muscular, que é delgada na porção distal (Fig. 7G-H) e espessa na porção proximal (Fig. 7J-K).

As glândulas acessórias tipo 3 apresentam um epitélio simples prismático (Fig. 7 M-N), de células estreitas e altas, com núcleos localizados próximos a sua base. Há muitas vesículas secretoras pequenas espalhadas no citoplasma (Fig. 7N). A secreção é uniforme e fortemente corada com Giemsa (Fig. 7M). Na Figura 7M é mostrada a parte do conectivo que liga cada uma dessas glândulas à porção proximal das glândulas tipo 2 (descritas anteriormente) correspondentes, permitindo a passagem do conteúdo secretado pelas glândulas tipo 3. Assim, a porção proximal da glândula tipo 2 funciona como um canal comum para os conteúdos do segundo e terceiro pares de glândulas, desembocando dorsalmente no ducto ejaculatório (Fig. 8A). Há uma fina camada muscular que envolve externamente as glândulas tipo 3 (Fig. 7M-N).

Cada vesícula seminal desemboca no respectivo vaso deferente, fundindo-se numa região onde os músculos em volta formam um esfíncter (Fig. 8A, C-D), imediatamente antes de onde desemboca o ducto da glândula tipo 1 (Fig. 8A-C). Após a fusão dessas estruturas (Fig. 8D), inicia-se o ducto ejaculatório, coberto por uma camada muscular espessa (Fig. 8A-C). Sua primeira porção é continuação direta dos vasos deferentes, formado por dois canais, os ductos ejaculatórios laterais, não evidentes externamente, que logo se fundem em um ducto comum (Fig. 8A-C). Nesta primeira porção, o epitélio é simples prismático com células alongadas e o lúmen é estreito, revestido por uma cutícula íntima (Fig. 8B). Os núcleos das células são posicionados basalmente, enquanto as pequenas vesículas secretoras situam-se apicalmente (Fig. 8D, F). Em seguida à fusão dos ductos laterais, inicia-se a segunda porção do ducto ejaculatório (Fig. 8A, E). Nesta porção, o epitélio é do

tipo simples prismático (Fig. 8D-E, G) e forma muitas dobras (Fig. 8A, E). Suas células são altas, com núcleos alongados, cromatina geralmente descondensada e muitas vesículas secretoras na região apical. Na terceira porção do ducto ejaculatório o epitélio, que é semelhante à da segunda porção, não forma dobras, não aparenta ter muitas vesículas secretoras e seu lúmen é bastante estreito (Fig. 8F, H). Posteriormente, as camadas musculares ficam cada vez mais numerosas (Fig. 8H-I) na transição para a bomba ejaculatória. Nessa região, as células do epitélio se tornam mais baixas, delgadas e em arranjo irregular, além da cutícula ficar mais espessa (Fig. 8J). Os núcleos têm formato triangular e localizam-se apenas na base do epitélio. Externamente, os músculos formam várias camadas, tornando espessa a bomba ejaculatória (Fig. 8J).

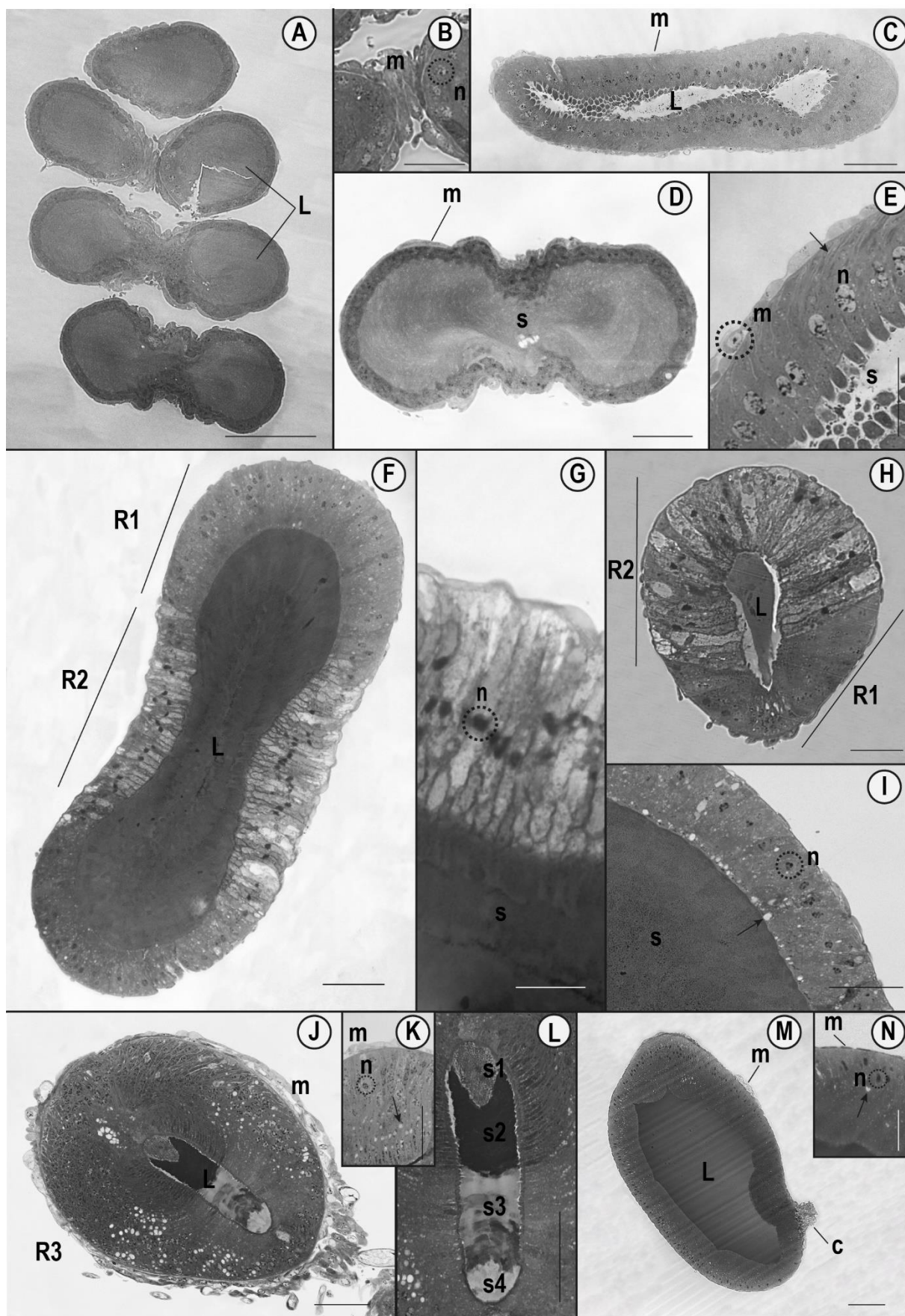


Figura 7. Histologia das glândulas acessórias de *D. minutum*. A – E: Glândulas tipo 1. A - Corte sagital da porção distal. B – Detalhe do epitélio e dos músculos que envolvem a porção distal. C –

Corte longitudinal da porção proximal. D – Corte transversal da porção distal, evidenciando sua secreção. E – Detalhe do epitélio da porção proximal, com a seta indicando os labirintos basais. F – L: Glândulas tipo 2. F – Corte longitudinal da região mediana, mostrando duas regiões epiteliais distintas (R1 e R2). G – Detalhe do epitélio R2. H – Corte transversal da região mediana. I – Detalhe do epitélio R1, com vesícula secretora indicada pela seta. J – Corte sagital da região proximal, mostrando o epitélio R3. K – Detalhe do epitélio R3, com a seta indicando vesículas secretoras. L – Lúmen da região proximal, evidenciando os diferentes tipos de secreção ali presentes. M – N: Glândulas tipo 3. M – Corte longitudinal mostrando o conectivo (c) que une as glândulas tipo 2 e tipo 3. N – Detalhe do epitélio, com a seta indicando vesícula secretora. Legenda: *n*, núcleo de célula epitelial; *L*, lúmen; *s*, secreção; *m*, músculo. Barras de escala: A, F, J, M = 50 µm; B-E, G-I, K-L, N = 20 µm. Fonte: Autor (2023).

### 4.3. Morfologia dos espermatozoides de *D. minutum*

Os espermatozoides de *D. minutum* são filiformes, alongados (~240 µm de comprimento) e com as extremidades afiladas (Fig. 9C). Anteriormente, há o acrossomo, que aparenta ser lateral ao núcleo a partir de certo ponto (Fig. 9D). O núcleo segue até a extremidade posterior da célula paralelamente aos componentes do flagelo (Fig. 9E-H). Ele fica corado mais intensamente em DAPI na porção mediana do espermatozoide, porém, na porção posterior, é menos marcado, evidenciando o afinamento dessa estrutura e a presença de componentes do flagelo laterais a ele. Em alguns espermatozoides a membrana se rompeu, desassociando o núcleo e os elementos flagelares (Fig. 9E-H).

Os espermatozoides se organizam em feixes espiralados (Fig. 5B-C, 9B), desde a base dos folículos até os vasos deferentes. Cada espermatozoide forma uma dobra anteriormente (Fig. 9G), que auxilia na estabilização dos feixes mesmo após sua saída dos folículos (Fig. 9F). O número de espermatozoides por feixe é até 512 ( $2^9$ ), indicando que, durante a espermatogênese, as células germinativas passam por sete ciclos mitóticos e dois meióticos em cada cisto para diferenciação em espermatozoides.

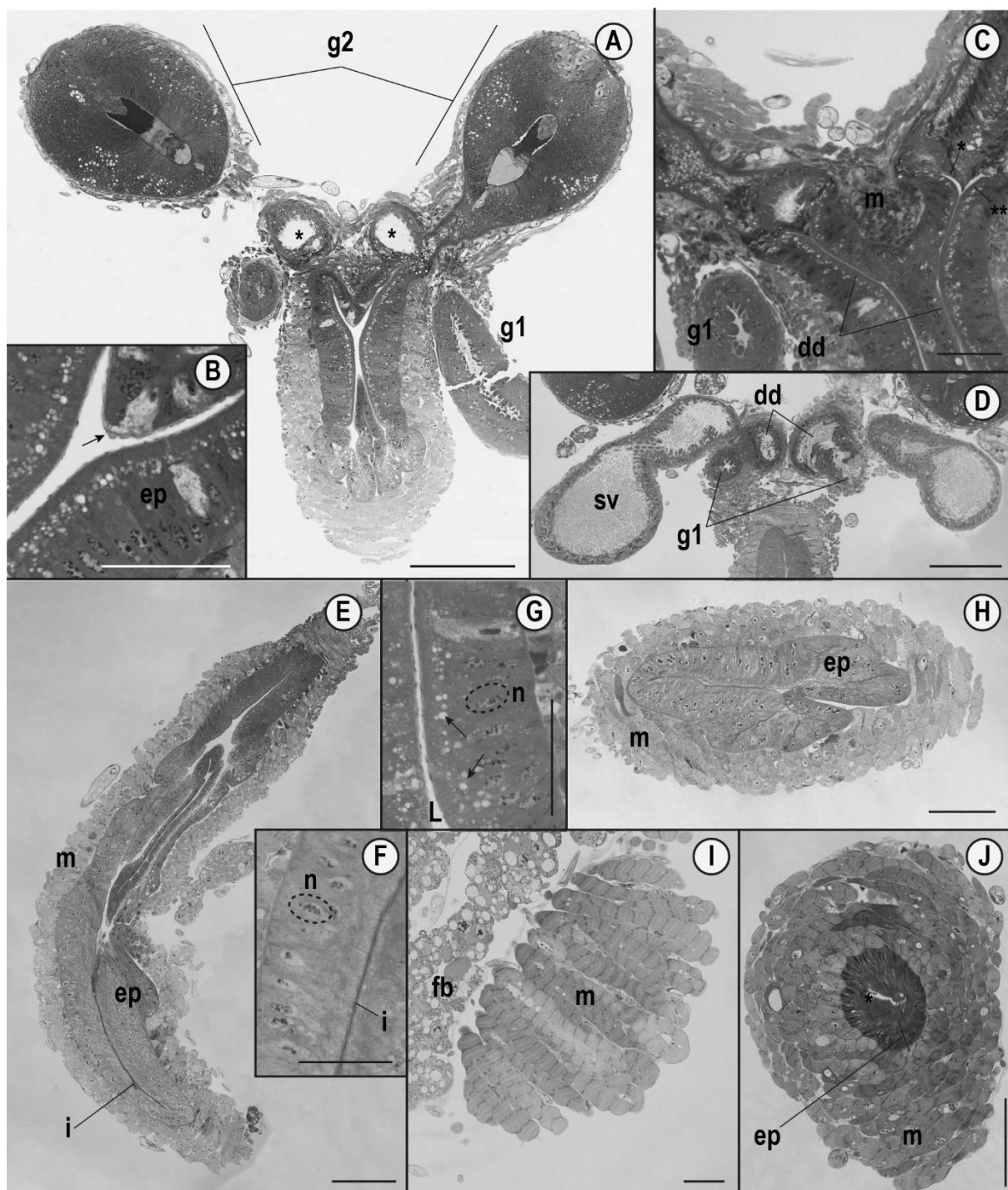


Figura 8. Junções dos vasos deferentes, das vesículas seminais e das glândulas acessórias com o ducto ejaculatório de *D. minutum*. A – Corte longitudinal na região de fusão das glândulas acessórias e vesículas seminais. Notar o canal único após a junção das vesículas seminais e vasos deferentes (\*). B – Detalhe do epitélio dos ductos ejaculatórios laterais, com a seta mostrando a cutícula íntima. C – Detalhe do encontro dos lúmens da vesícula seminal + vaso deferente (\*) e glândula 2 (\*\*). Notar a camada muscular envolvendo a junção dos vasos deferentes e vesículas seminais. D – Detalhe da fusão dos lúmens dos vasos deferentes, vesículas seminais e glândulas do tipo 1. E-G – Corte longitudinal da segunda e terceira porções do ducto ejaculatório, com detalhes do epitélio da segunda (G) e da terceira (F) porções. H – Corte transversal da terceira porção do ducto ejaculatório. I –

Musculatura que envolve o ducto ejaculatório. J – Corte transversal da bomba ejaculatória, o asterisco indicando a cutícula íntima. Legenda: *dd*, vaso deferente; *m*, músculo; *L*, lúmen; *ep*, epitélio; *i*, cutícula íntima; *fb*, corpo gorduroso. Barras de escala: A, D, E, G, H e J = 50  $\mu\text{m}$ ; B, C, F e I = 20  $\mu\text{m}$ . Fonte: Autor (2023).

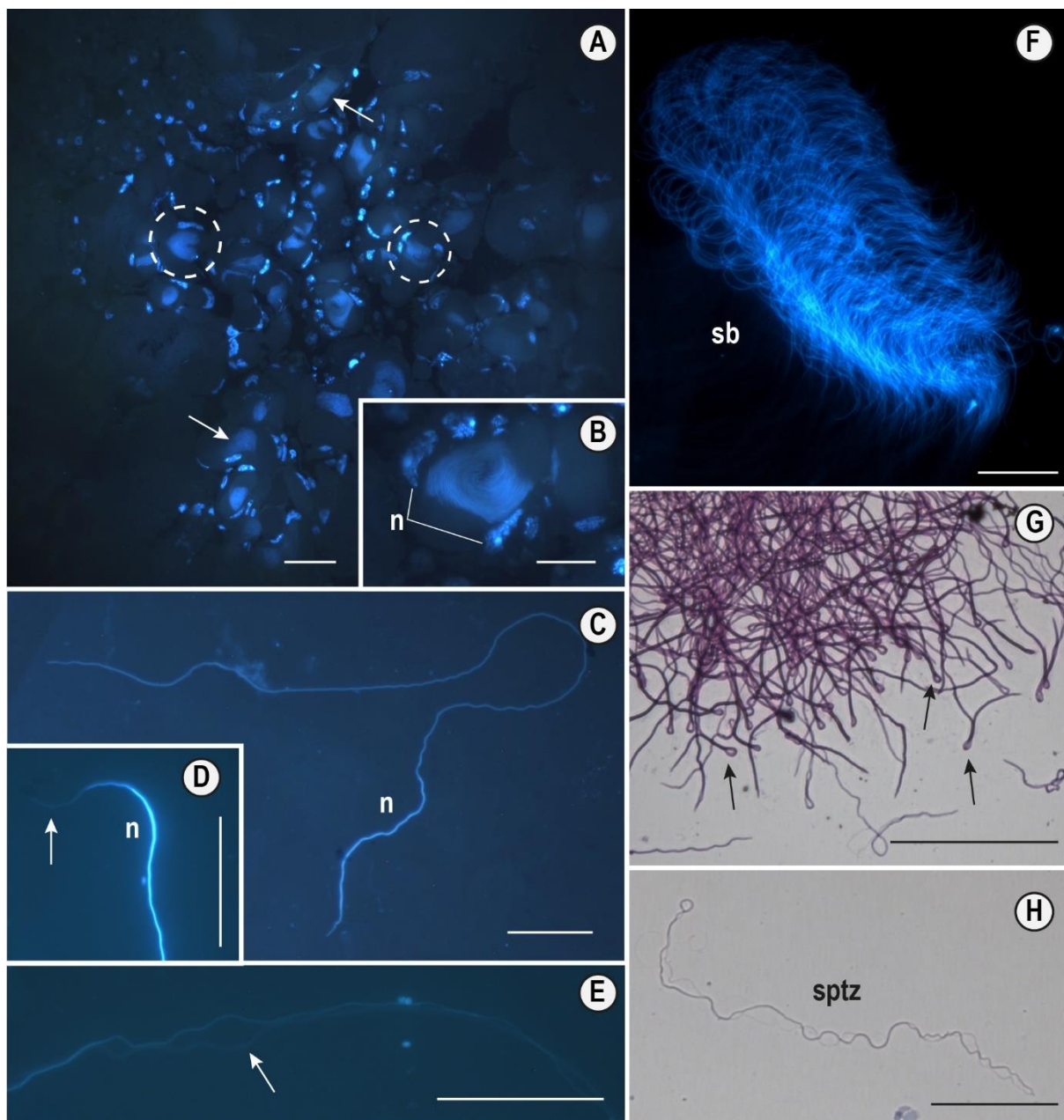


Figura 9. Espermatozoides e feixe espermático de *D. minutum*, corados com DAPI (A-E) e com Giemsa (G, H). A – Corte transversal do testículo, evidenciando os cistos (círculos) com espermatídes tardias ou já espermatozoides (setas). B – Detalhe de um cisto, mostrando as células císticas com seus núcleos grandes. C, D – Espermatozoide inteiro e detalhe da extremidade anterior, mostrando o acrossomo (seta). E – Região de um espermatozoide onde a membrana se rompeu e o núcleo separou-se dos componentes do flagelo (seta). F – Feixe espermático. G – Feixe parcialmente desintegrado, com as setas indicando as dobras dos espermatozoides. H – Espermatozoide com o

núcleo e as estruturas flagelares desassociadas. Legenda: *n*, núcleo; *sb*, feixe espermático; *sptz*, espermatozoide. Barras de escala: A, F, G = 50 µm; B-E, H = 20 µm. Fonte: Autor (2023).

## 5. DISCUSSÃO

O sistema reprodutor dos machos de *D. minutum* conserva o padrão anatômico encontrado em outros insetos pterigotos (Crowson, 1981; Paoli *et al.*, 2014; 2020; Salazar *et al.*, 2016; Özyurt Koçakoglu *et al.*, 2020; Erbey *et al.*, 2021; Folly *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2021), inclusive de coleópteros da infraordem Elateriformia (Zacharuk, 1958a; b; Kasap & Crowson, 1975).

Os testículos de *D. minutum* são recobertos por uma bainha peritoneal (tecido conjuntivo), um fino epitélio e corpo gorduroso, que mantém os folículos unidos. Essa característica também está presente em algumas espécies de Lampyridae (South *et al.*, 2008; Fu & Ballantyne, 2021), apontada como grupo-irmão de Cantharidae em algumas filogenias (Bocak *et al.*, 2014; Kunderata *et al.*, 2014). Nestas duas famílias, esse corpo gorduroso frequentemente apresenta uma pigmentação vívida, por exemplo: amarela nos lampirídeos *Emeia pseudosauteri* (Geisthardt, 2004) e *Abscondita chinensis* (L., 1767) (Fu & Ballantyne, 2021) e nos cantarídeos *Chauliognathus flavipes* (Fabricius, 1781) e *Malthesis* sp. (observação pessoal), alaranjada em *D. minutum*, rósea no cantarídeo *Silis* sp. (observação pessoal) e no vaga-lume *Photinus ignitus* Fall, 1927 (van der Reijden *et al.*, 1997) e vermelha no vaga-lume *Pyrocoelia pectoralis* E. Olivier, 1883 (Fu *et al.*, 2024). Contudo, a capa de corpo gorduroso pigmentado envolvendo os órgãos reprodutivos está ausente em Elateridae (Zacharuk, 1958a; b; Kasap & Crowson, 1975), outra família filogeneticamente próxima de Cantharidae (Bocak *et al.*, 2014; Kunderata *et al.*, 2014). Para efeito de comparação, fora de Elateroidea, *Chrysolina herbacea* Duftschmid, 1825 (Chrysomelidae) (Özyurt Koçakoglu *et al.*, 2021) e buprestídeos (Kasap & Crowson, 1975) possuem apenas uma bainha peritoneal envolvendo os testículos, enquanto escaravelhos (Scarabaeidae) frequentemente têm seus folículos testiculares sem envoltório externo algum ou unidos apenas pelos traqueíolos (Martínez *et al.*, 2021). Também há corpo gorduroso pigmentado envolvendo a vesícula seminal de *D. minutum*, *Silis* sp., *Malthesis* sp., *Chauliognathus flavipes* (Cantharidae) (observação pessoal) e alguns Lampyridae (South *et al.*, 2008; Fu & Ballantyne, 2021).

Folículos testiculares esféricos, semelhantes aos de *D. minutum*, são encontrados em Lampyridae e Elateridae (Elateroidea) (Vats & Vasu, 1993; van der Reijden *et al.*, 1997), em Scarabeidae (Scarabaeoidea) (Edmonds, 1987) e Chrysomelidae (Chrysomeloidea) (Özyurt Koçakoglu *et al.*, 2021). Entretanto, dentro das famílias citadas anteriormente, esse formato do folículo não é único, variando entre as espécies. Vats & Vasu (1993), por exemplo, descreveram inúmeras variações na morfologia dos folículos e testículos dentro de Elateridae. Alguns elaterídeos, como *Melanotus foliatus* Vats & Chauhan, 1991 (hoje considerada *Melanotus punctosus* (Walker, 1858)), *Agrypnus lupinosus* (Candèze, 1857) e *Chalcolepis pannus* Vats & Kashyap, 1992 possuem folículos testiculares de ovais a esféricos, sendo que em *M. foliatus* a inserção deles no vaso deferente por meio de curtos vasos eferentes também se assemelha à forma como ocorre em *D. minutum*. Agora, a presença de numerosos folículos, assim como em *D. minutum*, com seus 28 a 30 por testículo, também ocorre em Elateridae, variando de 18 a 150 (Levtshuk, 1930).

Não é possível observar todas as fases da espermatogênese nos adultos de *D. minutum*, indicando que os espermatozoides são produzidos uma única vez, já antes dos adultos emergirem. Em outras famílias de Elateriformia, a espermatogênese ocorre de forma contínua ao longo da fase adulta, sendo possível identificar cistos em diferentes estágios a partir de cortes histológicos dos folículos (Zacharuk, 1958a; Wolf, 1996; Senarat *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020). *Pyrocoelia tonkinensis* Olivier, 1886 (Lampyridae) produzem espermatozoides continuamente quando adultos, apresentando em seus folículos testiculares diferentes etapas da espermatogênese, de espermatogônias a espermatozoides maduros (Senarat *et al.*, 2019). Em *Selatosomus aeripennis destructor* (Brown, 1935) (Elateridae), é possível observar as diferenciações das células germinativas e as etapas da espermatogênese ainda em instares larvais pré-pupa (Zacharuk, 1958b), que continua quando estes besouros já são adultos (Zacharuk, 1958a). Já em *Chauliognathus* spp. (Cantharidae) não foram relatadas as diferentes etapas da espermatogênese no adulto, como inferido por Machado *et al.* (2001). Isso sugere que, provavelmente, a espermatogênese precoce seja uma característica própria de Cantharidae, porém estudos com outras espécies da família são necessários para mais esclarecimentos.

As células císticas bem desenvolvidas com núcleo grande e com cromatina descondensada revelam sua alta atividade em *D. minutum*. Durante a espermatogênese, as células císticas vão perdendo material citoplasmático gradativamente (King & Acai, 1982; de Cuevas, 1997). A manutenção do conteúdo citoplasmático até a liberação dos feixes espermáticos em *D. minutum* pode ser explicada pelo fato dela manter e dar suporte aos espermatozoides em diferenciação, como secretar substâncias que podem mantê-los em feixes. Há uma lacuna no conhecimento sobre o papel das células císticas, e trabalhos que as citam trazem informações rasas ou precisam ser atualizadas, sendo difícil estabelecer paralelos com as outras famílias, seja de Coleoptera ou de outras ordens de insetos. A organização das células reprodutivas em feixes começa ainda na fase de espermatídes, como cita King & Acai (1982). Porém, na maioria dos insetos (King & Acai, 1982; de Cuevas, 1997; Zoller & Schulz, 2012), os feixes se desfazem quando os espermatozoides ficam maduros, o que não ocorre em *D. minutum*. À semelhança do que ocorre em Lepidoptera (Thibout, 1980; King & Acai, 1982), os feixes de *D. minutum* são transportados pelos vasos deferentes intactos, e apenas as células císticas são desintegradas imediatamente antes dos feixes deixarem os folículos testiculares. Em estudos com ortópteros, alguns autores supõem que as células císticas podem estar relacionadas à produção de glicoproteínas que formam uma capa unindo os espermatozoides em feixe do tipo espermatodesmata e permitindo que sejam assim transferidos para a fêmea (Cholodkovsky, 1913; Cantacuzène *et al.*, 1972; Szöllosi, 1974; 1975; 1976a; b), porém sem nenhuma certeza sobre isso. Machos de *D. minutum* parecem manter a integridade dos feixes espermáticos da mesma forma, e provavelmente os transferem em espermatodesmata para as fêmeas, como ocorre em alguns outros coleópteros (Higgingson & Pitnick, 2011; Dias *et al.*, 2012; Nardi *et al.*; 2013).

Por cisto, há 512 espermatozoides em *D. minutum*, característica essa que pode acrescentar informações relevantes para a taxonomia, como esperado pelo trabalho de Virkki (1973) sobre o número de espermatozoides por cisto em insetos. Esse número que ocorre em *D. minutum* diferencia-se do que ocorre na maioria dos outros besouros, que geralmente apresentam 256 espermatozoides por cisto (Phillips, 1970). Dias *et al.* (2012) observaram em espécies de Tenebrionidae cistos com 512 espermatídes também, com dois feixes de 256 espermatídes posicionados

de forma antiparalela. Diferentemente, *D. minutum* apresenta apenas um feixe de 512 espermatozoides por cisto.

Três pares de glândulas acessórias estão presentes em *D. minutum*, mesmo número encontrado em muitos lampirídeos (van der Reijden *et al.*, 1997; South *et al.*, 2008; Fu & Ballantyne, 2021). Entretanto, esse número de glândulas pode variar de dois a quatro pares (Hayashi & Suzuki, 2003). A descrição da morfologia das glândulas acessórias de Lampyridae (South *et al.*, 2008; Fu & Ballantyne, 2021) apresenta certa semelhança àquela para as glândulas de *D. minutum*. Vários estudos com vaga-lumes relacionam a maior quantidade e tamanho das glândulas acessórias com a produção de pré-espermatóforos, um componente que dará origem ao espermatóforo (van der Reijden *et al.*, 1997; Hayashi & Suzuki, 2003; South *et al.*, 2008; Fu & Ballantyne, 2021). Vaga-lumes que não transferem espermatozoides por meio de espermatóforo possuem poucos pares de glândulas e elas são diminutas (Wing, 1985; Demary & Lewis, 2007; Fu *et al.*, 2024). Em South *et al.* (2011) esse fenômeno foi mais bem correlacionado: lampirídeos com espermatóforo tinham de dois a cinco pares de glândulas, enquanto aqueles sem espermatóforos variavam de zero a dois pares. Em Elateridae e Byrrhoidea, também ocorre a produção de espermatóforo (inclusive, com glândulas com nomenclaturas próprias, como “glândulas espermatóforas”; ver Kasap & Crown, 1975), porém a relação entre a produção de espermatóforos e a quantidade e/ou tamanho das glândulas não foi descrita. Uma análise detalhada do conteúdo das glândulas acessórias é necessária para determinar se *D. minutum* e outros cantarídeos produzem espermatóforo assim como observado em muitos Lampyridae e Elateridae.

Quanto à forma das glândulas acessórias, também há grandes variações, de simples a mais complexas, dentro de Coleoptera (Kaulenas, 1992). Semelhante ao descrito para as glândulas de *D. minutum*, pode-se citar as espécies de Elateridae tratadas por Dufour (1824) e Williams (1945), os quais deram uma terminologia diferente para os três pares de glândulas: dois pares são chamados de glândulas externas ou glândulas espermatóforas e um par nomeado de glândulas internas ou simplesmente glândulas acessórias. As glândulas internas ou “acessórias” definida por esses autores possuem um reservatório na sua porção proximal (Kasap & Crown, 1975), semelhante ao observado na porção proximal das glândulas tipo 2 de *D. minutum*. Glândulas com formato tubular e longo, enroladas ou não, são

encontradas em Lampyridae, Elateridae e Buprestidae (Elateriformia) (Kasap & Crown, 1975; Vats & Vasu, 1993). Uma homologia entre essas glândulas é difícil de estabelecer, pois há uma carência de estudos comparativos sobre aspectos histológicos e do desenvolvimento embriológico dessas estruturas, principalmente entre famílias de Elateriformia. Em *D. minutum*, todas as glândulas possuem origem mesodérmica, evidenciado pelo fato de não possuir cutícula íntima, assim como Bordas (1900) classificou as “glândulas acessórias externas” de Elateridae. Zacharuk (1958b) descreveu em *Selatosomus aeripennis destructor* (Elateridae) que todas as glândulas acessórias e as vesículas seminais têm origem mesodérmica, porém não se desenvolvem diretamente da mesma estrutura mesodérmica que dá origem aos testículos e vasos deferentes.

Çaglar *et al.* (2020) descreveram para Buprestidae dois pares de glândulas acessórias e um terceiro par de glândulas que chamou de espermatóforas. As glândulas acessórias definidas por este autor são tubulares, longas e enroladas, e as glândulas espermatóforas são ovais e pareadas lado a lado (Çaglar *et al.*, 2020). As glândulas acessórias tipos 1 e 2 de *D. minutum* são muito semelhantes às glândulas acessórias de buprestídeos, enquanto as glândulas tipo 3 são semelhantes às glândulas espermatóforas, porém há diferenças histológicas: as glândulas espermatóforas descritas por Çaglar *et al.* (2020) possuem epitélio estratificado, enquanto as glândulas do tipo 3 de *D. minutum* têm apenas uma camada.

De forma generalizada, as vesículas seminais dos insetos são dilatações dos vasos deferentes, podendo ocorrer na região anterior, mediana ou posterior destes órgãos (Kaulenas, 1992; Gullan & Cranston, 2017). Portanto, em *D. minutum*, as vesículas seminais podem ser consideradas incomuns, visto que elas são evaginações da base dos vasos deferentes, como uma glândula acessória, e não dilatações. Talvez por isso haja uma confusão histórica da descrição das glândulas acessórias em espécies de Elateridae, nos quais pelo menos um dos pares se trata, provavelmente, de vesículas seminais (Zacharuk, 1958b; Kasap & Crown, 1975). Exemplo disso são as estruturas semelhantes a glândulas que Zacharuk (1958b) descreveu como vesículas seminais em *Selatosomus aeripennis destructor* (Elateridae), ao verificar os conteúdos luminiais, diferenciando do que foi feito por outros autores (Dufour, 1824; Bordas, 1900; Horst, 1922). Fisiologicamente, as vesículas seminais de *D. minutum* funcionam tanto armazenando espermatozoides,

papel típico dessas estruturas (Kaulenas, 1992; Gullan & Cranston, 2017), quanto produzindo secreções, à semelhança das estruturas nomeadas de “glândulas ventrais” observadas em *Denticollis* Piller & Mitterpacher, 1783 (Elateridae) (Levtshuk, 1930). Em *D. minutum*, isso é observado pela regionalização do epitélio e pelo conteúdo luminal das vesículas. A modificação da função primária dessas estruturas deve ser verificada em outras espécies de Cantharidae e elateroideos. As células secretoras apresentam labirintos basais, semelhantes às descritas em glândulas coxais de *Lithobius forficatus* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Lithobiidae) (Rosenberg, 1983) e em ducto ejaculatório e seu saco acessório de duas espécies de moscas-escorpião (Mecoptera: Panorpidae) (Lyu *et al.*, 2022). Essas células podem desempenhar a função de transporte (Rosenberg, 1983): provavelmente nutrientes e íons da hemolinfa são trazidos de forma intensa para o lúmen da vesícula seminal, a fim de manter os espermatozoides. Além disso, essas células também secretam, podendo haver uma relação de manutenção não só dos espermatozoides em si, mas também dos feixes em espermatodesmata.

A junção das glândulas acessórias e vesículas seminais com o ducto ejaculatório em elateroideos ocorre na mesma altura, segundo a revisão de Kasap & Crown (1975). Em *D. minutum*, embora seja observado a continuidade dos lúmens vindos dos vasos deferentes formando dois canais paralelos antes de se fundirem, esses são, na verdade, ductos ejaculatórios laterais, pois possuem cutícula íntima (Klowden & Palli, 2003; Gullan & Cranston, 2017; Özyurt Koçakoglu *et al.*, 2020; 2023). Isso mostra que, no desenvolvimento embrionário, os vasos deferentes (assim como todas as glândulas acessórias, vesículas seminais e testículos) têm origem mesodérmica e os ductos laterais, assim como o ducto ejaculatório comum, têm origem ectodérmica (Gullan & Cranston, 2017; Klowden & Palli, 2023). A cutícula íntima presente no ducto ejaculatório de *D. minutum* é bem delgada. À medida que chega mais próxima do edeago, a camada externa de músculo se torna mais calibrosa, e o lúmen mais estreito, característica encontrada em diversas famílias de Coleoptera, como Chrysomelidae (Özyurt Koçakoglu *et al.*, 2020), Curculionidae (Paoli *et al.*, 2014), Passalidae (Salazar *et al.*, 2016), inclusive em Elateriformia, como em Buprestidae (Çaglar *et al.*, 2020). Não há descrições para elateroideos além da realizada neste trabalho.

Bombas ejaculatórias são encontradas em várias ordens de insetos, como Strepsiptera, Diptera, Siphonaptera e Mecoptera (Hünefeld & Beutel, 2005), mas não

são comuns entre os coleópteros (Navarrete-Hereldia *et al.*, 2005). Famílias de besouros em que ocorrem bomba ejaculatória são Lepiceridae (Navarrete-Hereldia *et al.*, 2005), Staphylinidae (Besuchet, 1971; Jaloszynski, 2020), Archaeocrypticidae (Besuchet, 1971; Lawrence, 1994), Ciidae (Folly *et al.*, 2021a, b), Monotomidae (Jaloszynski & Ruta, 2021), entre algumas outras, todas não próximas filogeneticamente. Bombas ejaculatórias possuem importância nas definições de relações filogenéticas (Hünefeld & Beutel, 2005; Navarrete-Hereldia *et al.*, 2005; Jaloszynski, 2020; Jaloszynski & Ruta, 2021), entretanto pode haver confusões na descrição dessa estrutura em outros táxons de Coleoptera, nomeadas erroneamente de “glândulas acessórias” do ducto ejaculatório (Folly *et al.*, 2021b). Por tanto, as bombas ejaculatórias são estruturas que devem ser observadas com mais cuidado nas descrições do sistema reprodutor de besouros. A bomba ejaculatória de *D. minutum* apresenta organização histológica semelhante à estrutura chamada por Zacharuk (1958a) de “processo glandular do ducto ejaculatório”, que deve ser uma bomba ejaculatória, de *Selatosomus aeripennis destructor* (Elateridae): várias camadas de músculos formam uma bainha espessa na parede dessa estrutura, com uma cutícula íntima internamente e células epiteliais com organização difusa. Essa organização histológica também é descrita em outros grupos, como para a bomba ejaculatória de *Stenomastigus longicornis* Leleup, 1968 (Staphylinidae) (Jaloszynski, 2020).

Quanto à morfologia espermática, há poucos dados disponíveis para espécies de Elateriformia. Dias *et al.* (2020) descrevem pela primeira vez a estrutura dos espermatozoides de alguns elateriformes, das famílias Lampyridae, Elateridae e Buprestidae. Assim como observado em *D. minutum*, as espécies descritas por Dias *et al.* (2020) possuem acrossomo anterior, seguido pelo núcleo, que é paralelo aos componentes flagelares. Esta característica, que difere do padrão básico da morfologia espermática de insetos (Phillips, 1970; Dallai, 2014; Dallai *et al.*, 2016), parece ser um importante caráter para a infraordem Elateriformia, e mais estudos se fazem necessários para atestar ou não isso. Outras famílias próximas de Elateriformia, como Scarabaeidae (Paoli *et al.*, 2020), Passalidae (Salazar *et al.*, 2016) e Staphylinidae (Werner *et al.*, 2002), possuem uma estrutura espermática semelhante àquela da maioria dos insetos pterigotos. Mais paralelos podem ser estabelecidos entre os espermatozoides de *D. minutum* e outros cantarídeos e os de

outras famílias de Elateriformia, e para isso, novos estudos devem ser realizados, principalmente sobre a ultraestrutura.

## 6. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, foi possível concluir que:

1. O sistema reprodutor masculino de *Discodon minutum* segue o padrão básico de Coleoptera, entretanto as vesículas seminais são evaginações da base dos vasos deferentes;
2. Não há produção contínua de espermatozoides no inseto adulto; a espermatogênese ocorre de forma precoce, ainda nos estágios juvenis (larva e/ou pupa), diferente do que ocorre em famílias próximas (Elateridae e Lampyridae);
3. As células císticas são bem desenvolvidas e podem estar relacionadas com a formação e manutenção dos espermatozoides em feixes do tipo espermatodesmata;
4. Vesículas seminais com duas porções distintas, uma secretora e outra de armazenamento; a porção secretora pode estar envolvida na nutrição e manutenção dos espermatodesmatas até a transferência para as fêmeas, por meio tanto de secreções próprias quanto do transporte de substâncias nutritivas da hemolinfa por meio do seu epitélio atípico;
5. Pelo menos um dos três pares de glândulas acessórias é parece ser homólogo às glândulas “espermatoforais” de Elateridae e Lampyridae;
6. Presença de bomba ejaculatória em *D. minutum* e provável paralelo com a “processo glandular do ducto ejaculatório” de *Selatosomus aeripennis destructor* (Elateridae);
7. O núcleo dos espermatozoides é lateral aos componentes do flagelo, assim como ocorre em outras famílias de Elateriformia, como Elateridae e Lampyridae.

## REFERÊNCIAS

- Amaral, D.T., Bonatelli, I.A., Cerri, R., Viviani, V.R. (2019) Phylogenomic analyses and divergence time estimation of Elateroidea (Coleoptera) based on RNA-Seq data. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 30, 283–289.
- Anton, E., Beutel, R.G. (2012) The adult head morphology of *Dascillus* (L.) (Dascilloidea: Dascillidae) and *Glaresis* Erichson (Scarabaeoidea: Glaresidae) and its phylogenetic implications. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 70, 3–42.
- Baccetti, B., Daccordi, M. (1988) Sperm structure and phylogeny of the Chrysomelidae. In: Jolivet, P., Petitpierre, E., Hsiao, T.H. (Eds.). *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 357–378.
- Besuchet, C. (1971) Les *Clidicus* de Ceylon (Col. Scydmaenidae). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 43, 249-257.
- Beutel, R.G. (1995) Phylogenetic analysis of Elateriformia (Coleoptera: Polyphaga) based on larval characters. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 33, 145–171.
- Beutel, R.G., Pohl, H., Yan, E.V., Anton, E., Liu, S., Slipinski, A., MacKenna, D., Friedrich, F. (2019) The phylogeny of Coleopterida (Hexapoda) – morphological characters and molecular phylogenies. *Systematic Entomology*, 44, 75–102.
- Biffi, G. (2017) Análise cladística de Chauliognathini *sensu* Miskimen, 1961 e revisão de *Microdaiphron* Pic, 1926 (Coleoptera, Cantharidae, Chauliognathinae). Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Biffi, G., Geiser, M. (2022) A revision of *Discodon tricolor* (Guérin-Méneville) and its mimics from the Atlantic forests of Brazil (Coleoptera: Cantharidae). *European Journal of Taxonomy*, 834, 148–189.
- Biffi, G., Leschen, R.A., Hsiao, Y., Daniel, G.M., & Casari, S.A. (2022) The systematics of Dymorphocerinae (Cantharidae) based on larvae. *Insect Systematics & Evolution*, 54(3), 312–347.
- Biffi, G. (2023a) Cantharidae in *Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil*. PNUD. Available in: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do>>. Access on 25 Abr. 2023.
- Biffi, G. (2023b) Rediscovery of *Malthesis ater* Motschulsky, 1853 and a catalog of the genus *Malthesis* Motschulsky, 1853 (Coleoptera, Cantharidae). *Caldasia*, 45(3).

- Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., Vogler, A.P. (2014) Building the Coleoptera tree-of-life for >8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, 39, 97–110.
- Bocakova, M., Bocak, L., Hunt, T., Teravainen, M., Vogler, A.P. (2007) Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. *Cladistics*, 23, 477–496.
- Bordas, L. (1900) Recherches sur les organes reproducteurs males des Coléoptères. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie et Biologie*, XII, 283–448.
- Bouchard, P., Bousquet, Y., Davies, A.E., Alonso-Zarazaga, M.A., Lawrence, J.F., Lyal, C.H.C., Newton, A.F., Reid, C.A.M., Schmitt, M., Slipinski, S.A., Smith, A.B.T. (2011) Family-group names in Coleoptera (Insecta). *ZooKeys*, 88, 1–972.
- Bouchard, P., & Bousquet, Y. (2020) Additions and corrections to “Family-group names in Coleoptera (Insecta)”. *ZooKeys*, 922, 65.
- Burrini, A.G., Magnano, L., Magnano, A.R., Scala, C., Baccetti, B. (1988) Spermatozoa and phylogeny of Curculionoidea (Coleoptera). *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 17(1), 1–50.
- Çaglar, Ü., Özyurt Koçakoglu, N., Candan, S. (2020) Histomorphological structure of male reproductive systems in *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1761) (Coleoptera: Buprestidae). *Commagene Journal of Biology*, 4(2), 140–145.
- Cantacuzene, A.M., Lauerjat, S., Papillon, M. (1972) Influence de la temperature d'élevage sur les caracteres histologiques de l'appareil genital de *Schistocerca gregaria* J. *Insect Physiology*, 18, 2077–2093.
- Cholodkovsky, N.A. (1913) Über die spermatodosen der locustiden. *Zoologischer Anzeiger*, 41, 615–619.
- Crowson, R.A. (1981) *The biology of the Coleoptera*. Academic Press London, 814 pp.
- Dallai, R. (2014) Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Structure & Development*, 43, 257–290.
- Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R.G. (2016) Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. *Annual Review of Entomology*, 61, 1–23.
- Dallai, R., Lino-Neto, J., Dias, G., Nere, P.H.A., Mercati, D., Lupetti, P. (2018) Fine structure of the ladybird spermatozoa (Insecta, Coleoptera, Coccinellidae). *Arthropod Structure & Development*, 47, 286–298.
- Dallai, R., Mercati, D., Giglio, A., Lupetti, P. (2019a) Sperm ultrastructure in several species of Carabidae beetles (Insecta, Adephaga) and their organization in spermatozeugmata. *Arthropod Structure & Development*, 51, 1–13.

- Dallai, R., Mercati, D., Lino-Neto, J., Dias, G., Folly, C., Lupetti, P. (2019b) The peculiar structure of the flagellar axoneme in Coccinellidae (Insecta: Coleoptera). *Arthropod Structure & Development*, 49, 50–61.
- Dallai, R., Mercati, D., Fanciulli, P.P., Petrioli, A., Lupetti, P. (2020) New findings on the sperm ultrastructure of Carabidae (Insecta, Coleoptera). *Arthropod Structure & Development*, 54.
- de Cuevas, M., Lilly, M., Sprandling, A. C. (1997) Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 31(1), 405–428.
- Delkeskamp, K. (1977) *Coleopterorum catalogus supplementa*, pars 165, fasc. 1. Ed. Sec. Cantharidae, 485 pp. Dr. W. Junk ed., The Hage.
- Demary, K. C., Lewis, S. M. (2007) Male reproductive allocation in fireflies (*Photinus* spp.). *Invertebrate Biology*, 126, 74–80.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Dallai, R., Mercati, D., Lupetti, P. (2020a) Sperm ultrastructure of three species of ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). *Arthropod Structure & Development*, 55.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Dallai, R., Mercati, D., Lupetti, P. (2020b) The sperm ultrastructure of the click beetles (Elateridae) and related groups (Buprestidae and Lampyridae). *Arthropod Structure & Development*, 59.
- Dias, G., Yotoko, K.S., Gomes, L.F., Lino-Neto, J. (2012) Uncommon formation of two antiparallel sperm bundles per cyst in tenebrionid beetles (Coleoptera). *Naturwissenschaften*, 99, 773–777.
- Douglas, H.B., Kundrata, R., Brunke, A.J., Escalona, H.E., Chapados, J.T., Eyres, J., Savard, K., Slipinski, A., McKenna, D., Dettman, J.R. (2021) Anchored phylogenetics, evolution and systematics of Elateridae: are all bioluminescent Elateroidea derived click beetles? *Biology*, 10(6), 451.
- Dufour, L. (1824). Récherches anatomiques sur les Carabiques et plusieurs autres Coléoptères. *Annales des Sciences Naturelles (Paris) Atlas*, 4.
- Edmonds, W.D. (1974) Internal anatomy of *Coprophanaeus lancifer* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 3(2), 257-272.
- Erbey, M.; Özyurt Koçakoğlu, N.; Candan, S. (2021) Histomorphology of the male reproductive system and spermatogenesis of *Phyllobius (Ectomogaster) fulvago* Gyllenhal, 1834 (Coleoptera, Curculionidae): a light and scanning electron microscope study. *Entomological Review*, 101(1), 23-44.
- Evans, A.V. (2021) *Beetles of Western North America*. Princeton University Press, Princeton.
- Fender, K.M. (1973) Ecological notes on *Podabrus* (Coleoptera: Cantharidae). *The Coleopterists Society*, 27(1), 11–17.

- Fitton, M.G. (1973) Studies on the biology and ecology of Cantharidae (Coleoptera). Thesis (Doctor of Philosophy) – Imperial College of Science and Technology, University of London.
- Folly, C., de Castro Pecci-Maddalena, I.S., Lopes-Andrade, C. (2021a) The reproductive system of *Ceracis cornifer* (Mellié) and first description of sperm structure in a minute tree-fungus beetle (Tenebrionoidea: Ciidae). *Arthropod Structure & Development*, 64, 101088.
- Folly, C., Pecci-Maddalena, I.S.C., Lino-Neto, J. (2021b) Sistema reprodutor masculino, espermiogênese e espermatozoides em uma espécie de *Sternotarsus Perty* (Coccineloidea: Endomychidae). In: Baptista, C.F. *Morfologia do aparelho reprodutor e dos espermatozoides em besouros (Coleoptera: Cucujiformia) associados a fungos*. Orientador: José Lino-Neto. 2021. 65 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2021.
- Fu, X., Ballantyne, L. (2021) Reproductive systems, transfer, and digestion of spermatophores in two asian Luciolinae fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Insects*, 12, 365.
- Fu, X., Meyer-Rochow, V.B., Ballantyne, L., Zhu, X., Zhang, Q. (2024) Sperm competition and paternity in the endangered firefly *Pyrocoelia pectoralis* (Coleoptera: Lampyridae: Lampyrinae). *Insects*, 15(1), 66.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. (2017) *Insetos – fundamentos da entomologia*. 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Hayashi, F., Suzuki, H. (2003) Fireflies with or without prespermatophores: evolutionary origins and life-history consequences. *Entomological Science*, 6, 3-10.
- Horst, A. (1922) Zur kenntnis der Biologie und Morphologie einiger Elateriden und ihrer larven. *Archiv für Naturgeschichte*, 88, 1-90.
- Higgingson, D.M., Pitnick, S. (2011) Evolution of intra-ejaculate sperm interations: do sperm cooperate? *Biological Reviews*, 86, 249-270.
- Hünefeld, F. & Beutel, R.G. (2005) The sperm pumps of Strepsiptera and Antliophora (Hexapoda). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43, 297-306.
- Jaloszynski, P. (2020) A new species and new records of Malagasy *Megalopinus Eichelbaum* (Coleoptera, Staphylinidae, Megalopsidiinae), with notes on the sperm pump in rove beetles. *Zootaxa*, 4768, 425-434.
- Jaloszynski, P., Ruta, R. (2021) Discovery of a complex sclerotized sperm pump in Monotomidae (Coleoptera): Functional morphology and phylogenetic value. *Journal of Morphology*, 1-11.
- Jamieson, B.G.M. (1987) *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 320.

- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A. (1999) *Insects. Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, Plymouth UK, p. 555.
- Kaulenas, M.S. (1992) *Insect Accessory Reproductive Structures: function, structure, and development*. In: Bradshaw, S.D., Burggren, W., Heller, H.C. (Eds.). *Zoophysiology*, v. 31. Springer-Verlag, Berlin, p. 224.
- Kasap, H., Crowson, R.A. (1975) A comparative anatomical study of Elateriformia and Dascilloidea (Coleoptera). *Transactions of the Entomological Society of London*, 126 (4), pp. 441-495.
- Kazantsev, S., Brancucci, M. (2007) Cantharidae. In: Lobl, I. & Smetana, A. (Eds.). *Catalogue of Palaearctic Coleoptera*, v. 4. Apollo Books, Denmark, pp. 234-298.
- King, R.C.; Acai, H. (1982) *Insect Ultrastructure*, v. 1. Springer Science + Business New York, New York.
- Klowden, M., Palli, S.R. (2003) *Physiological Systems in Insects*. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, London.
- Kundrata, R., Bocakova, M., Bocak, L. (2014) The comprehensive phylogeny of the superfamily Elateroidea (Coleoptera: Elateriformia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76, 162-171.
- Kundrata, R., Blank, S.M., Prosvirov, A.S., Sormova, E., Gimmel, M. L., Vondracek, D., Jramp, K. (2019) One less mystery in Coleoptera systematics: the position of Cydistinae (Elateriformia *incertae sedis*) resolved by multigene phylogenetic analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 187 (4), 1259-1277.
- Kusy, D., Motyka, M., Andujar, C., Bocek, M, Masek, M., Sklenarova, K., Kokas, F., Bocakova, M., Vogler, A.P., Bocak, L. (2018) Genome sequencing of *Rhinorhipus* Lawrence exposes na early Branch of the Coleoptera. *Frontiers in Zoology*, 15 (1), 21.
- Kuznetsova, V.G., Maryańska-Nadachowska, A., Khabiev, G.N., Karagyan, G., Krivokhatsky, V.A. (2019) Variation in the number of testicular follicles and ovarioles among 18 lacewing species of the families Myrmeleontidae, Ascalaphidae, and Nemopteridae (Insecta, Neuroptera, Myrmeleontiformia). *ZooKeys*, 894, 33–51.
- Lawrence, J.F. (1988). Rhinorhipidae, a new Beetle Family from Australia, with comments on the phylogeny of the Elateriformia. *Invertebrate Taxonomy*, 2 (1), 1-53.
- Lawrence, J.F. (1994) Review of the Australian Archeocrypticidae (Coleoptera), with descriptions of a new genus and four new species. *Invertebrate Taxonomy*, 8, 449-470.
- Lawrence, J.F., Newton Jr., A.F. (1982) Evolution and classification of beetles. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 13, 261-290.

- Lawrence, J.F., Kristensen, N.P., Beutel, R.G., Leschen, R.A.B, Slipinski, A. (Eds.). (2010) *Handbook of Zoology, v. 2, Coleoptera*. Walter de Gruyter, Berlin/New York.
- Levtshuk, J. (1930) *Contributions to the comparative anatomy of the genitalia of Elateridae*. North Carolina State University.
- Lino-Neto, J., B ao, 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.
- Lyu, Q.H., Chen, Q.X., Sun, Y.L., Dong, W.J. (2022) Ultrastructure of ejaculatory ducts of *Cerapanorpa nanwutaina* and *Furcatopanorpa longihypovalva* (Mecoptera: Panorpidae). *Insects*, 13(11), 1074
- Machado, V., Gali an, J., De Ara ujo, A.M., Vera L ucias, S.V. (2001) Cytogenetics of eight neotropical species of *Chauliognathus* Henzt, 1830: implications on the ancestral karyotype in Cantharidae (Coleoptera). *Hereditas*, 134(2), 121-124.
- Mart inez, I., Rivera-Gasper ın, S.L., Carrillo-Ruiz, H., Mor on, M.A. (2021) Comparative aspects of the internal reproductive system of males in species of Melolonthinae, Dynastinae, and Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeoidea) from Mexico. *Acta Zoologica Mexicana*, 37.
- Naisse, J. (1966) Contr ole endocrinien de la diff erenciation sexuelle chez *Lampyris noctilluca* (Col opt ere Lampyridae): II. Ph enom enes neuros ecr etoires et endocrines au cours du d veloppement postembryonnaire chez le m le et la femelle. *General and Comparative Endocrinology*, 7(1), 85-104.
- Motyka, M., Kusy, D., Biffi, G., Geiser, M., Kazantsev, S.V., Bilkova, R., Jahadarova, E., Vogler, A.P., Bocak, L. (2023) Untangling the evolution of soldier beetles (Coleoptera: Cantharidae) and the evaluation of the morphological phylogenetic signal in a soft-bodied elateroid lineage. *Cladistics*, 39(6), 548-570.
- Nardi, J.B., Delgado, J.A., Collantes, F., Miller, L.A., Bee, C.M., Kathirithamby, J. (2013) Sperm cells of a primitive strepsipteran. *Insects*, 4(3), 463-475.
- Navarrete-Hereldia, J.L., Cort es-Aguilar, J., Beutel, R.G. (2005) New findings on the enigmatic beetle family Lepiceridae (Coleoptera: Myxophaga). *Entomologische Abhandlungen*, 62, 1993-201.
-  zyurt Ko ako lu, N. (2022) Structural and histological observations on the male reproductive system of adult red poplar leaf beetle *Chrysomela populi* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Microscopy Research and Technique*, 85(2), 429–436.
-  zyurt Ko ako lu, N., Candan, S., G ll , M. (2021) Anatomy and histology of the reproductive system of adult male mint leaf beetle *Chrysolina herbacea* (Duftschimid, 1825) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Microscopy Research and Technique*, 84(3), 512-520.

- Özyurt Koçakoglu, N., Candan, S., Çağlar, Ü. (2023) Anatomical and histological structures of male reproductive system in long-horned beetle *Isotomus speciosus* (Schneider, 1787) (Coleoptera: Cerambycidae): Light and scanning electron microscopic study. *Microscopy and Microanalysis*, 29(3), 1258-1266.
- Paoli, F., Dallai, R., Cristofaro, M., Arnone, S., Francardi, V., Roversi, P.F. (2014) Morphology of the male reproductive system, sperm ultrastructure and  $\gamma$ -irradiation of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Tissue & Cell*, 46 (2014), 274-285.
- Paoli, F., Mercati, D., Marianelli, L., Roversi, P.F., Lupetti, P., Dallai, R. (2020) Sperm ultrastructure and spermatogenesis in the Japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Micron*, 135, 102879.
- Pérez-Hernández, C.X. (2018) Natural history and ecology of soldier beetles (Coleoptera: Cantharidae) in the Mexican tropical dry forests. *Environmental Entomology*, 47 (3), 535-544.
- Philips, D.M. (1970) Insect sperm: their structures and morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 44, 243-277.
- Ramsdale, A.S. (2002) Family 64. Cantharidae Imhoff, 1856. In: Arnett Jr., R. H., Thomas, M. C., Skelley, P. E., Frank, J. H. (Eds.). *American Beetles*, v. 2, *Polyphaga through Curculionoidea*. CRC Press, Boca Raton, pp. 202-218.
- Ramsdale, A.S. (2010) Family 4.17. Cantharidae Imhoff, 1856. In: Lawrence, J. F.; Kristensen, N. P; Beutel, R. G.; Leschen, R. A. B; Slipinski, A. (Eds.). *Handbook of Zoology*, v. 2, *Coleoptera*. Walter de Gruyter, Berlin/New York, pp. 153-162.
- Rosenberg, J. (1983) Coxal organs of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *Cell Tissue Research*, 230, 421-430.
- Salazar, K., Dias, G., Boucher, S., Lino-Neto, J., Serrão, J.E. (2016) Morpho-anatomy of the male reproductive tract and spermatogenesis of the South American *Spasalus silvarum* Kwert (Coleoptera: Passalidae). *Zoomorphology*, 135(4), 487-497.
- Senarat, S., Thongboon, L., Kettratad, J., Jiraungkoorskul, W., Thaochan, N., Pongsakul, T., Poolprasert, P., Para, C, Dokchan, P. (2019) Light microscopic evidence of spermatogenesis of firefly, *Pyrocoelia tonkinensis* Olivier, 1886 (Coleoptera, Lapyridae). *The Journal of Applied Science*, 18 (1), 12-19.
- Slipinski, S.A., Leschen, R.A.B., Lawrence, J.F. (2011) Order Coleoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z. (Ed.) *Animal outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*, 3148, 203-208.
- South, A., Sota, T., Abe, N., Yuma, M., Lewis, S.M. (2008) The production and transfer of spermatophores in three Asian species of *Luciola* fireflies. *Journal of Insect Physiology*, 54 (5), 861-866.

- South, A., Stanger-Hall, K., Jeng, M.L., Lewis, S.M. (2011) Correlated evolution of female neoteny and flightlessness with male spermatophore production in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Evolution*, 65(4), 1099-1113.
- Szollosi, A. (1974) Ultrastructure study of the spermatodesm of *Locusta migratoria migratorioides* (R. f.): acrosome and cap formation. *Aerida*, 3, 175-192.
- Szollosi, A. (1975) Electron microscopy study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera). *Journal of Ultrastructure Research*, 50, 322-346.
- Szollosi, A. (1976a) Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of the locust *Locusta migratoria*, I. Abnormalities in differentiation of the cytoplasmic organelles. *Journal of Ultrastructure Research*, 54, 202-214.
- Szollosi, A. (1976a) Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of the locust *Locusta migratoria*, II. Abnormalities in differentiation of the nucleus. *Journal of Ultrastructure Research*, 54, 215-223.
- Thibout, E. (1980) Evolution and role of apyrene sperm cells of lepidopterans: their activation and denaturation in the leek moth, *Acrolepiopsis assectella* (Hypomeutoidea). *Advances in Invertebrate Reproduction*, 231-242.
- Triplehorn, C.A., Johnson, N.F. (2005) *Borror and DeLong's Introduction to the Study of the Insects*. 7th ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont.
- van der Reijden E.D., Monchamp, J.D., Lewis, S.M. (1997) The formation, transfer, and fate of the spermatophores in *Photinus* fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Canadian Journal of Zoology*, 75 (8), 1202-1207.
- Vats, L.K., Vasu, V. (1993) A comparative account to evaluate the taxonomic importance of the male reproductive organs of click beetles (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Entomology Research*, 17(4), 233-238.
- Virkki, N. (1973) Evolution of sperm cell number per bundle in insects. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 20, 23-34.
- Werner, M., Tscheulin, T., Speck, T., Zissler, D., Peschke, K. (2002) Ultrastructure and motility pattern of the spermatozoa of *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). *Arthropod Structure & Development*, 31(3), 243-254.
- Williams, J.L. (1945) The anatomy of the internal genitalia of some Coleoptera. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 47(4), 73-91.
- Wing, S.R. (1985) Prolonged copulation in *Photinus macdermotti* with comparative notes on *Photinus collustrans* (Coleoptera: Lampyridae). *The Florida Entomologist*, 68 (4), 627-634.

- Wolf, K.W. (1996) Strange vesicles with a homogeneous content in spermatocytes and spermatids of a click beetle, *Adelocera murina* (Elateridae). A fine study. *Micron*, 27(5), 389-396.
- Wittmer, W. (1973) Systematische Berichtigungen in der Fam. Cantharidae (Col.). *Mitteilungen der Entomologischen Gesellschaft Basel*, 23, 121.
- Zacharuk, R.Y. (1958a) Structures and functions of the reproductive systems of the prairie grain wireworm, *Ctenicera aeripennis destructor* (Brown) (Coleoptera: Elateridae). *Canadian Journal of Zoology*, 36(5), 725-751.
- Zacharuk, R.Y. (1958b) Postembryonic development of the reproductive systems of the prairie grain wireworm, *Ctenicera aeripennis destructor* (Brown) (Coleoptera: Elateridae). *Canadian Journal of Zoology*, 36(5), 753-777.
- Zhang, S., Che, L., Li, Y., Liang, D., Pang, H., Slipinski, A., Zhang, P. (2018) Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. *Nature Communications*, 9, 205.
- Zoller, R., Schulz, C. (2012) The *Drosophila* cyst stem cell lineage: partners behind the scenes? *Spermatogenesis*, 2(3), 145-157.