

ANA CLARA PEREIRA TEIXEIRA

**MORFOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO E DOS
ESPERMATOZOIDES DE *Liocanthyrus mecespilus* Guimarães & Ferreira-Jr,
2015 (Coleoptera: Noteridae)**

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

Coorientadores: Glenda Samara Dias Santos
Frederico Falcão Salles

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

T266m
2024
Teixeira, Ana Clara Pereira, 1999-
Morfologia do aparelho reprodutor masculino e dos
espermatozoides de *Liocanthyrus mecespilus* Guimarães &
Ferreira-Jr, 2015 (Coleoptera: Noteridae) / Ana Clara Pereira
Teixeira. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (38 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Lino Neto.

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

Referências bibliográficas: f. 33-38.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.197>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Liocanthyrus mecespilus*. 2. Besouros -
Espermatozóides - Morfologia. 3. Testículos. I. Lino Neto, José,
1959-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em em Entomologia.
III. Título.

CDD 22. ed. 595.76

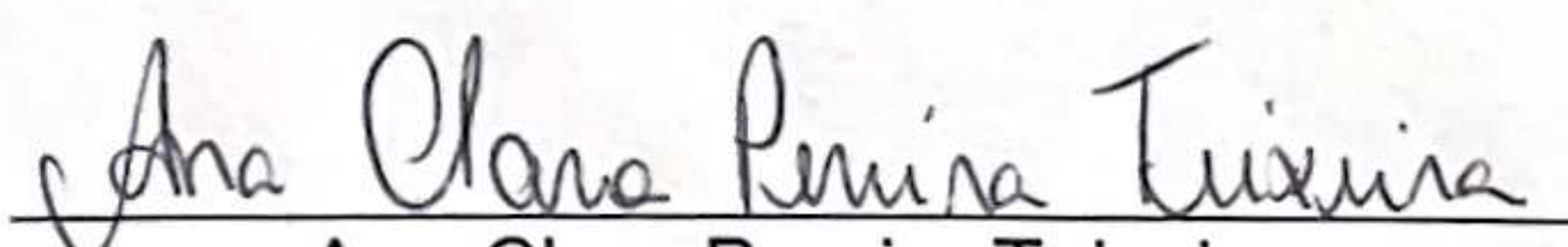
ANA CLARA PEREIRA TEIXEIRA

MORFOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO E DOS
ESPERMATOZOIDES DE *Liocanthyrus mecespilus* Guimarães & Ferreira-Jr,
2015 (Coleoptera: Noteridae)

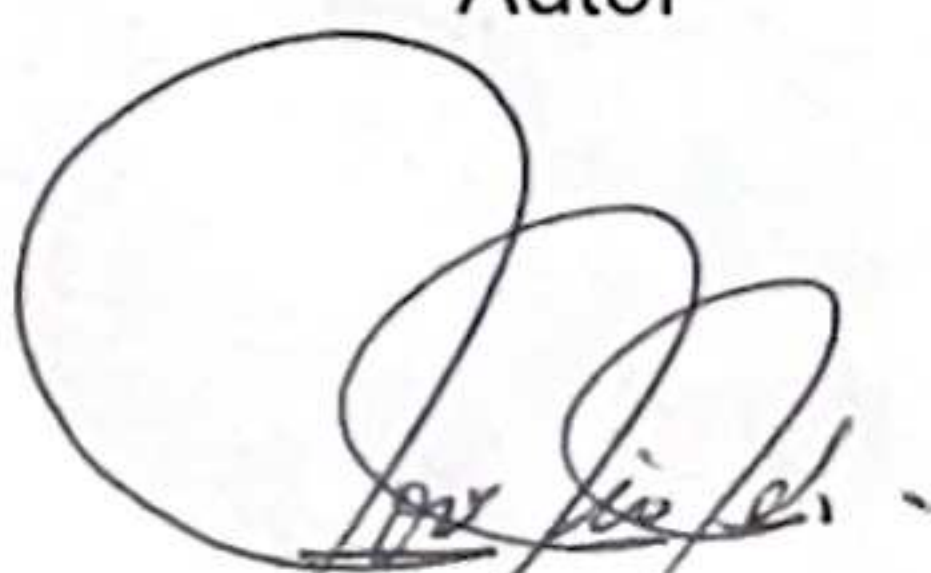
Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Entomologia, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2024.

Assentimento:



Ana Clara Pereira Teixeira
Autor



José Lino-Neto
Orientador

*À minha vó Madalena que sonha comigo
meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, presto assim, primeiramente, meus agradecimentos à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Agradeço também à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular e seus membros: Mauricio, Witallo, Dayvson, Henrique, Maisa, Victória, Camila, Paulo, professora Glenda, nossa técnica Maura, as agregadas Anne e Cris, e ao meu orientador professor José Lino-Neto pelo apoio e auxílio durante a execução do projeto e também por aguentarem minhas reclamações.

Agradeço ao professor Nelson Ferreira Júnior da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, com a identificação dos espécimes que usei durante o desenvolvimento do trabalho e ao professor Frederico Falcão Salles pelo apoio durante as coletas e também na identificação parcial do material.

Em seguida, agradeço à minha família, em especial minha Vó Madalena, pelo apoio, carinho e cuidado, mesmo com a distância. Também aos outros membros, minha mãe, meu pai, minha madrasta, meus irmãos, primos, tios e tias pelo apoio durante essa jornada.

Aos meus amigos que deixei na minha cidade, Alefe, Abel, Luan, Victória, Vinícius, João Kleber, Geisi, Evli, Vitor, Fabrícia, Tamires, Lorena e Gabriel, mesmo com a distância se fazem presente.

Também agradeço aos amigos que fiz aqui em Viçosa, Ronaldo, Bjorn, Viviane, Thalya, Ingrid, Rebeca, Marcela, Alana, Ana Luisa, Giovana, Maisa, Mauricio, Witallo e Dayvson. Vocês foram cruciais para o equilíbrio entre trabalho e descanso.

Por fim, à minha psicóloga Sara, que me direcionou durante o processo, sendo uma peça crucial para que eu conseguisse terminar os experimentos com calma e mantendo o foco.

"O Criador, se Ele existe, tem uma predileção
desmesurada por besouros."

J. B. S. Haldane (1892-1964)

RESUMO

TEIXEIRA, Ana Clara Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Morfologia do aparelho reprodutor masculino e dos espermatozoides de *Liocanthyrus mecespilus* Guimarães & Ferreira-Jr, 2015 (Coleoptera: Noteridae)** Orientador: José Lino-Neto. Coorientadores: Glenda Samara Dias Santos e Frederico Falcão Salles.

Os Noteridae, integrantes da subordem Adephaga (Coleoptera), são comumente conhecidos como besouros escavadores, sendo encontrados em ambientes de água doce, especialmente em poças que contêm matéria orgânica em decomposição. Essa família abrange 14 gêneros distribuídos em três subfamílias, sendo Noterinae e Notomicrinae as mais prevalentes no Brasil. Embora existam dados sobre a morfologia do sistema reprodutor, espermatozoides e tipo de conjugação espermática para as famílias próximas como Gyrinidae, Carabidae, Cicindelidae e Dytiscidae, informações semelhantes para Noteridae ainda são escassas. Este estudo tem como objetivo descrever a morfologia do sistema reprodutor masculino e do espermatozoide em Noteridae, com foco em representantes de *Liocanthyrus mecespilus*. O sistema reprodutor de *L. mecespilus* é formado por um par de testículos unifoliculares, um par de ductos deferentes com uma porção dilatada mediana formando a vesícula seminal em cada um, um par de glândulas acessórias e um ducto ejaculatório. Os espermatozoides, com aproximadamente 675 µm de comprimento, são encontrados aos pares unidos por um material denso denominado complexo cabeça-material conectivo na base dos testículos e nas vesículas seminais. O sistema reprodutor dessa espécie exibe características semelhantes às descritas para a subordem Adephaga, enquanto a conjugação espermática assemelha-se à encontrada em outros representantes de Dytiscidae, exceto pela disposição dos dois flagelos circundando o complexo cabeça-material conectivo. Esses dados proporcionam uma visão inicial sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino, os espermatozoides e o tipo de conjugação encontrado em Noteridae, podendo contribuir para o conhecimento sobre a biologia desses besouros e sua posição sistemática dentro de Adephaga.

Palavras-chave: Adephaga. Besouros escavadores. Testículos unifoliculares. Conjugação espermática.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Ana Clara Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Morphology of the male reproductive system and spermatozoa of *Liocanthyrus mecespilus* Guimarães & Ferreira-Jr, 2015 (Coleoptera: Noteridae)** Adviser: José Lino-Neto. Co-advisers: Glenda Samara Dias Santos e Frederico Falcão Salles

The Noteridae, members of the suborder Adephaga (Coleoptera), are commonly known as burrowing beetles and are found in freshwater environments, especially in pools containing decomposing organic matter. This family comprises 14 genera distributed in three subfamilies, with Noterinae and Notomicrinae being the most prevalent in Brazil. Although there are data on the morphology of the male reproductive system, sperm and sperm conjugation for families such as Gyrinidae, Carabidae and Dytiscidae, similar information for Noteridae is still scarce. This study aims to describe the morphology of the male reproductive system and spermatozoa in Noteridae, with a focus on representatives of *Liocanthyrus mecespilus*. The aim is to contribute data that can enrich studies related to the systematics of the family and the Adephaga suborder as a whole. The reproductive system of *L. mecespilus* consists of a pair of unifollicular testes, a pair of vas deferens with a median dilated portion forming the seminal vesicle in each, a pair of accessory glands and an ejaculatory duct. The spermatozoa, approximately 675 μm long, are found at the pairs united by a dense material called the head-connective material complex in the base of the testicles and seminal vesicles. The reproductive system of this species displays characteristics similar to those described for the Adephaga suborder, while the sperm conjugation resembles that found in other representatives of the Dytiscidae, except for the arrangement of the two flagella surrounding the head-connective material complex. These data provide an initial insight into the morphology of the male reproductive system, spermatozoa and type of conjugation found in Noteridae, and may contribute to knowledge about the biology of these beetles and their systematic position within Adephaga.

Keywords: Adephaga. Burrowing beetles. Unifollicular testes. Sperm conjugation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Coleoptera Linnaeus, 1758	9
1.2 Adephaga Schellenberg, 1806	9
1.3 Noteridae Thomson, 1857	10
1.4 <i>Liocanthyrus mecespilus</i> Guimarães & Ferreira Junior, 2015	11
1.5 Morfologia espermática e filogenia	11
1.6 Sistema reprodutor masculino e morfologia espermática em Adephaga ..	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Morfometria dos espermatozoides	15
3.2 Histologia do sistema reprodutor masculino	16
4. RESULTADOS	16
4.1 Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides	16
4.2 Histologia do sistema reprodutor	21
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Coleoptera Linnaeus, 1758

Os besouros, ordem Coleoptera, constituem um grupo notável de insetos, compreendendo mais de 380.000 espécies identificadas, além de representar cerca de 40% de todas as espécies de Hexapoda e um quarto da diversidade animal (Triplehorn & Johnson, 2015; Beutel et al., 2020; Casari et al., 2024). Caracterizam-se pelo alto grau de esclerotização do corpo e por suas asas anteriores, conhecidas como élitros, que desempenham uma série de funções vitais, incluindo proteção, regulação térmica, comunicação, cópula e até mesmo suporte para dobrar as asas posteriores (Goczał & Beutel, 2023). Essa diversidade de funções atribuídas aos élitros é um dos fatores que explicam a notável abundância e diversidade dos besouros, conferindo-lhes o status de cosmopolitas.

A origem dos besouros remonta ao período Permiano, derivados de um ancestral Neuropterida, conforme evidências em estudos com a família †Tshekardocoleidae por Kirejtshuk et al. (2014) e Boudinot et al. (2022), especialmente em relação à evolução dos élitros. Embora tenham surgido no Permiano, foi durante o Cretáceo inferior que a ordem atingiu sua máxima diversidade, principalmente em decorrência da coevolução com as angiospermas (Wang et al., 2013).

Atualmente, a ordem Coleoptera é dividida em quatro subordens: Archeostemata, Myxophaga, Adepfaga e Polyphaga. Dentre essas, apenas em Archeostemata não há espécies adaptadas a ambientes aquáticos. Myxophaga e Adepfaga possuem cerca de 72% de suas espécies descritas em ambientes aquáticos, enquanto em Polyphaga são 2,3% (Ferreira-Jr et al., 2014). Polyphaga e Adepfaga detêm a maior diversidade de besouros, respectivamente.

1.2. Adepfaga Schellenberg, 1806

Adepfaga representa a segunda subordem mais diversa dentro de Coleoptera, compreendendo mais de 45.000 espécies catalogadas. Esses besouros são notáveis por serem predadores e, em sua maioria, habitarem ambientes aquáticos (Ferreira-Jr et al., 2014; Beutel et al., 2020; Baca et al., 2021). O que os distingue de outras subordens são características anatômicas específicas, tais como: i) um segundo esternito abdominal exposto e esclerotizado; ii) metacoxas aumentadas, relativamente

imóveis e alinhadas no mesmo plano do metatórax e abdômen; e iii) a presença de glândulas pigidiais de defesa (Lawrence & Newton, 1982).

A subordem Adephaga compreende onze famílias, dentre as quais oito são predominantemente aquáticas, enquanto três são adaptadas a ambientes terrestres úmidos, sem apresentar qualquer estágio de vida diretamente associado a habitats aquáticos (Baca et al., 2021; Vasilikopoulos et al., 2021). Inicialmente, Adephaga era subdividida em Hydradephaga e Geadephaga, baseando-se nesses hábitos distintos. No entanto, estudos morfológicos e moleculares ratificaram o monofiletismo de Geadephaga, enquanto apontam Hydradephaga como um grupo parafilético. Esses estudos também posicionam Gyrinidae como irmã das demais famílias de Adephaga (Gustafson et al., 2020; Beutel et al., 2020; Baca et al., 2021). Adicionalmente, sugeriu que o ancestral de Adephaga originalmente habitava ambientes aquáticos, havendo uma transição de hábitat em direção a ambientes terrestres por parte do grupo Geadephaga (Beutel et al., 2020).

1.3. Noteridae Thomson, 1857

Os representantes da família Noteridae, pertencente à Adephaga, são popularmente conhecidos como besouros escavadores. Os noterídeos possuem todas as fases de vida em ambiente aquático, principalmente em poças rasas com matéria orgânica em decomposição. Eles podem construir túneis no substrato lamacento e viver em detritos, raízes de plantas vasculares ou em associação com algas filamentosas. A alimentação das larvas é composta por tecidos vegetais e os adultos são carnívoros ou detritívoros, se alimentando de larvas de quironomídeos, oligoquetos ou artrópodes mortos (Roughley, 2000; Dettner, 2005; Ferreira-Jr et al., 2014; Casari et al., 2024).

Noteridae tem ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais e possui 14 gêneros distribuídos em três subfamílias: Noterinae, Notomicrinae e Phreatodytinae (Nilsson, 2011; Gómez & Miller, 2013). No Brasil são encontrados representantes de Noterinae e Notomicrinae, contendo 12 gêneros (Costa et al., 2023). Os adultos variam de 1,0 a 5,8 mm em tamanho, têm coloração castanha à preta e a diagnose do grupo é feita por meio do corpo ovalado a elíptico, convexo no dorso e achatado ventralmente, sendo mais largo no terço anterior e, em sua maioria, há uma plataforma ventral entre o metaesterno e as metacoxas (Ferreira-Jr et al., 2014; Casari et al., 2024).

Noteridae já foi considerada uma subfamília de Dytiscidae, mas, após estudos morfológicos e moleculares, foi realocada para o status de família (Roughley, 2000; Miller, 2009). Ambas famílias pertencem a superfamília Dytiscoidea e seus representantes possuem pelo menos uma fase de vida em ambiente aquático (Ferreira-Jr et al., 2014). Baca et al. (2021) apresentaram a seguinte filogenia para Dytiscoidea (Meruidae + Noteridae) + (Dytiscidae + (Hygrobiidae + (Aspidytidae + Amphizoidae)).

1.4. *Liocanthydrus mecespilus* Guimarães & Ferreira-Jr, 2015

O gênero *Liocanthydrus* Guignot, 1957 está classificado na subfamília Noterinae, tribo Noterini, destacando-se dos outros gêneros de Noterini devido a características como: i) um processo prosternal amplamente truncado com uma leve projeção sutural póstero-medial; ii) um ângulo ântero-apical no metafêmur que possui uma fileira estreita e linear de cerdas longas; iii) margens pronotais lisas e um cordão pronotal amplo; e iv) um esporão metatibial posterior liso, sem serrilhados (Baca et al., 2014). Inicialmente, esse gênero foi considerado um subgênero de *Canthydrus*. Porém, estudos conduzidos por Miller (2009) elevaram sua classificação para a categoria de gênero. Além disso, observou-se que os exemplares-tipo do gênero *Siolius* compartilham características com *Liocanthydrus*, formando um grupo monofilético, resultando na sinonimização de *Siolius* (Baca et al., 2014). *Liocanthydrus* é composto por nove espécies descritas, todas exclusivas da América do Sul. Destas, seis são encontradas no Brasil, incluindo *Liocanthydrus mecespilus* com distribuição na região Sudeste do Brasil, sendo caracterizada por faixas posteriores e anteriores bastante alongadas, além de uma franja no lobo lateral esquerdo do edeago (Guimarães & Ferreira-Jr, 2015).

1.5. Morfologia espermática e filogenia

Nos estudos evolutivos, principalmente relacionados à filogenia, estão os estudos espermáticos. Os espermatozoides são células altamente especializadas que desempenham um papel crucial na transmissão de informações genéticas ao longo das gerações (Higginson & Pitnick, 2011). Cada espécie possui uma morfologia única em seus espermatozoides, o que os torna elementos distintivos, podendo ser decisivos na identificação e, especialmente, na separação taxonômica (Philips, 1970).

Em Hexapoda não é diferente, as descobertas e análises com espermatozoides em insetos têm lançado luz sobre a compreensão mais profunda da biologia reprodutiva e evolutiva desses artrópodes (Dallai et al., 2016). Estudos sobre a diversidade morfológica e funcional focados em morfologia espermática, polimorfismo, formação de feixes conjugados e comportamento pós-cópula, destacam a importância dos espermatozoides para os estudos evolutivos (Higginson & Pitnick, 2011; Dallai et al., 2016; Gottardo et al., 2016).

1.6. Sistema reprodutor masculino e morfologia espermática em Adephaga

Os sistemas reprodutores masculinos das famílias da subordem Adephaga em geral são compostos por um par de testículos unifoliculares (Breland & Simmons, 1970; Schubert et al., 2017; Gómez et al., 2023; Mercati et al., 2023). De cada testículo sai um ducto deferente, que pode ter porções diferenciadas servindo como vesícula seminal (Schubert et al., 2017), onde os espermatozoides são armazenados (Dallai et al., 2019). Um par de glândulas acessórias variando em tamanho e formato (Breland & Simmons, 1970; Sasakawa, 2007; Schubert et al., 2017; Salazar et al., 2022; Mercati et al., 2023) e um ducto ejaculatório.

Os espermatozoides de insetos, de maneira geral, apresentam uma estrutura distintiva composta por uma cabeça conectada a um flagelo. A região da cabeça é formada pelo acrossomo e o núcleo (Pitnick et al., 2008). Os espermatozoides dos indivíduos de Adephaga relatados até o momento podem medir de 80 μm a 2.700 μm (Dallai et al., 2020; Gómez et al., 2023). O acrossomo tem formato variando de sino, cilíndrico, seta ou irregular com projeções (Mackie & Walker, 1974; Dallai et al., 2019; Dallai et al., 2020), com raras exceções, há indivíduos com ausência dessa estrutura, como por exemplo *Anillus florentinus* (Carabidae: Bembidini) (Dallai et al., 2020). O núcleo possui de 5 μm à 50 μm de comprimento (Dallai & Afzelius, 1987; Dallai et al., 2020) e também exibe diversos formatos como sino, seta, capuz e cilíndrico (Werner, 1976; Dallai & Afzelius, 1985; Dallai et al., 2023), além de seguir em paralelo aos componentes do flagelo em alguns representantes de Carabidae (Dallai et al., 2020).

Dentre as famílias de Adephaga, apenas para Gyrinidae, Carabidae, Cicindelidae e Dytiscidae há dados sobre a morfologia de espermatozoides e os tipos de conjugação espermática (Fig.1). Nas outras famílias da subordem, há dados apenas sobre a morfologia do sistema reprodutor feminino em Noteridae (Miller, 2009;

Higginson et al., 2012). A conjugação espermática pode ser considerada uma característica de Adephaga devido a sua frequência nas famílias já descritas (Gyrinidae, Carabidae e Dytiscidae) (Higginson et al., 2012; Sasakawa, 2020; Gómez et al., 2023). A conjugação é a junção de dois ou mais espermatozoides e ocorre em diversos grupos como mamíferos e gastrópodes, além de insetos (Pitnick et al., 2008; Higginson et al., 2012). Sua função está relacionada à motilidade e transporte dos espermatozoides até o trato reprodutivo da fêmea (Pitnick et al., 2008; Mercati et al., 2023). A conjugação acontece de duas formas: (i) quando os espermatozoides de um mesmo cisto deixam os testículos e mantêm em feixes nas vesículas seminais. Esse tipo de feixe é chamado de espermatodesma ou conjugação primária; (ii) quando espermatozoides isolados, de cistos diferentes ou não, se agrupam nos ductos deferentes através de uma estrutura proteica (Pitnick et al., 2008; Higginson et al., 2012; Salazar et al., 2022; Mercati et al., 2023). Esse tipo é chamado de conjugação secundária ou espermatozeugma. Ambas conjugações, primária e secundária, podem ter diversas formas de unirem os dois ou mais espermatozoides, a saber: espermatostilo, rouleaux ou apenas unidos por material extracelular (Pitnick et al., 2008). Em Adephaga há variações principalmente na morfologia do espermatostilo, sendo encontrados tipos como bastonete, haste, formato de sino ou gorro e extensões laminares (Gómez & Maddison, 2020; Sasakawa, 2019; Dallai et al., 2020). Dentro de cada família é possível encontrar diferentes tipos de conjugação; em Gyrinidae (Fig. 1A), por exemplo, é encontrada a conjugação por espermatostilo, na qual há um bastão proteico ou glicoproteico onde os espermatozoides se aderem pela região da cabeça (Breland & Simmons, 1970; Salazar et al., 2022).

Exemplos de conjugação com espermatostilo também foram observados em Carabidae (Fig. 1C), na qual o formato e o tipo de espermatostilo variou de acordo com a subfamília ou tribo. Carabinae, Brachinae e Elaprinae, por exemplo, possuem um espermatostilo curto e robusto que une todos os espermatozoides em uma mesma direção formando um sino ou gorro, por onde as cabeças são acopladas (Schubert et al., 2017; Dallai et al., 2019, 2020; Gómez & Maddison, 2020; Sasawa, 2020). Em alguns representantes de Harpalinae o espermatostilo tem formato de espiral, com o espiralamento para a esquerda ou direita de acordo com a espécie (Sasakawa, 2007, 2019). Já na tribo Demetriandini (Lebiinae) e representantes da subfamília Pterostichinae o espermatostilo tem projeções laminares, que em corte transversal observa-se estruturas similares a câmaras envolvendo os espermatozoides (Hodgson

et al., 2013; Dallai et al., 2019, 2020). Por outro lado, em algumas subfamílias de Carabidae, como Nebrinae e Trechinae, a conjugação espermática não foi observada (Sasakawa, 2019, 2020; Dallai et al., 2020; Gómez & Maddison, 2020). Espermatozoides livres também foram observados em Cicindelidae (Fig. 1D) por Dallai et al. (2020) e Sasakawa (2020).

Em Dytiscidae (Fig. 1B), ocorrem diversos tipos de conjugação, podendo os espermatozoides estarem organizados em pares (Higginson et al., 2012) ou feixes. Nas subfamílias Colymbetinae e Dytiscinae foi observado a união de dois ou mais espermatozoides pelas cabeças a um material eletro-denso globoso (Mackie & Walker, 1974; Dallai & Afzelius, 1987). Outros exemplos de conjugação foram observados em Hydroporinae, apresentando espermatoestilo (Mercati et al., 2023), dois ou mais espermatozoides ligados por material eletro-denso e sistema rouleaux, que consiste na inserção da cabeça de um espermatozoide na cabeça de outro (Higginson et al., 2012; Dallai et al., 2023; Mercati et al., 2023).

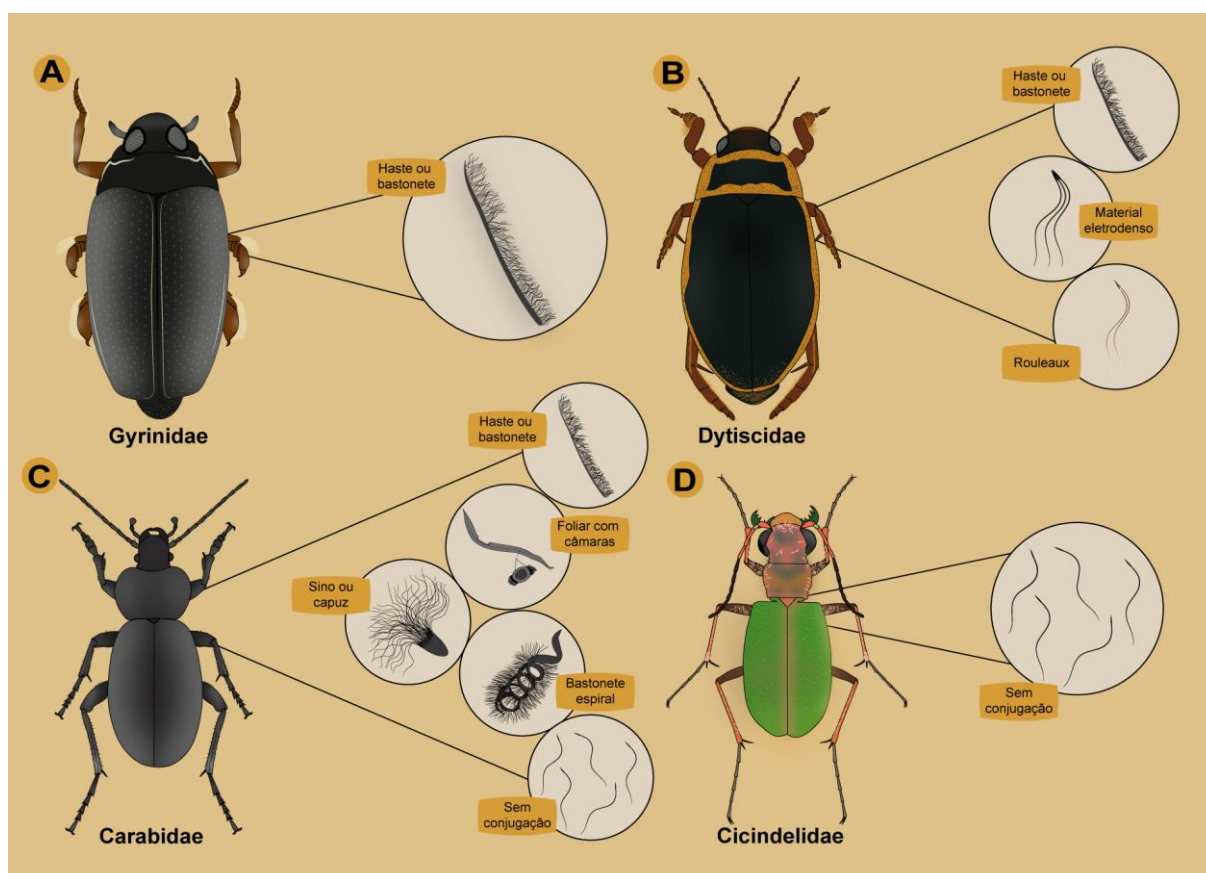


Figura 1 – Esquema com os tipos de conjugação espermática encontrados em Adephaga. A) Conjugação encontrada em Gyrinidae. B) Conjugações encontradas em Dytiscidae. C) Conjugações encontradas em Carabidae. D) Ausência de conjugação encontrado em Cicindelidae.

2. OBJETIVOS

Descrever a morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides presentes em *Liocanthyrus mecespilus* (Noteridae).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

10 machos de *L. mecespilus* foram coletados em lagos no município de Paula Cândido, Minas Gerais, Brasil (20°49'44.3"S 42°53'55.1"W) nos meses de agosto e setembro de 2023. A identificação dos espécimes foi realizada pelo professor Dr. Nelson Ferreira-Júnior da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, especialista em coleópteros aquáticos, principalmente os representantes da subordem Adephaga. O desenvolvimento do projeto, desde dissecação do material, análise e fotodocumentação, foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa – UFV, *campus* Viçosa, MG.

3.1. Morfometria dos espermatozoides

Os espermatozoides de quatro indivíduos foram extraídos da porção final dos testículos e das vesículas seminais em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2. Gotas dessa suspensão foram espalhadas sobre lâminas histológicas e deixadas secar em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas em água corrente e coradas com Giemsa por 20 minutos. A medição de comprimento dos espermatozoides foi feita usando o programa *Image J* (Rasband, 2008), e as médias foram calculadas a partir das medidas de 30 espermatozoides por indivíduo (N=120 células). Para visualizar os núcleos, as lâminas foram imersas em solução DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole 0,2 µ/mL em tampão PBS) por 30 minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente, no escuro. Então, foram cobertas com lamínulas usando sacarose a 50%. A fotodocumentação foi realizada em um microscópio Olympus BX-60 de epifluorescência equipado com filtro BP 360-370 nm e uma câmera fotográfica digital.

3.2. Histologia do sistema reprodutor masculino

Para a análise histológica, os sistemas reprodutores de cinco machos foram dissecados no mesmo tampão mencionado acima, acrescido com 3% de sacarose. A fixação do material foi em solução de glutaraldeído a 2,5% por 24 horas. Após esse período, o material foi lavado com água destilada, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Em seguida, ele foi lavado novamente em água destilada e desidratado em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%), infiltrado e incluído em historesina Leica (Alemanha). Após essas etapas, foram feitos cortes semifinos (0,5 e 1,0 μm) utilizando um micrótomo automático com navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina (por 30 s) ou Giemsa (por 30 min) e lavados em água corrente. A fotodocumentação do material foi feita usando o microscópio Olympus BX-60 com uma câmera fotográfica digital acoplada.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides

Em machos de *L. mecespilus* (Figura 2A-B) o sistema reprodutor é caracterizado por um par de testículos, um par de ductos deferentes, um par de vesículas seminais, um par de glândulas acessórias e um ducto ejaculatório (Figura 2C-D). Os testículos são unifoliculares, alongados (~2,0x0,5 mm) e delgados no seu ápice. Ambos se estendem ao longo de todo o abdômen, alcançando o início da região torácica.

Os ductos deferentes são curtos e finos (0,75x0,05 mm), cada um com uma porção dilatada no meio, formando a vesícula seminal (Fig. 2C-D). Eles partem da base dos testículos, unem-se aos ductos das glândulas acessórias e, posteriormente, se conectam ao ducto ejaculatório (Fig. 2E). As glândulas acessórias são oblongas alongadas na porção apico-medial, se bifurcam na porção medial em uma configuração em Y e dobram seus braços nessa mesma região (Fig. 2C-E).

Os espermatozoides de *L. mecespilus* (Fig. 3A) medem aproximadamente 675 μm de comprimento, desde o acrossomo até a extremidade do flagelo. Eles são encontrados na base dos testículos, onde já estão organizados em pares de células (Fig. 3A), mesma organização observada nas vesículas seminais. As cabeças dos espermatozoides pareadas são envoltas por uma substância densa que conecta os

dois núcleos, conferindo a esse conjunto uma estrutura esférica (Fig. 3A-D). Essa disposição dificultou a observação dos núcleos, mas é possível visualizar uma leve sombra deles na Figura 3B. Ainda, na coloração com DAPI foi possível destacar estruturas que provavelmente representam os núcleos (Fig. 3C). Adicionalmente, observou-se que o início de cada flagelo percorre integralmente, e em lados opostos, a estrutura esférica formada pelas duas cabeças e o material conectivo denso (Fig. 3D). No ápice dessa estrutura, quando corada com Giemsa, observa-se uma pequena região menos corada, aparentemente derivada do entrecruzamento das porções iniciais dos dois flagelos (Fig. 3B,D). Além disso, alguns poucos espermatozoides isolados, provavelmente decorrente da manipulação, foram observados (Fig. 3E). Nestes, o núcleo foi visível dentro do material conectivo denso e com a porção inicial do flagelo circundando o complexo cabeça-material conectivo, tal qual descrito para as duplas. Esta característica dos espermatozoides revelou que ao se unirem exibem uma disposição sobreposta de seus flagelos, formando uma configuração em "X" que abriga os núcleos no interior dessa matriz densa (Fig. 3F).

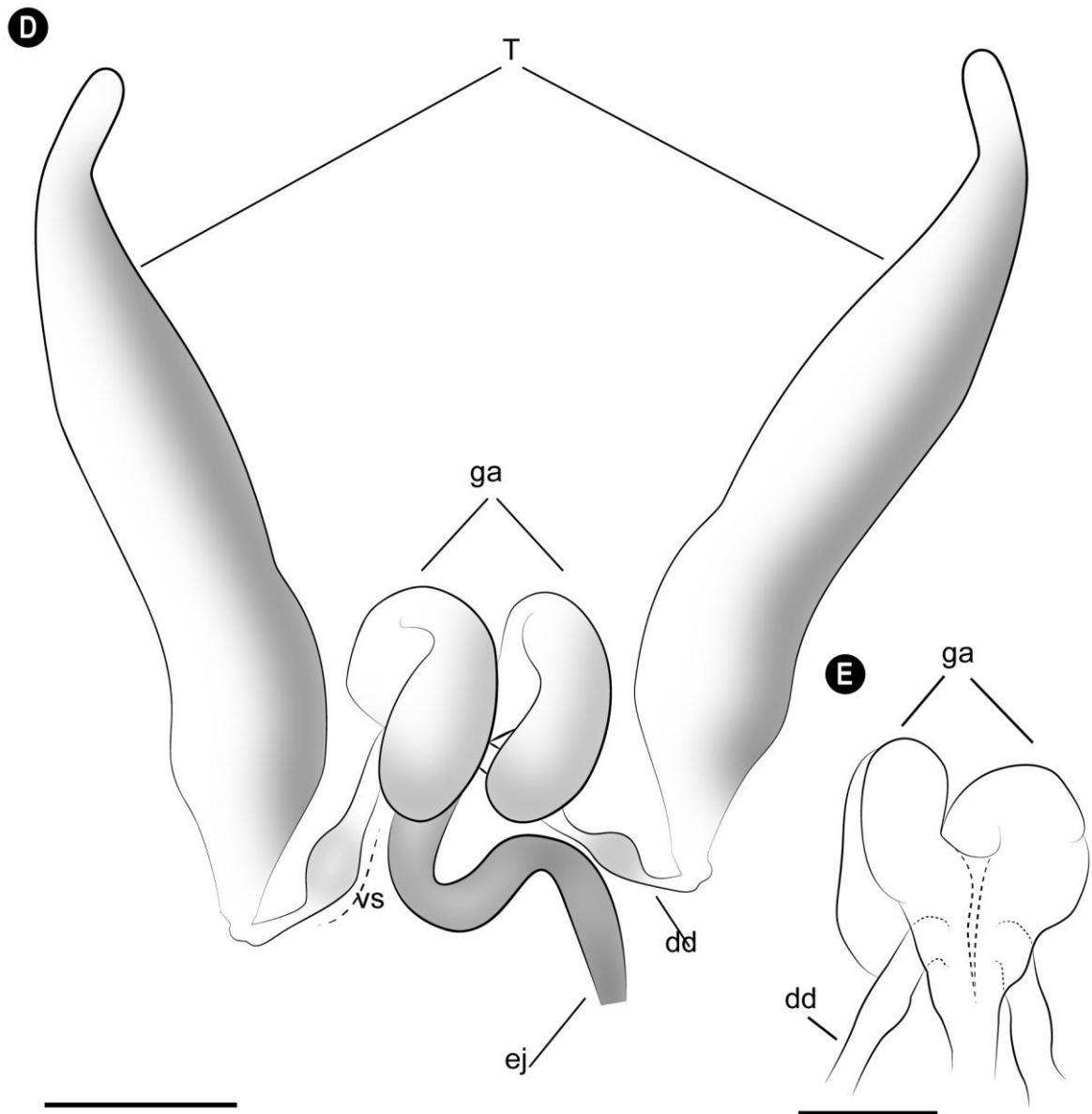
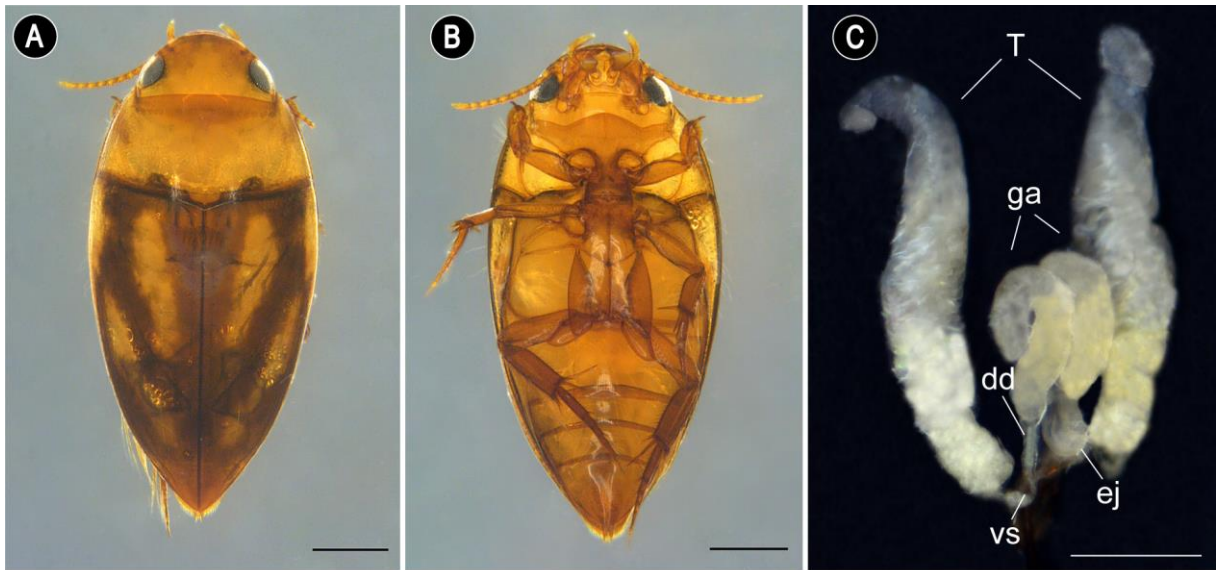


Figura 2 – Macho de *Liocanthyrus meespilus* e o seu sistema reprodutor. A, B) Vistas dorsal e ventral, esta última evidenciando as listras no élitro que caracterizam a espécie. C, D) Sistema reprodutor masculino em montagem total e em esquema, respectivamente. E) Detalhe das glândulas acessórias (ga) e encontro de seus respectivos ductos com os ductos deferentes (dd). T, testículos; vs, vesículas seminais; ej, ducto ejaculatório. Barras de escala: A-E=0,5 mm.

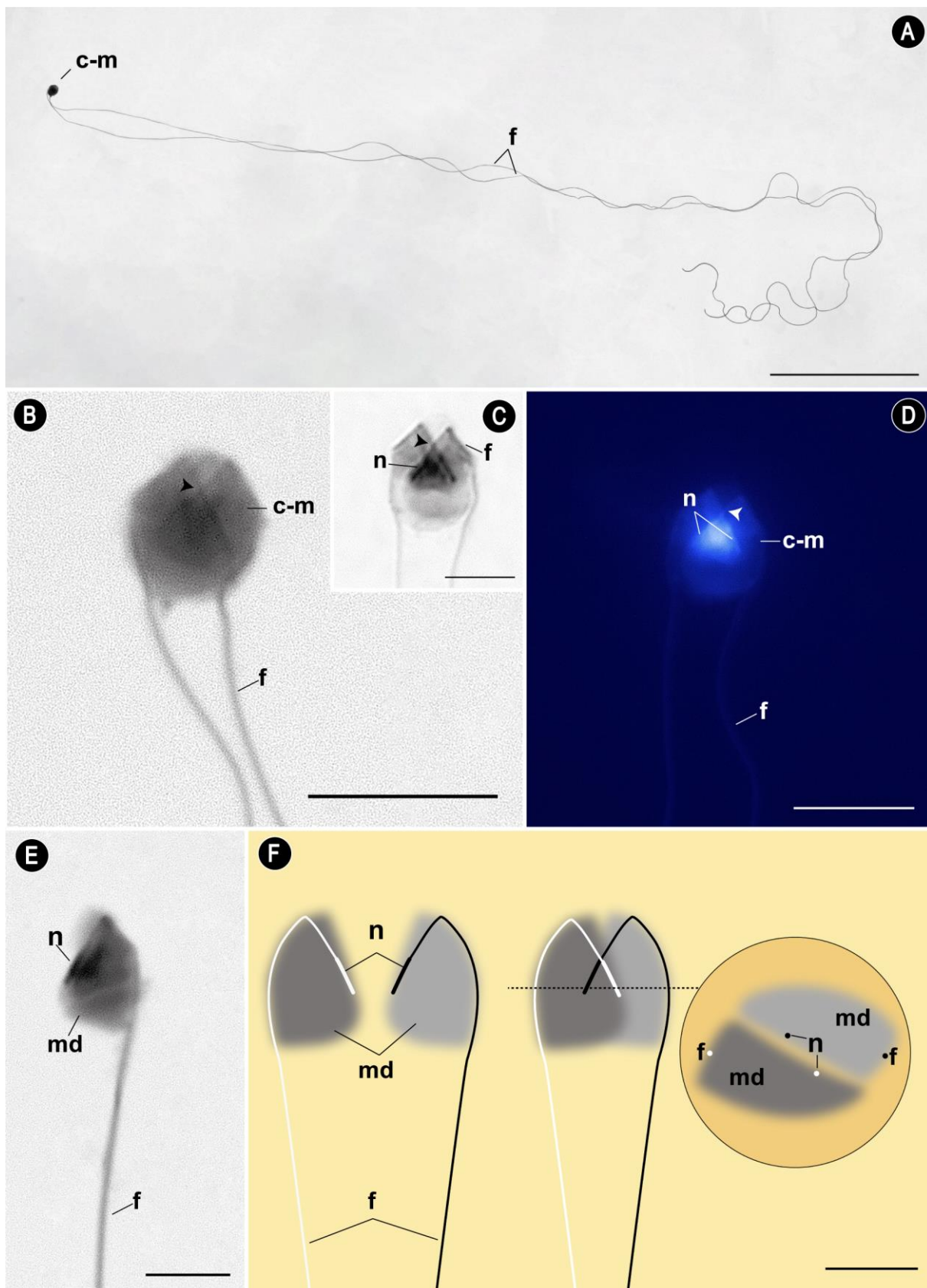


Figura 3 – Espermatozoides de *L. mecespilus*. A) Dupla de espermatozoides unidos pela cabeça. B, C) Detalhe do complexo cabeça-material conectivo (c-m) unindo os espermatozoides. Observe o encontro das cabeças no material denso (seta), as porções iniciais dos flagelos (f) circundando o c-m e o núcleo (n) de cada

espermatozoide. D) Complexo cabeça-material conectivo (c-m) corado com DAPI mostrando os núcleos (n) e o ponto de cruzamento entre eles. E) Espermatozoide isolado mostrando o núcleo (n) conectado ao material denso (md) e, do lado oposto, o flagelo (f). F) Esquemas de como as cabeças dos dois espermatozoides são unidas pelo material denso. Barras de escala: A=50 μm ; B-D=5 μm ; C-F=3 μm .

4.2. Histologia do sistema reprodutor masculino

O folículo único que forma cada testículo de *L. mecespilus* é preenchido por cistos que abrigam células germinativas nas diferentes fases da espermatogênese (Fig. 4A). Esses cistos estão dispostos sequencialmente: os mais jovens no ápice testicular, já aqueles com espermatozoides, na base dos testículos. Dessa forma, os testículos exibiram as três regiões denominadas de: zona de crescimento celular (z1), que se localiza no ápice testicular, onde a espermatogênese se inicia (Fig. 4B); a zona de maturação (z2) localizada aproximadamente na região mediana testicular (Fig. 4C) onde, nas espermátides, são observadas as estruturas denominadas nebenkern (nb) e o início do alongamento dos espermatozoides; e a zona de diferenciação (z3) no restante final do testículo (Fig. 4D) onde é visível o alongamento dos flagelos e compactação da cromatina no núcleo dos espermatozoides. Nesta última zona (z3), a organização dos espermatozoides em feixes espiralados é claramente observada (Fig. 4E). A porção final dos testículos, ao ser dissociada sobre lâminas histológicas, já mostra os espermatozoides agrupados em duplas, unidos pelo complexo cabeça-material conectivo. No entanto, em cortes histológicos apenas os feixes espermáticos espiralados são evidentes (Fig. 4E). Além disso, as células císticas que envolvem os feixes espermáticos nessa porção têm o núcleo bem evidente e cromatina em diferentes estados de compactação (Fig. 4E).

Ao término da espermiogênese os cistos podem ter até 512 espermatozoides, resultantes de cerca de 2^9 divisões celulares (Fig. 5B). Esses espermatozoides são encontrados em 256 duplas unidas por um material conectivo denso (Fig. 5A-C). A porção final do testículo é caracterizada por uma desorganização dos cistos (Fig. 5A), deixando evidente a estrutura que conecta as duplas espermáticas (Fig. 5C). Como a organização das duplas espermáticas acontece com espermatozoides originados do mesmo cisto, os feixes espermáticos que deixam os testículos são classificados como espermatodesmata (Fig. 5C).

Os ductos deferentes são delgados e relativamente curtos, apresentando uma porção mediana dilatada. Secções próximas à base do testículo mostram um epitélio simples, composto por células prismáticas com núcleos exibindo cromatina em diferentes níveis de compactação, evidenciando uma alta atividade metabólica (Fig. 6B). A porção mediana dilatada (Fig. 6A) de cada ducto representa uma vesícula seminal, cujo lúmen contém espermatozoides em pares, como são relatados na porção final dos testículos. Esses pares espermáticos continuam unidos pelo complexo cabeça-material conectivo, e em corte transversal é possível ver que os espermatozoides possuem porções referentes ao material denso de cada um deles e essas porções encaixam um espermatozoide no outro formando uma mesma estrutura (Fig. 6C).

As glândulas acessórias possuem um epitélio simples com células prismáticas, onde se observa núcleos localizados predominantemente na base das suas células e cromatina com diferentes níveis de compactação (Fig. 7A-B). Além disso, no citoplasma dessas células é possível observar diferentes grânulos em regiões distintas da glândula, indicando diferentes tipos celulares na produção das secreções (Fig. 7B). No lúmen das glândulas acessórias é possível observar no mínimo 3 tipos de secreções (Fig. 7B). Essas secreções são liberadas no seu lúmen a partir de diferentes regiões da glândula (Fig. 7B). Essas glândulas são revestidas por tecido muscular e conjuntivo, que, na porção médio-basal, une-as conferindo o formato de Y quando analisado anatomicamente. Mas, ao analisar fisiologicamente e histologicamente, essas glândulas seguiram distintas até o encontro com os ductos deferentes (Fig. 7C-D). Além do mais, observou-se um estreitamento entre a região que separa essas glândulas na porção de seus ductos (Fig. 7C) e um aumento das camadas celulares que os envolve. O encontro do ducto das glândulas acessórias com seus respectivos ductos deferentes foi observado antes delas se fundirem (Fig. 7D). Esse processo antecedeu a subsequente junção ao ducto ejaculatório.

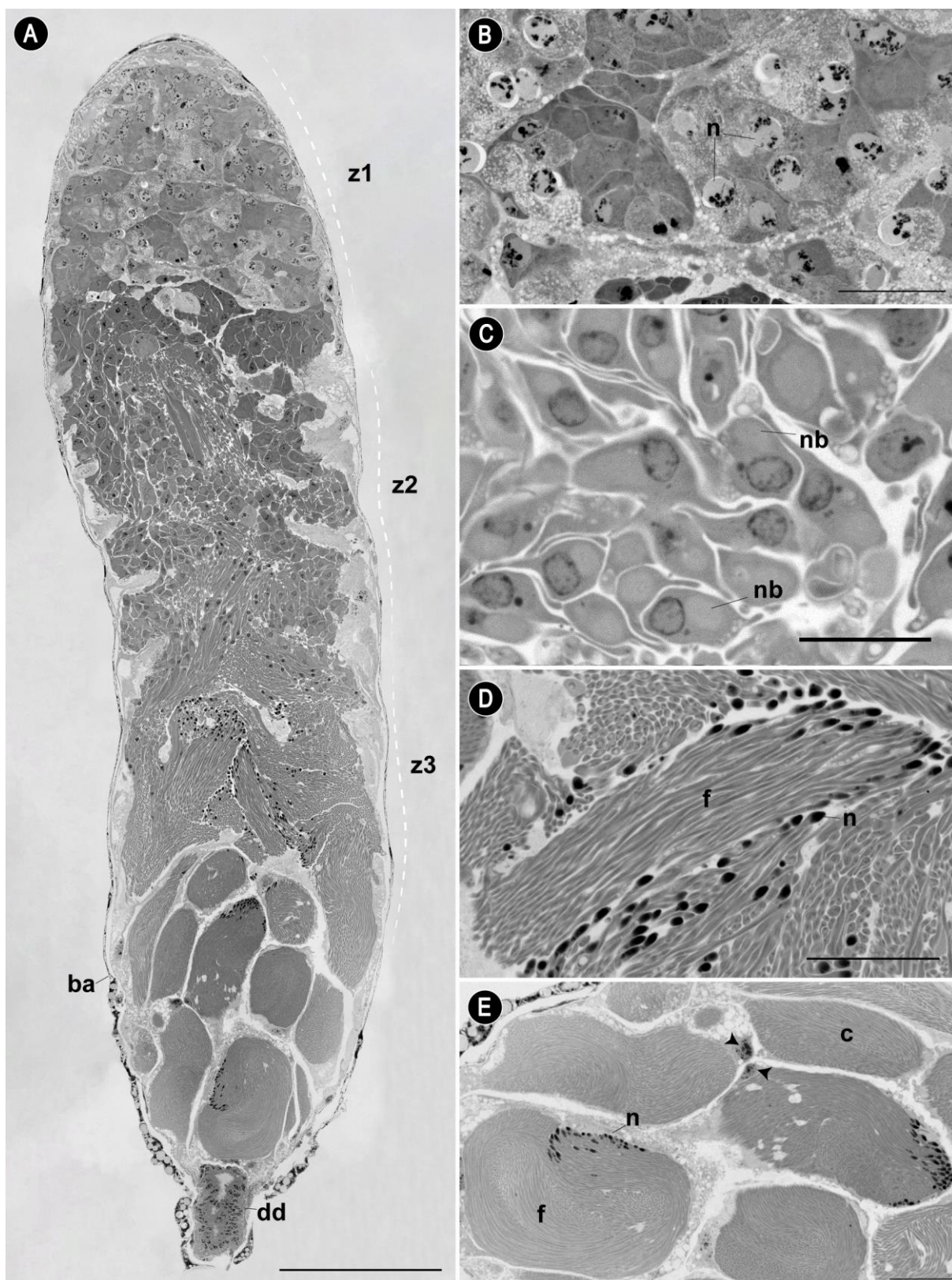


Figura 4 – A) Corte longitudinal de um testículo de *L. meespilus* mostrando cistos nas diferentes fases da espermatogênese e as zonas de crescimento (z1), de maturação (z2) e de diferenciação (z3). Note a mudança na espessura da bainha (ba) que reveste o folículo na porção final e encontro com o ducto deferente (dd). B) Espermatogônias com a cromatina com diferentes níveis de compactação nos núcleos (n). C) Espermatócitos com os nebenkern (nb) evidenciados. D) Alongamento do

flagelo (f) e heterocromatina em evidência. E) Feixes espermáticos com núcleo e flagelo exibidos nos cistos (c). Note o núcleo das células císticas (seta) com cromatina em diferentes graus de compactação. Barras de escala: A=100 μm ; B-D= 20 μm ; C=10 μm ; E=50 μm .

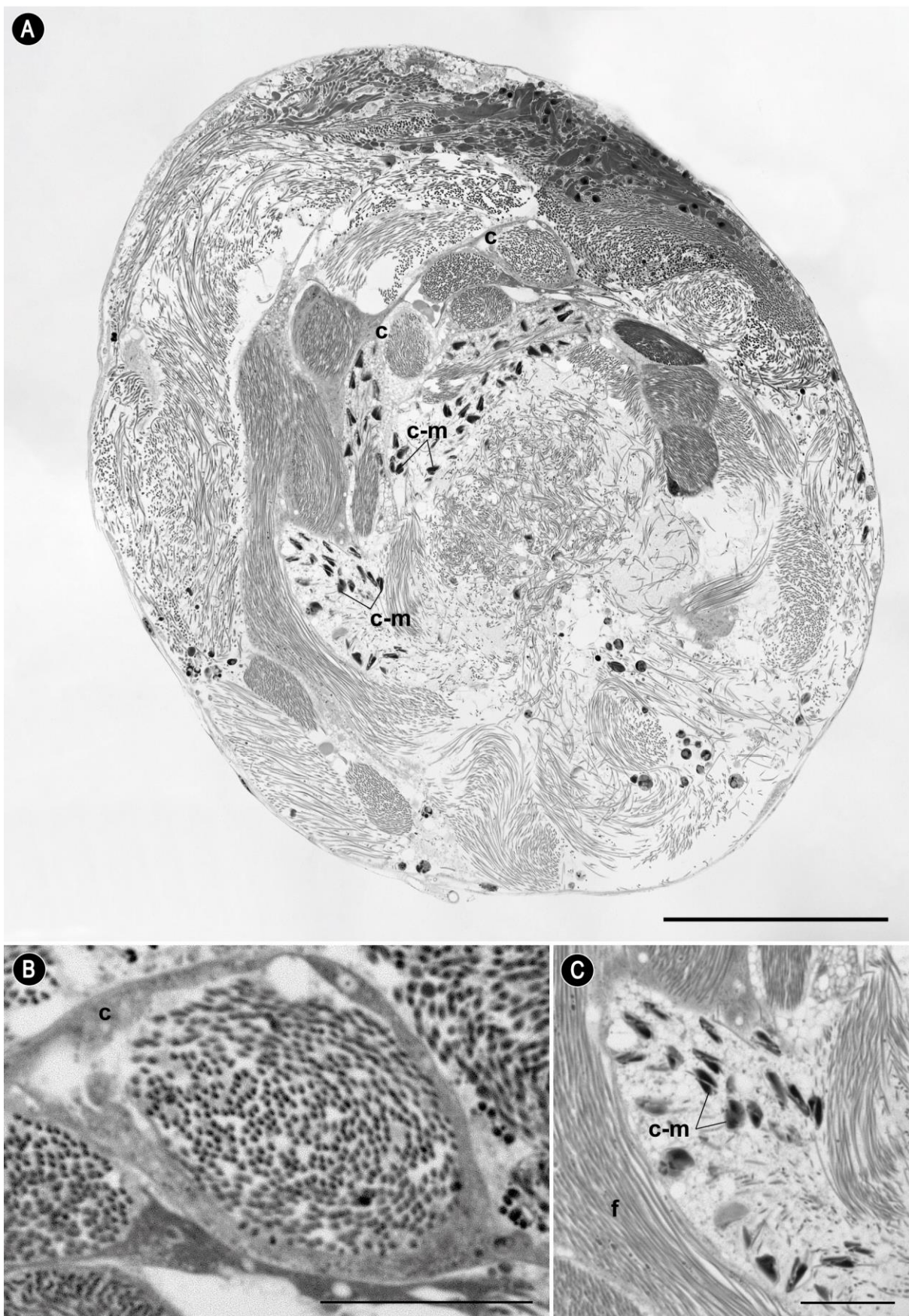


Figura 5 – A) Corte transversal na região basal de um testículo de *L. meespilus* evidenciando os cistos se desorganizando (c) e os seus espermatozoides já

conjugados (c-m). B-C) Um cisto ainda individualizado com aproximadamente 512 espermatozoides (B) e uma região (C) mostrando os complexo cabeça-material conectivo indicando que nessa região testicular os espermatozoides já estão pareados por suas cabeças. Flagelo = f. Barras de escala: A=50 μm ; B-C=10 μm .

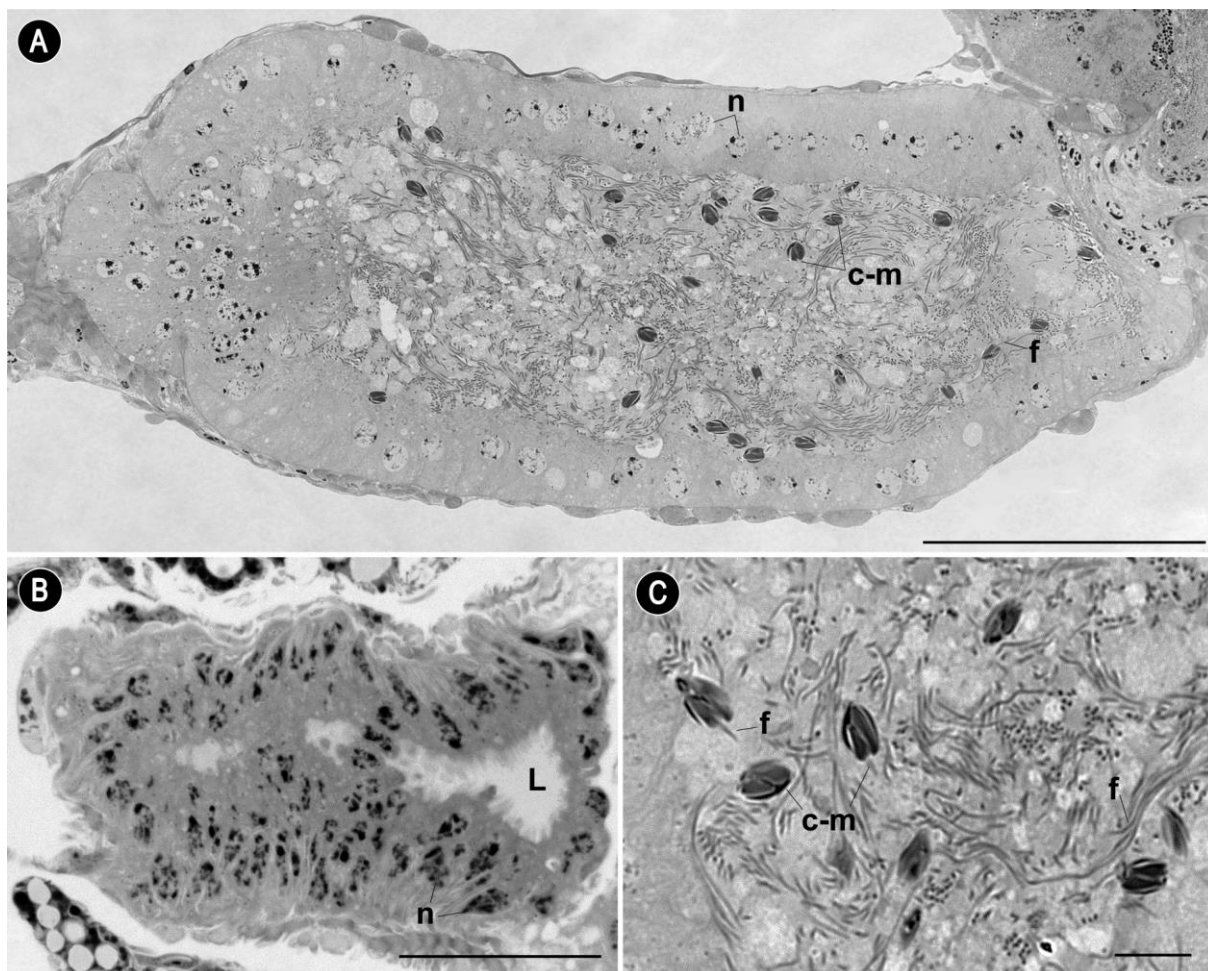


Figura 6 – Cortes longitudinais de um ducto deferente na região da vesícula seminal de *L. meespilus*. A) Vesícula seminal mostrando os complexos cabeça-material conectivo (c-m), estruturas que unem os pares de espermatozoides. B) Início do ducto deferente a estreita luz (L) sem espermatozoides e os núcleos (n) das longas células epiteliais. C) Uma região da luz vesicular mostrando os complexos cabeça-material conectivo (c-m) em maior aumento. f, flagelos; n, núcleos das células epiteliais. Barras de escala: A=50 μm ; B=20 μm ; C=5 μm .

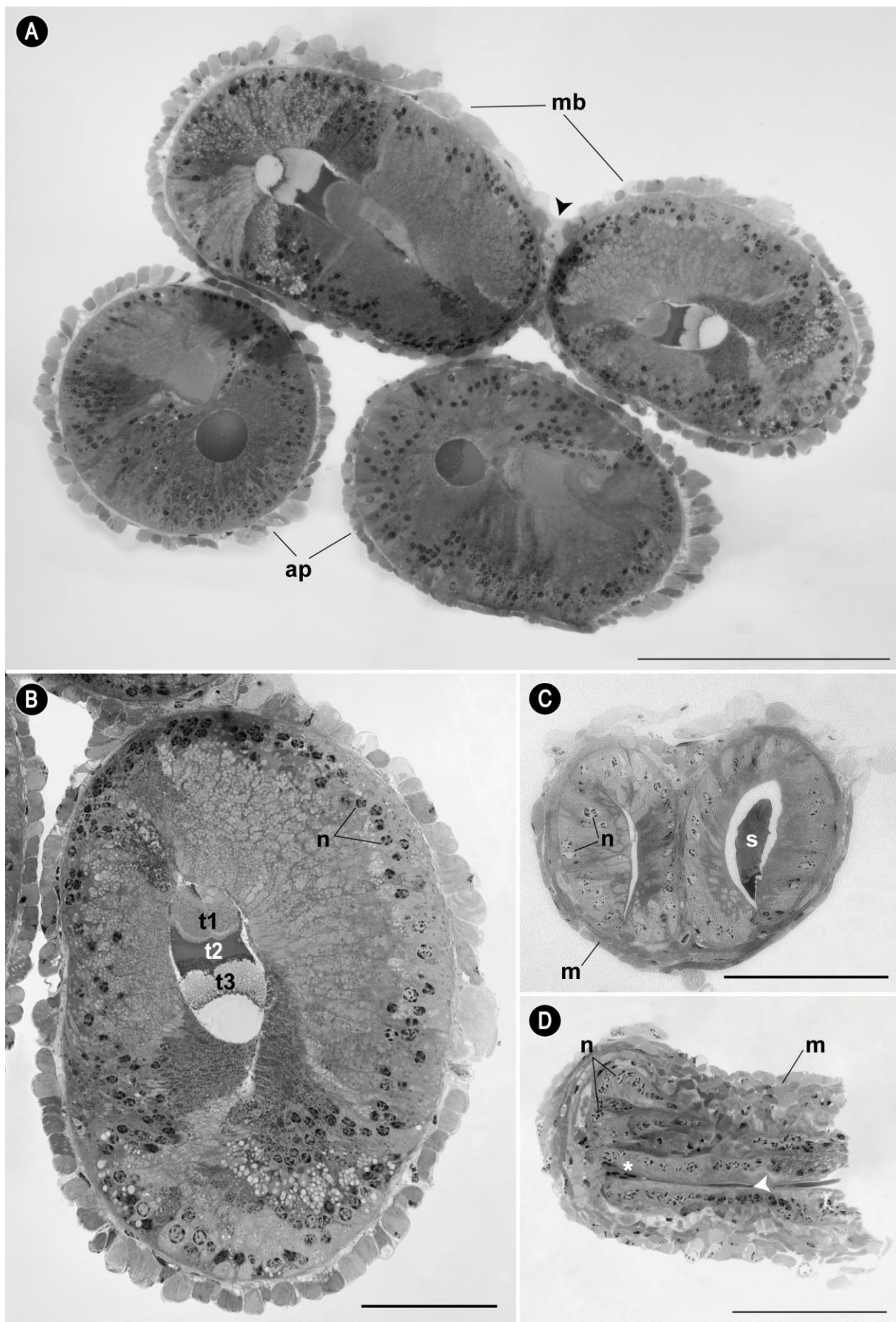


Figura 7 – A) As duas glândulas acessórias de *L. mecespilus* cortadas transversalmente nas porções apical (ap) e médio-basal (mb). A seta mostra que

basalmente as duas glândulas são unidas por tecidos conjuntivo e muscular (m). B) Porção médio-basal de uma das glândulas da figura anterior em maior aumento evidenciando os diferentes tipos de secreção na sua luz (t1, t2 e t3). C) Estreitamento entre os ductos glandulares e aumento das camadas do tecido que os reveste. D) Região de encontro do ducto de uma das glândulas (*) com o ducto deferente (seta). n, núcleo; s, secreção; m, tecido muscular. Barras de escala: A=100 μm ; B=30 μm ; C-D=50 μm .

5. DISCUSSÃO

Os indivíduos de *L. mecespilus* possuem um sistema reprodutor contendo um par de testículos unifoliculares, um par de ductos deferentes, cada um com uma dilatação mediana representando uma vesícula seminal, um par de glândulas acessórias e um ducto ejaculatório. Além disso, seus espermatozoides se encontram conjugados aos pares ligados por um material denso circundado pelo flagelo e seus núcleos inseridos no mesmo. Esses espermatozoides conjugados pertencem ao mesmo cisto e são encontrados unidos no final do testículo, seguindo com essa mesma configuração para o ducto deferente.

Em Coleoptera têm sido observado variações no formato e quantidade de folículos por testículo. Essa variação pode ser até mesmo dentro de famílias, como em Tenebrionidae, na qual já foi observado de seis a 60 folículos por testículo (Dias et al., 2013). Porém, para Adephaga, subordem na qual estão os Noteridae, tem sido descrito apenas um folículo por testículo com variação apenas no formato, desde tubulares e enrolados em formato globular ou disco descritos para Carabidae, Gyrinidae e *Stictonectes optatus* (Dytiscidae) (Breland & Simmons, 1970; Kaur, 1972; Sasakawa, 2007; Schubert et al., 2017; Salazar et al., 2022; Gómez et al., 2023; Mercati et al., 2023), ou delgados e dobrados descritos para *Scarodytes halensis* (Dytiscidae) (Mercati et al., 2023). Os testículos de *L. mecespilus* são delgados, tal qual os outros representantes de Adephaga, mas não se dobram ou enrolam, seguindo retos até a porção inicial torácica.

O tamanho do folículo e a quantidade de folículos por testículo podem estar relacionados ao tamanho dos espermatozoides. Quanto menos folículos por testículo, maiores são os mesmos em relação ao tamanho do corpo do indivíduo, ocupando um menor espaço e podendo produzir espermatozoides relativamente grandes (Hiroyoshi & Reddy, 2021). Isso foi observado nas descrições das outras famílias de Adephaga

e em *L. mecespilus*, cujos espermatozoides medem aproximadamente 675 μm e seus testículos unifolículos medem cerca de 2 mm, o que equivale à metade do tamanho do corpo desse besouro. O contrário é observado em indivíduos que possuem mais folículos por testículo, como em *Lagria villosa* (Tenebrionidae), para acomodar os seus 60 folículos por testículo, estes folículos são pequenos e fusiformes e produzem espermatozoides que medem cerca de 80 μm de comprimento (Dias et al., 2013).

O par de glândulas acessórias de *L. mecespilus* são alongadas e dobradas no meio. Essa mesma quantidade de glândulas acessórias é descrita em outras famílias de Adephaga, a saber: Gyrinidae, Carabidae e Dytiscidae. Novamente, as variações encontradas nessas estruturas estão relacionadas ao seu formato, sendo delgadas em *Limodromus assimilis* (Carabidae) (Schubert et al., 2017), sinuosas em espécies de Pterostichini (Carabidae) (Sasakawa, 2007), alongadas e pontiagudas em Rhysodinae (Carabidae) (Gómez & Maddison, 2020), e alongadas e dobradas em *Stictonectes optatus* e *Scarodytes halensis* (Dytiscidae) (Mercati et al., 2023). O formato dobrado encontrado em Dytiscidae se assemelha ao encontrado em Noteridae, mas com diferença na união das glândulas por tecido muscular e conjuntivo. Em Dytiscidae o revestimento das glândulas segue cada glândula totalmente separadas, ao contrário de *L. mecespilus*, cujas glândulas estão unidas na porção médio-basal por tecido muscular e conjuntivo formando um “Y”.

A literatura acerca de descrições morfológicas do sistema reprodutor masculino de Noteridae são escassas, porém em outras espécies dessa mesma família, é possível perceber que há um padrão de organização dessas estruturas, o qual se assemelha ao que observamos em *L. mecespilus*, com mudanças apenas no comprimento e volume dos testículos e grau de sinuosidade das glândulas (Observação pessoal, 2023).

A partir da análise histológica dos testículos de *L. mecespilus* é possível supor que a produção de espermatozoides é contínua ao longo da vida adulta (sinspermiogênicos), pois se observou todos os estágios de desenvolvimento das células germinativas. Esta característica foi descrita em outros representantes de Coleoptera, como Tenebrionidae, Ciidae, Curculionidae, Chrysomelidae, Ptinidae, Lucanidae, Buprestidae e Dryophthoridae (Kubo-Irie et al., 2000; Dias et al., 2012; Paoli et al., 2014; Çağlar et al., 2020; Folly et al., 2021; Gao et al., 2021; Koçakoğlu et al., 2021; Reis et al., 2021; Koçakoğlu et al., 2022). A espermatogênese encontrada em Noteridae e nas outras famílias citadas, pode ser um dos fatores associados ao tempo

de vida desses indivíduos, visto que, os adultos podem sobreviver por meses se as condições ambientais forem favoráveis, contribuindo assim, para o sucesso reprodutivo das espécies (Hilsenhoff, 1992). Contudo, há famílias em Coleoptera como Lampyridae e Cantharidae cuja espermatogênese inicia na fase larval e/ou pupal e, quando adulto, não se observa células germinativas em outras fases que não espermatozoides maduros nos testículos ou nas vesículas seminais (Comunicação pessoal, Costa & Nascimento, 2024). Esses besouros possuem o tempo de vida curto quando adultos e, com todos os espermatozoides já produzidos, eles podem copular com várias fêmeas em um curto espaço de tempo (Ramsdale, 2002). Dessa forma, o seu fitness reprodutivo pode se aproximar daquele dos indivíduos de vida adulta longa com produção contínua de espermatozoides. Além disso, fatores como tipo de habitat, disponibilidade de fêmeas, dinâmica reprodutiva e tamanho da vesícula seminal também devem ser levados em consideração.

A quantidade de espermatozoides em cada cisto também é um fator importante para o entendimento da biologia reprodutiva dos indivíduos. Em *L. mecespilus* são cerca de 512 células por cisto, que, ao final da espermiogênese, resultam em até 256 pares de espermatozoides, com cerca de 675 μm de comprimento cada, ligados pelas cabeças por um material denso formando uma estrutura oval (ver Fig. 3A). Esse tipo de conjugação auxilia para que o dobro de espermatozoides irmãos consiga chegar ao trato reprodutivo da fêmea, o que eleva o sucesso reprodutivo da espécie (Pitnick et al., 2008). Ainda, o material conectivo pode ser uma forma do macho transferir nutrientes para a fêmea e garantir que a espermateca dela fique preenchida com seus espermatozoides.

A conjugação espermática ocorre com frequência em outras famílias de Adephaga, em descrições de Gyrinidae, Carabidae e Dytiscidae. Essa união pode ser de dois ou mais espermatozoides originados do mesmo cisto ou de cistos diferentes e, ainda, pode ser feita por rouleaux, material extracelular ou espermatostilo, este, com variações no seu formato, a saber: bastonete, haste, sino ou gorro e extensões laminares (Pitnick et al., 2008; Gómez & Maddison, 2020; Sasakawa, 2019; Dallai et al., 2020). Espermatozoides conjugados aos pares cuja região da cabeça está ligada por material denso, como encontrados em *L. mecespilus*, também ocorrem em Colymbetinae e Dytiscinae, subfamílias de Dytiscidae (Werner, 1976; Dallai & Afzelius, 1985; Dallai & Afzelius, 1987). Contudo, a diferença de *L. mecespilus* para os representantes de Dytiscidae está na disposição dos núcleos dos espermatozoides

no material denso que as envolve. Enquanto que *L. mecespilus* as porções iniciais dos flagelos circundam o material conectivo no interior do qual as cabeças dobradas e cruzadas estão embebidas (ver Fig. 3B-F), nos representantes de Dytiscidae, os núcleos espermáticos são dispostos paralelamente no material denso a partir do qual os flagelos emergem sem envolver um complexo globular (Werner, 1976; Dallai & Afzelius, 1985; Dallai & Afzelius, 1987). Essa peculiaridade em Noteridae adiciona uma camada de complexidade à compreensão da estrutura dos espermatozoides na família, destacando a necessidade contínua de investigação para esclarecer os mecanismos subjacentes a essa configuração única encontrada em *L. mecespilus*.

A origem das conjugações encontradas nas famílias de Dytiscoidea pode seguir dois tipos: conjugados de espermatozoides do mesmo cisto, como encontrado em *L. mecespilus*, ou conjugados de espermatozoides originados em cistos diferentes. O primeiro tipo é encontrado também em *Colymbetes fuscus* (Dytiscidae), com a união de 3 ou mais espermatozoides por um material granuloso (Dallai & Afzelius, 1987), cuja origem da sua produção pode ser pelas células císticas. Em contrapartida, os espermatozoides de *Acilius sulcatus* e *Melanodytes pustulatus* (Dytiscidae) só formam conjugados quando estão no ducto deferente, portanto entre espermatozoides com origem em cistos diferentes (Werner, 1976; Dallai & Afzelius, 1987), além do material denso que une esses espermatozoides ser formado a partir de secreções do ducto deferente. Isso demonstra que há variações dentro da superfamília para a formação desses conjugados, contudo, há semelhanças no tipo de ligação entre os espermatozoides, observados em Dytiscidae e em *L. mecespilus*.

A porção final dos ductos deferentes, após as vesículas seminais, é curta e delgada até o encontro com os ductos das glândulas acessórias. Uma característica dessas glândulas é a união das mesmas na porção médio-basal pelos tecidos que as circundam, antes mesmo da fusão de seus lúmens. Essa região de união, se analisada apenas anatomicamente, induz a falsa interpretação de que os lúmens dos ductos glandulares se fundem antes da fusão de cada um deles com o respectivo ducto deferente. Mas, a análise histológica mostrou que inicialmente o ducto deferente e o ducto da glândula de cada lado se fundem, só então os dois ductos resultantes (um de cada lado) conectam-se ao ducto ejaculatório comum. A fusão dos ductos deferentes aos ductos glandulares antes mesmo destes se fundirem é observado em outros representantes de Adephaga, a saber: *Dineutus* sp. (Gyrinidae), Carabidae e Dytiscidae (Breland & Simmons, 1970; Will et al., 2005; Sasakawa, 2007; Hodgson et

al., 2012; Schubert et al., 2017; Mercati et al., 2023). Nas observações feitas nessas famílias não foi citada a presença da união das glândulas pelos tecidos que as circundam, como ocorrido em *L. mecespilus*. Além do mais, as análises realizadas em *Dineutus* sp. são apenas morfológicas, sendo necessárias observações histológicas para pontuar esse sistema de fusão como uma característica de Adephaga.

As glândulas acessórias de *L. mecespilus* são tubulares com diferentes tipos celulares que produzem mais de três tipos de secreção liberados no lúmen glandular. Esse par de glândulas pode ser classificado como merócrino, pois os ápices das células epiteliais se mostraram intactos e no seu lúmen não foi observado estruturas vesiculares (Happ, 1984). Além disso, os diversos tipos de secreções observados no citoplasma e lúmen dessas glândulas acessórias podem desempenhar funções, como: i) transporte, motilidade e nutrição dos espermatozoides; e ii) fornecer nutrientes para os machos e para as fêmeas (Happ, 1984; Kaulenas, 1992).

6. CONCLUSÃO

O sistema reprodutivo masculino dessa espécie possui características semelhantes à de outros Adephaga, como testículo unifolicular, região dos ductos deferentes como vesículas seminais, um par de glândulas acessórias cujo seus ductos se fundem posterior a fusão com os ductos deferentes e a conjugação espermática. Além disso, a conjugação espermática encontrada em *L. mecespilus* é semelhante àquela relatada para Dytiscoidea, com diferenças na disposição das cabeças dos espermatozoides e na estrutura que os unem. Estudos futuros com outros grupos dessa superfamília serão importantes para consolidar esse tipo de conjugação como característica de Dytiscoidea.

Ainda, o presente trabalho forneceu uma primeira visão sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de Noteridae, consolidando dados significativos que enriquecem o conhecimento sobre a biologia reprodutiva e a taxonomia desses besouros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baca, S.M., Gustafson, G.T., Alexander, A.M., Gough, H.M., Toussaint, E.F.A., (2021). Integrative phylogenomics reveals a Permian origin of Adephaga beetles. *Systematic Entomology*, 46, 968–990. doi: 10.1111/syen.12506
- Baca, S.M., Gustafson, G.T., Toledo, M., Miller, K.B. (2014). Revision of the Neotropical burrowing water beetle genus *Liocanthhydrus* Guignot (Coleoptera: Noteridae: Noterinae: Noterini) with the description of two new species. *Zootaxa*, 3793(2), 231–246. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3793.2.3>
- Beutel, R.G., Ribera, I., Fikáček, M., Vasilikopoulos, A., Misof, B., Balke, M. (2020). The morphological evolution of the Adephaga (Coleoptera). *Systematic Entomology*, 45(2), 378–395.
- Boudinot, B.E., Yan, E.V., Prokop J., Luo X.Z., Beutel R.G. (2022). Permian parallelisms: reanalysis of †Tshekardocoleidae sheds light on the earliest evolution of the Coleoptera. *Systematic Entomology*, 48, 69–96. doi:10.1111/SYEN.12562
- Breland, O.P., Simmons, E. (1970). Preliminary studies of the spermatozoa and the male reproductive system of some whirligig beetles (Coleoptera: Gyridae). *Entomology News*, 81, 101–110.
- Çağlar, Ü.Z.E.Y.İ.R., Koçakoğlu, N.Ö., Candan, S.E.L.A.M.İ. (2020). Histomorphological structure of male reproductive system in *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1761) (Coleoptera: Buprestidae). *Commagene Journal of Biology*, 4(2), 140–145. doi: 10.31594/commagene.797933
- Casari, S.A., Biffi, G., Ide, S. (2024). Coleoptera Linnaeus, 1758. pp: 575–698. In Rafael, J. A., Melo, G.A.R., Carvalho, C.J.B., Casari, S.A., Constantino, R. *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. 2ed, Editora INPA. <https://doi.org/10.61818/56330464>
- Costa, C., Monné, M.L., Ferreira-Jr, N. (2023). Noteridae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/108042>>. Acesso em: 04 Mai. 2023.
- Dallai, R., Afzelius, B.A. (1985). Membrane specializations in the paired spermatozoa of dytiscid water beetles. *Tissue and Cell*, 17(4), 561–572.
- Dallai, R., Afzelius, B.A. (1987). Sperm ultrastructure in the water beetles (Insecta, Coleoptera). *Bolletino Di Zoologia*, 54(4), 301–306. <https://doi.org/10.1080/11250008709355601>
- 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., Mercati, D., Fanciulli, P.P., Lupetti, P. (2023). Sperm Structure of the Diving Beetle *Deronectes moestus incospectus* (Leprieur, 1876) (Hydrophorinae,

- Dytiscidae) and Considerations on Extracellular Material Surrounding Sperm Bundles. *Micron*, 171, 103484. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2023.103484>
- Dallai, R., Mercati, D., Fanciulli, P.P., Petrioli, A., Lupetti, P. (2020). New findings on the sperm ultrastructure of Carabidae (Insecta, Coleoptera). *Arthropod Structure and Development*, 54, 100912. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.100912>
- Dallai, R., Mercati, D., Giglio, A., Lupetti, P. (2019). Sperm ultrastructure in several species of Carabidae beetles (Insecta, Adephaga) and their organization in spermatozuogmata. *Arthropod Structure and Development*, 51, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.05.001>
- Dettner, K. (2005). Noteridae Thomson, 1857. pp: 72–81. In: Beutel, R.G.; Leschen, R.A.B. (eds). Handbook of Zoology. Volume IV. Arthropoda: Insecta. Part 38. Coleoptera, Beetles. Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- Dias, G., Oliveira, C.M., Lino-Neto, J. (2013). Testicular and spermatogenic characteristics of *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae) with taxonomic inferences. *Tissue and Cell*, 45(4), 227–230. doi:10.1016/j.tice.2013.03.006
- 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. doi 10.1007/s00114-012-0949-6
- Ferreira-Jr, N.; Sampaio, B.H.L.; Fernandes, A.S.; Clarkson, B.; Braga, R.B.; Dos Santos, M.I.S.; Dos Passos, A. D. (2014). Ordem Coleoptera. pp: 349–375. In Hamada, N., Nessimian, J.L., Querino, R.B. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Manaus: Editora do INPA, 2014.
- Folly, C., Pecci-Madalena, I.S.C., Lopes-Andrade, C., Lino-Neto, L. (2021). The reproductive system of *Ceracis cornifer* (Mellié) and fist description of sperm structure in a minute tree-fungus beetle (Tenebrionoidea: Ciidae). *Arthropod Structure & Development*. 62, 101088. <http://doi.org/10.1016/j.asd.2021.101088>
- Gao J., Gao G., Wang J., Chen H. (2021). The Sperm Structure and Spermatogenesis of *Trypophloeus klimeschi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Biology*. 10(7), 583. <https://doi.org/10.3390/biology10070583>
- Goczał J., Beutel R.G. (2023). Beetle elytra: evolution, modifications and biological functions. *Biology Letters*, 19(3), 20220559. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0559>
- Gómez, R.A., Maddison, D.R. (2020). Novelty and emergent patterns in sperm: morphological diversity and evolution of spermatozoa and sperm conjugation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Morphology*, 281(8), 862–892. <http://dx.doi.org/10.1101/809863>
- Gómez, R.A., Mercati, D., Lupetti, P., Fanciulli, P.P., Dallai, R. (2023). Morphology of male and female reproductive systems in the ground beetle *Apotomus* and the peculiar sperm ultrastructure of *A. rufus* (P. Rossi, 1790) (Coleoptera, Carabidae). *Arthropod Structure and Development*, 72, 101217. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2022.101217>

- Gómez, R.A., Miller, K.B. (2013). *Prionohydrus*, a new genus of Noterini Thomson (Coleoptera: Noteridae) from South America with three new species and its phylogenetic considerations. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(1), 1–12.
- Gottardo, M., Dallai, R., Mercati, D., Hörnschemeyer, T., Beutel, R.G. (2016). The evolution of insect sperm– an unusual character system in a megadiverse group. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54(4), 237–256. doi: 10.1111/jzs.12136
- Guimarães, B.A.C., Ferreira-Jr, N. (2015). Two new species and new records of *Liocanthhydrus* Guignot (Coleoptera, Noteridae) from Brazil. *Zootaxa*, 3914(5), 591–596. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3914.5.8>
- Gustafson, G.T., Baca, S.M., Alexander, A.M., Short, A.E. (2020). Phylogenomic analysis of the beetle suborder Adephaga with comparison of tailored and generalized ultraconserved element probe performance. *Systematic Entomology*, 45(3), 552–570. doi: 10.1111/syen.12413
- Happ, G.M. (1984). Structure and development of male accessory glands in insects. In *Insect Ultrastructure*. 2, 365–396. Boston, MA: Springer US. doi: 10.1007/978-1-4613-2715-8
- Higginson, D.M., Miller, K.B., Segraves, K.A., Pitnick, S. (2012). Convergence, recurrence and diversification of complex sperm traits in diving beetles (Dytiscidae). *Evolution*, 66(5), 1650–1661. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01532.x>
- Higginson, D.M., Pitnick, S. (2011). Evolution of intra-ejaculate sperm interactions: do sperm cooperate?. *Biological Reviews*, 86(1), 249–270. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00147.x
- Hilsenhoff, W.L. (1992). Dytiscidae and Noteridae of Wisconsin (Coleoptera). I. Introduction, Key to Genera of Adults, and Distribution, Habitat, Life Cycle, and Identification of Species of Agabetinae, Laccophilinae and Noteridae. *The Great Lakes Entomologist*, 25(2), 57–69. <https://doi.org/10.22543/0090-0222.1770>
- Hiroyoshi, S., Reddy, G.V.P. (2021). Positional relationships among male reproductive organs in insects. p. 73-79. In: *Male Reproductive Anatomy*. London: IntechOpen, 2021. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98798>
- Hodgson, A.N., Ferenz, H.J., Schneider, S. (2012). Formation of sperm bundles in *Pterostichus nigrita* (Coleoptera: Carabidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 57(2), 120–131.
- Kaulenas, M.S. (1992). Insect accessory reproductive structures: Function, structure and development. *Springer Verlag*, Berlin pp 3–12 and 123–150.
- Kaur, D.A. (1972). A comparative study of the reproductive systems in Adephaga (Coleoptera). Thesis (Doctor of Philosophy). Faculty of Science & Mathematics of the Panjab University, Chandigarh. 1972

- Kirejtshuk, A.G., Poschmann, M., Prokop, J., Garrouste, R. Nel, A. (2014). Evolution of the elytral venation and structural adaptations in the oldest Palaeozoic beetles (Insecta: Coleoptera: Tshekardocoleidae). *Journal of Systematic Palaeontology*, 12, 575–600.
- Koçakoğlu, N. Ö., Candan, S., Güllü, M. (2021). Anatomy and histology of reproductive system of adult male mint leaf beetle *Chrysolina herbacea* (Duftschmid, 1825) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Microscopy Research and Technique*, 84(3), 512–520. doi: 10.1002/jemt.23607
- Koçakoğlu, N.Ö., Candan, S. (2022). Notes of the internal adult male reproductive system of *Pimelia subglobosa* (Pallas, 1781) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Zoologischer Anzeiger*, 301, 106–114. doi: 10.1016/j.jcz.2022.10.002.
- Kubo-Irie, M., Miura, I., Irie, M., Nakazawa, T., Mohri, H. (2000). Spermiogenesis in the stag beetle, *Aegus lavicollis* Waterhouse (Coleoptera, Lucanidae), with special reference to the centriole adjunct. *Invertebrate Reproduction & Development*, 37(3), 223–231. <https://doi.org/10.1080/07924259.2000.9652422>.
- Lawrence, J.F., Newton Jr, A. F. (1982). Evolution and classification of beetles. *Annual review of ecology and systematics*, 13(1), 261–290.
- Mackie, J.B., Walker, M.H. (1974). A Study of the Conjugate Sperm of the Dytiscid Water Beetles *Dytiscus marginalis* and *Colymbetes fuscus*. *Cell Tissue and Research*, 148, 505–519.
- Mercati, D., Fanciulli, P.P., Lupetti, P., Dallai, R. (2023). The sperm structure of the diving beetles *Stictonectes optatus* (Seidlitz, 1887) and *Scarodytes halensis* (Fabricius, 1787) (Dytiscidae, Hydroporinae) with evidence of a spermatostyle in the sperm conjugation. *Micron*, 166, 103412. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2023.103412>
- Miller, K.B. (2009). On the systematics of Noteridae (Coleoptera: Adephaga: Hydradephaga): Phylogeny, description of a new tribe, genus and species, and survey of female genital morphology. *Systematics and Biodiversity*, 7(2), 191–214. <https://doi.org/10.1017/S1477200008002946>
- Nilsson, A.N. (2011). A world catalogue of the family Noteridae, or the burrowing water beetles (Coleoptera, Adephaga). *Version 16. VIII*.
- Paoli, F., Dallai, R., Cristofaro, M., Arnone, S., Francardi, V., Roversi, P.F. (2014). Morphology of the male reproductive system, sperm ultrastructure and γ -irradiation of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Tissue and Cell*, 46(4), 274–285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2014.06.003>
- Phillips, D.M. (1970). Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 44(2), 243.

- Pitnick, S., Hosken, D.J., Birkhead, T.R. (2008). Sperm morphological diversity. In *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective* (pp. 69–149). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372568-4.00003-3>
- Ramsdale, A.S. (2002). Cantharidae Imhoff, 1856. pp: 202–218. In JR, R. H. A., Thomas, M.C., Skelley, P.E., Frank, J.H. (2002). *American beetles: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea*. (Vol. 2). CRC Press.
- Rasband, W.S. (1997–2008). ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD), version 1.52u.
- Reis, A.B., Salazar, K., Folly, C., Cossolin, J.F. S., Zanoncio, J.C., Serrão, J.E. (2021). Morphology of the male reproductive tract and spermatozoa of *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Ptinidae). *Zoologischer Anzeiger*, 293, 182–189. doi:10.1016/j.jcz.2021.06.006
- Roughtey, R.E. (2000). Noteridae C. G. Thompson, 1857. pp: 147–152. In Arnett Jr, R.H., Thomas, M.C. (Eds.). *American Beetles: Archostemata, Myxophaga, Adepaga, Polyphaga: Staphyliniformia* (Vol. 1). CRC Press.
- Salazar, K., Novais, A., Lino-Neto, J., Serrão, J.E. (2022). The sperm aggregation in a whirligig beetle (Coleoptera, Gyrinidae): structure, functions, and comparison with related taxa. *Organisms Diversity and Evolution*, 22(2), 355–375. <https://doi.org/10.1007/s13127-021-00528-6>
- Sasakawa, K. (2007). Sperm bundle and reproductive organs of carabid beetles tribe Pterostichini (Coleoptera: Carabidae). *Naturwissenschaften*, 94(5), 384–391. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0200-4>
- Sasakawa, K. (2019). Divergent sperm traits in Carabidae ground beetles (Insecta: Coleoptera). *bioRxiv*, 817635.
- Sasakawa, K. (2020). Light-microscopic examinations of sperm in several lineages of Carabidae (Insecta: Coleoptera): Implications for the evolution of sperm conjugation. *Entomological Science*, 23(3), 338–348.
- Schubert, L.F., Krüger, S., Moritz, G.B., Schubert, V. (2017). Male reproductive system and spermatogenesis of *Limodromus assimilis* (Paykull 1790). *PLoS One*, 12(7), e0180492.
- Triplehorn, C.A., Johnson, N.F. (2015). Estudo dos insetos: tradução da 7ª edição de Borror and Delong's introduction to the study of insects. São Paulo, *Cengage Learning*, 809p.
- Vasilikopoulos, A., Balke, M., Kukowka, S., Pflug, J.M., Martin, S., Meusemann, K., ... & Misof, B. (2021). Phylogenomic analyses clarify the pattern of evolution of Adepaga (Coleoptera) and highlight phylogenetic artefacts due to model misspecification and excessive data trimming. *Systematic Entomology*, 46(4), 991–1018. doi: 10.1111/syen.12508
- Wang, B., Zhang, H., Jarzembowski, E.A. (2013). Early Cretaceous angiosperms and beetle evolution. *Frontiers in Plant Science*. 4, 360. doi:10.3389/fpls.2013.00360

- Werner, G. (1976). Entwicklung und bau der doppelspermien bei den Dytisciden *Acilius sulcatus* L., *Dytiscus marginalis* L. und *Hydaticus transversalis* Pont. (Coleoptera). *Zoomorphologie*, 83, 49–87.
- Will, K.M., Lienbherr, J.K., Maddison, D.R., Falián, J. (2005). Absence asymmetry: the evolution of monorchid beetles (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *Journal of Morphology*. 264, 75-93. doi: 10.1002/jmor.10319