

CAMILA FOLLY BAPTISTA

**MORFOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR E DOS
ESPERMATOZOIDES EM BESOUROS (COLEOPTERA: CUCUJIFORMIA)
ASSOCIADOS A FUNGOS**

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

Orientador: José Lino Neto

Coorientador: Ítalo Salvatore de Castro Pecci
Maddalena

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

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

T

B222m
2021
Baptista, Camila Folly, 1983-
Morfologia do aparelho reprodutor e dos espermatozoides em
besouros (Coleoptera:Cucujiiformia) associados a fungos / Camila Folly
Baptista. - Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (65 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: José Lino Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Biologia Geral, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.034>

Modo de acesso: World Wide web.

1. Espermiogênese em animais. 2. Erotylidae. 3. Endomychidae.
4. Ciidae. 5. Besouros. 6. Sêmen - Morfologia. I. Neto, José Lino,
1959-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.
III. Título.

CDD 22. ed. 595.46138

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

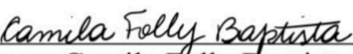
CAMILA FOLLY BAPTISTA

**MORFOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR E DOS ESPERMATOZOIDES EM
BESOUROS (COLEOPTERA: CUCUJIFORMIA) ASSOCIADOS A FUNGOS**

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

APROVADA: 30 de setembro de 2021

Assentimento:



Camila Folly Baptista
Autora



José Lino Neto
Orientador

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me ensinou a seguir com amor, coragem e respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de doutoramento, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos. E a todos os governos progressistas que valorizam a Ciência e a Educação.

Agradeço ao Departamento de Biologia Geral, ao Laboratório de Ultraestrutura Celular e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise por propiciarem a infraestrutura necessária ao desenvolvimento dos projetos de pesquisa – especialmente ao Gilmar e à Karla pelo apoio e valiosos ensinamentos.

Agradeço ao Prof. José Eduardo Serrão e à Elizabeth Pena, coordenador e secretária do nosso Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, pela eficiência, gentileza, e carinho ao nos atender.

Agradeço à banca de qualificação, que forneceu valiosas sugestões para a continuidade deste projeto de doutorado, e à banca avaliadora desta tese por dedicarem parte do seu tempo a ler avaliar este trabalho. Agradeço a contribuição.

Agradeço ao meu orientador José Lino Neto, pelo acolhimento em seu laboratório, pela confiança ao tornar-se meu orientador, e pela amizade. Tanto no laboratório quanto em despreziosas conversas, aprendi além do que consta nesta tese! Obrigada por tudo.

Agradeço aos meus professores e orientadores, Lúcio Campos e Tânia Santos, que primeiro me conduziram pela pesquisa. Obrigada pela significativa influência em minha vida acadêmica e pelo carinho. E à Rosa Alves Pereira, que além dos traços da Ilustração Científica, esteve por perto enquanto eu desenhava meu caminho na Biologia (um xêro!).

Agradeço ao Prof. Cristiano Lopes Andrade, pela colaboração nos estudos sobre Ciidae e pela acolhida em seu laboratório e no campo. Agradeço a todos do LabCol.

Agradeço à Maria Helena e Thaís, mãe e irmã queridas, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram e incentivaram com grande amor em todos os momentos da minha vida. Obrigada, mãe, por nos ensinar a ser fortes sem perder essência terna.

Agradeço ao Ítalo Pecci-Maddalena, pelos valiosos ensinamentos e discussões sobre ciência, e por dividir comigo essa estrada, nem sempre fácil, mas construída com carinho.

Agradeço aos meus queridos amigos, por compartilharem experiências de trabalho, pelo acolhimento, conselhos, risadas, cafés, por deixarem tudo mais leve. Carrego vocês comigo com um carinho imenso. A todos deixo o meu reconhecido agradecimento.

Fui só
juntando os pedaços à beira d'água
alumiando o que importa
minha prece abria caminhos
dentro relampeava
o coração AR – revoava
sou eu
me apresentava
me batizava
me coroava
pro recomeço
pra descoberta
fui só
mas sozinha não iria tão longe.

(Juliane Araújo)

RESUMO

BAPTISTA, Camila Folly, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2021. **Morfologia do aparelho reprodutor e dos espermatozoides em besouros (Coleoptera: Cucujiformia) associados a fungos.** Orientador: José Lino Neto. Coorientador: Ítalo Salvatore de Castro Pecci Maddalena.

Os Coleoptera são o grupo de insetos mais diverso e com maior riqueza de espécies. O sucesso evolutivo dos besouros pode ter sido dirigido pela exploração de diferentes recursos alimentares. Devido à tamanha diversidade e riqueza de espécies, existem problemas internos em relação à sistemática de vários táxons, como a grande série Cucujiformia, cujos limites são difíceis de serem estabelecidos. Muitos estudos utilizando a morfologia do sistema reprodutor e dos espermatozoides têm sido utilizados na sistemática de vários grupos animais, incluindo os insetos, pois podem incluir caracteres morfológicos informativos e diferentes daqueles tradicionalmente usados. Contudo, os trabalhos que descrevem a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de besouros ainda estão concentrados em poucas famílias de Coleoptera. Sendo assim, estes trabalhos têm como objetivo investigar as características do aparelho reprodutor e da morfologia dos espermatozoides de besouros micetófagos das famílias Ciidae (Tenebrionoidea), Erotylidae (Cucujoidea) e Endomychidae (Coccinelloidea), a fim de contribuir com informações que possam ajudar a entender as relações filogenéticas internas de cada família, bem como nos Cucujiformia como um todo.

Palavras-chave: Espermiogênese. Erotylidae. Endomychidae. Ciidae. Besouros micetobiontes.

ABSTRACT

BAPTISTA, Camila Folly, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2021. **Morphology of the reproductive system and sperm in beetles (Coleoptera, Cucujiformia) associated with fungi.** Advisor: José Lino Neto. Co-advisor: Ítalo Salvatore de Castro Pecci Maddalena.

Coleoptera are the most diverse group of insects with the greatest species richness. The evolutionary success of the beetles may have been driven by the exploration of different food resources. Due such diversity and species richness, there are internal problems related to the systematics of several taxa, such as the large Cucujiformia series, whose limits are difficult to establish. Many studies using a morphology of the reproductive system and sperm have been used in the systematics of various animal groups, including insects, as they may include informative morphological characters that differ from those traditionally used. However, works describing structure and ultrastructure of beetle sperm are still focused on few families of Coleoptera. Therefore, these works aim to investigate the characteristics of the reproductive system and the sperm morphology of micetophagous beetles of the families, Erotylidae (Cucujoidea) and Endomychidae (Coccinelloidea), in order to contribute with data to a better understanding of the internal phylogenetic relationships in each family, as well as in the whole Cucujiformia.

Keywords: Spermiogenesis. Erotylidae. Endomychidae. Ciidae. Mycetobiont beetles.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
<i>Besouros e o grupo Cucujiformia</i>	
<i>Ciidae (Tenebrionoidea)</i>	
<i>Erotylidae (Cucujoidea)</i>	
<i>Endomychidae (Coccinelloidea)</i>	
<i>O estudo dos espermatozoides</i>	
<i>Espermatogênese em insetos e os espermatozoides de besouros</i>	
JUSTIFICATIVA	12
OBJETIVO	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO I – CIIDAE	16
CAPÍTULO II – EROTYLIDAE	28
CAPÍTULO III – ENDOMYCHIDAE	46
CONCLUSÃO GERAL	63
APÊNDICE	64

INTRODUÇÃO GERAL

Besouros e o grupo Cucujiformia

Os Coleoptera são o grupo de insetos mais diverso e com maior riqueza de espécies, incluindo mais de 380.000 espécies descritas (Zhang et al., 2011; Gullan e Cranston, 2012). Polyphaga é a mais representativa das quatro subordens de Coleoptera (~ 90% das espécies), e compreende grandes superfamílias como: Staphylinoidea, Scarabaeoidea, Hydrophiloidea, Buprestoidea, Byrrhoidea, Elateroidea e Bostrichoidea, além do grupo Cucujiformia (Gullan & Cranston, 2012). Este último, de linhagem monofilética (Hunt et al., 2007; Robertson et al., 2015), possui mais de 173.000 espécies, e está atualmente dividido em sete superfamílias: Lymexyloidea, Tenebrionoidea, Cleroidea, Chrysomeloidea, Curculionoidea, Cucujoidea e Coccinelloidea (Robertson et al., 2015).

Os besouros do grupo Cucujiformia exibem grande diversidade morfológica, ecológica, e estratégias de alimentação variadas, sendo a micofagia uma condição basal (ver Hunt et al., 2007; Crowson, 1981; Schigel, 2012). Besouros que se alimentam de fungos estão distribuídos em todo o grupo e, dentro de uma mesma superfamília, existem espécies com diferentes hábitos alimentares (Hunt et al., 2007). Dessa forma, o hábito alimentar pode não refletir a história natural dos besouros – por sua grande plasticidade – e é, portanto, inadequado para resolver problemas filogenéticos em grandes táxons. Problemas internos em relação à sistemática são difíceis de serem estabelecidos em todo o grupo Cucujiformia.

Ciidae (Tenebrionoidea)

Os ciídeos são uma família de besouros muito pequenos, com distribuição mundial. Eles vivem em associação e se alimentam de macrofungos (Buder et al., 2008; Lawrence e Lopes-Andrade, 2010; Antunes-Carvalho et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Lopes-Andrade e Grebennikov, 2015). Hipóteses sobre as relações de Ciidae com as demais famílias tenebrionoides foram vagamente formuladas e baseadas em caracteres altamente homoplásticos (Lawrence, 1991). Da mesma forma, as relações filogenéticas desta família com outros cucujiformes não são claras (Lawrence, 1991; Buder et al., 2008).

Erotylidae (Cucujoidea)

Apesar da sua redefinição recente, a classificação interna da superfamília Cucujoidea ainda é problemática, e sinapomorfias morfológicas que sustentem o grupo ainda não foram reconhecidas (Leschen et al., 2005; Robertson et al., 2015). Historicamente, Cucujoidea tem sido considerada um “lixo taxonômico” para besouros cujas famílias possuem hábitos similares (Leschen et al., 2005; Robertson et al., 2015). Nesta superfamília existem besouros que se alimentam de seiva, casca de árvores e fungos diversos. Erotylidae (Cucujoidea) é composta, principalmente, por espécies micetófagas (Leschen & Buckley, 2007; Leschen et al., 2010). A família passou por diversas classificações sistemáticas até ser estabelecida como a conhecemos (Wêgrzynowicz, 2002; Leschen et al., 2005). No entanto, sua organização interna é ainda confusa (Wêgrzynowicz, 2002).

Endomychidae (Coccinelloidea)

A antiga série “Cerylonid”, atualmente reconhecida como uma superfamília, Coccinelloidea (Robertson et al., 2015), tem sido considerada uma linhagem monofilética (Leschen et al., 2005), e parece ser a mais derivada dos cucujiformes. Estudos filogenéticos recentes com base em dados moleculares têm corroborado o monofiletismo do grupo (e.g., Hunt et al., 2007; Robertson et al., 2008; Bocak et al., 2014), mas não de todas as famílias dentro dele (Hunt et al., 2007). Os besouros desta superfamília possuem variados hábitos alimentares (Hunt et al., 2007; Ślipiński & Lawrence, 2010; Ślipiński e Tomaszewska, 2010). Endomychidae é uma família quase exclusivamente fungívora, e este microambiente também lhes serve de refúgio, como parte de uma estratégia anti-predatória (Tomaszewska, 2010). O grupo tem sido considerado proximamente relacionado a Coccinellidae, porém, carece de estudos que auxiliem no estabelecimento de suas relações internas e com os demais táxons de Coccinelloidea.

O estudo dos espermatozoides

Há várias décadas dados morfológicos do sistema reprodutor e dos espermatozoides vem sendo usados na sistemática de diversos grupos animais. Esses dados constituem um conjunto de caracteres morfológicos distintos daqueles tradicionalmente usados. Contudo, são poucos os trabalhos que descrevem com detalhes a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de besouros e, ainda, eles estão concentrados em poucas famílias. Nos insetos, a morfologia dos espermatozoides, bem como a espermatogênese, apresentam

variações entre os diferentes grupos, essas variações são decorrentes de mutações acumuladas ao longo do processo evolutivo, que podem ser relacionadas à filogenia e taxonomia. Sendo assim, estudos sobre essas células podem trazer informações inéditas para os besouros micetófagos das famílias Ciidae (Tenebrionoidea), Erotylidae (Cucujoidea) e Endomychidae (Coccinelloidea), podendo adicionar dados às superfamílias e ao grupo Cucujiformia como um todo, auxiliando na compreensão da história natural desses besouros.

Espermatogênese em insetos e os espermatozoides de besouros

A espermatogênese é um sistema complexo de diferenciação celular que produz células haploides, os espermatozoides. Neste processo, as espermatogônias se desenvolvem a partir de uma célula apical localizada no germário. Ao deixar o germário, a espermatogônia se associa a células somáticas formando o cisto, ou espermatogônia definitiva. Então, passa por sucessivas divisões mitóticas sincrônicas, resultando em espermatócitos primários que, em seguida, passam pelas duas divisões meióticas, originando as espermátides. Estas espermátides passam pela espermiogênese, onde sofrem grandes alterações morfológicas que resultam na formação de espermatozoides. Nos testículos dos insetos em geral, as células germinativas estão dispostas lado a lado formando um feixe. O número de espermátides/espermatozoides por cisto testicular é usualmente constante para uma dada espécie e representa o número de divisões celulares (as mitoses mais duas divisões meióticas) que sofreu cada espermatogônia. Nos insetos tem sido descritos caracteristicamente cistos com 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024; na maioria dos besouros estudados tem sido observados cistos com 256 espermátides (Phillips, 1974).

A ultraestrutura dos espermatozoides dos coleópteros possui, em geral, características que são compartilhadas com outros Neuropteroidea ((Coleoptera + Strepsiptera) + Neuropterida), como: complexo acrossomal formado por duas ou três camadas (Jamieson et al., 1999; Nardi et al., 2013), dois derivados mitocondriais, dois corpos acessórios e um axonema de $9+9+2$ microtúbulos com o material intertubular subdividido em dois compartimentos e com uma estrutura densa em forma de bico aderindo aos túbulos acessórios (Jamieson et al., 1999; Dallai et al., 2016; Gottardo et al., 2016). No entanto, a ordem Coleoptera é megadiversa e isso se reflete em muitos modelos de espermatozoides, de modo que são observadas características específicas relacionadas à subordens, superfamílias, famílias (Jamieson et al., 1999; Dallai et al., 2016) e agrupamentos menores.

JUSTIFICATIVA

Decifrar a história evolutiva dos besouros é um dos grandes problemas na biologia dos insetos, e estudos que reflitam a história natural desses insetos são desafiadores devido à riqueza de espécies, às características morfológicas complicadas e dados moleculares esparsos (Zhang et al., 2018). Apesar dos inúmeros trabalhos utilizando tanto dados morfológicos quanto moleculares, ainda há muitas dúvidas em relação à classificação interna em diferentes grupos, como o diverso grupo Cucujiformia.

Ao longo do processo evolutivo a espermatogênese e os espermatozoides acumularam variações morfológicas distintas que diferem nos grupos de insetos. O estudo da morfologia dos espermatozoides tem sido cada vez mais utilizado para resolver problemas taxonômicos e ajudar a estabelecer relações filogenéticas (Jamienson et al., 1999; Lino-Neto et al., 2000; Dias et al., 2013; Santos et al., 2013; Dallai, 2014; Dallai et al., 2016; Gottardo et al., 2016), dada sua natureza mais conservativa na ultraestrutura devido a menor susceptibilidade às condições ambientais.

Até o momento, porém, não existem (ou existem poucos trabalhos) sobre a morfologia dos espermatozoides em representantes de Cucujiformia. Especificamente em relação às famílias estudadas (Erotylidae, Ciidae e Endomychidae), não existem informações disponíveis. Dada sua diversidade, essas famílias são importantes para o entendimento das relações internas das superfamílias das quais pertencem. Além disso, conforme explorado em cada capítulo desta tese, cada família apresenta problemas de classificação interna. Deste modo, investigar a morfologia dos espermatozoides - um complexo estrutural ainda negligenciado em vários táxons - poderá contribuir para futuros estudos morfológicos e análises filogenéticas para esses grupos de besouros.

OBJETIVO

O objetivo principal desta tese foi investigar as características do aparelho reprodutor e da morfologia dos espermatozoides de besouros micetófagos das famílias Erotylidae (Cucujoidea), Endomychidae (Coccinelloidea) e Ciidae (Tenebrionoidea) a fim de contribuir com informações que possam ajudar a entender as relações filogenéticas internas de cada família, bem como nos Cucujiformia como um todo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes-Carvalho, C., Sandoval-Gomez, V.E., Lopes-Andrade, C., 2012. *Grossicis*, a new genus of Neotropical minute treefungus beetles (Coleoptera: Ciidae), with a detailed discussion on its systematic position in the family. *C R Biol.* 335, 107e119.
- Bocak, L.; Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., Vogler, A.P., 2014. Building the Coleoptera tree-of-life for >8000species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, 39, 97–110.
- Buder, G., Grossmann, C., Hundsdoerfer, A., Klass, K.D., 2008. A contribution to the phylogeny of the Ciidae and its relationships with other Cucujoid and Tenebrionoid beetles (Coleoptera: Cucujiformia). *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 66, 165–190.
- Crowson, R.A., 1981. *The biology of Coleoptera*. New York (NY): Academic Press. 802p.
- 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.
- Dias, G.; Oliveira, C.M.; Lino-Neto, J., 2013. Testicular and spermatogenic characteristics of *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae) with taxonomic inferences. *Tissue & Cell*, 45, 227–230.
- Gottardo, M.; Dallai, R.; Mercati, D.; Hörschemeyer, 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, 237–256.
- Gullan, P. J.; Cranston P., 2012. *Os insetos: Um resumo de Entomologia*, 4. ed. São Paulo: Roca. 480 p.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., John, O.S., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M.S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T.G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A.P., 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, 318, 1913–1916.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers Inc. 555 p.
- Lawrence, J.F., 1991. Order Coleoptera. In: F.W. STEHR (ed.), *Immature Insects*, Vol. 2. Dubuque, Iowa: Hunt Publishing Company. pp. 144–658.

- Lawrence, J.F., Lopes-Andrade, C., 2010. Ciidae leach in Samouelle, 1819. In: Leschen, R.A.B., Beutel, R.G., Lawrence, J.F. (Eds.), *Handbook of Zoology*, second ed., vol. 2. Walter de Gruyter GmbH and Co. KG, Germany/USA, pp. 504e514.
- Leschen, R.A.B.; Buckley, T.R., 2007. Multistate characters and diet shifts: Evolution of Erotylidae (Coleoptera). *Systematic Biology*, 56, 97–112.
- Leschen, R.A.; Lawrence, J.F.; Ślipiński, S.A., 2005. Classification of basal Cucujoidea (Coleoptera: Polyphaga): Cladistic analysis, keys and review of new families. *Invertebrate Systematics*, 19, 17–73.
- Leschen, R.A.B.; Skelley, P.E.; McHugh, J.V., 2010. Erotylidae Leach, 1815. In: R.G. Beutel; N.P. Kristensen (eds.), *Handbook of Zoology*, 2 ed., Vol. 2. pp. 311–319.
- Lino-Neto, J.; Bão, S.N.; Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of the *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Acta Zoologica (Stockholm)*, 81, 205–211.
- Lopes-Andrade, C., Grebennikov, V.V., 2015. First record and five new species of Xylographellini (Coleoptera: Ciidae) from China, with online DNA barcode library of the family. *Zootaxa*, 4006, 463e480.
- 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, 463–475.
- Oliveira, E.H., Lopes-Andrade, C., Lawrence, J.F., 2013. Review of the neotropical Ciidae (Insecta: Coleoptera) in the *Cis taurus* species-group. *Arthropod. Syst. Phyl.* 71, 181e210.
- Phillips, D.M., 1974. *Spermiogenesis*. New York, Academic Press. 68p.
- Robertson, J.A.; Ślipiński, A.; Moulton, M.; Shockley, F.W.; Giorgi, A.; Lord, N.P.; Whiting, M. F.; McHugh, J.V., 2015) Phylogeny and classification of Cucujoidea and the recognition of a new superfamily Coccinelloidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Systematic Entomology*, 40, 745–778.
- Santos, H.P.; Zama, U.; Dolder, H.; Lino-Neto, J., 2013. Sperm morphology of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae). *Micron*, 51, 36–40.
- Schigel, D.S., 2012. Fungivory and host associations of Coleoptera: A bibliography and review of research approaches. *Mycology*, 3(4), 258–272.
- Ślipiński, A.; Lawrence J.F., 2010. Cerylonidae Billberg, 1820. In: R.G. Beutel; N.P. Kristensen (eds.), *Handbook of Zoology*, 2 ed., Vol. 2. pp. 422–432.

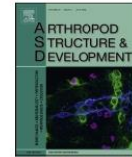
- Ślipiński, A.; Tomaszewska, W., 2010. Alexiidae Imhoff, 1856. In: R.G. Beutel; N.P. Kristensen (eds.), Handbook of Zoology, 2 ed., Vol. 2. pp. 432–434.
- Tomaszewska, W., 2010. Endomychidae Leach, 1815. In: R.G. Beutel; N.P. Kristensen (eds.), Handbook of Zoology, 2 ed., Vol. 2. pp. 442–454.
- Węgrzynowicz, P., 2002. Morphology, phylogeny and classification of the family Erotylidae based on adult characters (Coleoptera: Cucujoidea). *Genus*, 13, 435–504.
- Zhang, S.Q.; Che, L.H.; Li, Y.; Liang, D.; Pang, H.; Ślipiński, A.; Zhang, P., 2018. Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. *Nature communications*, 9, 205.

CAPÍTULO I – CIIDAE



Contents lists available at ScienceDirect

Arthropod Structure & Development

journal homepage: www.elsevier.com/locate/asd

The reproductive system of *Ceracis cornifer* (Mellié) and first description of sperm structure in a minute tree-fungus beetle (Tenebrionoidea: Ciidae)

Camila Folly^a, Italo Salvatore de Castro Pecci-Maddalena^{b, c}, Cristiano Lopes-Andrade^c, e José Lino-Neto^{a, *}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 36570-000, Brazil

^b Departamento de Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

^c Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 April 2021
Accepted 7 July 2021
Available online xxx

Keywords:
Ciid beetles
Morphology
Spermatheca
Sperm dimorphism
Ultrastructure

ABSTRACT

Studies on the spermatogenesis of Tenebrionidae beetles (Tenebrionoidea) have shown an unusual organization of spermatozoa, in which they are arranged antiparallely within the testicular cysts. Despite such works, many taxa of Tenebrionoidea remain to be studied, including the minute tree-fungus beetles (Ciidae). Among the challenges in the study of the internal morphology of ciids is their small body size (about 2 mm or less), which makes dissections and comparisons extremely arduous. Here, we provide, for the first time, an anatomical and histological study of the reproductive system (female and male) and a description of sperm structure of *Ceracis cornifer* Mellié (Ciidae), under light and transmission electron microscopes. We pointed out the growth of a single oocyte at a time in females, aside of evidences toward a constant copulatory activity that can provide a continuous supply of sperm in their small spermatheca. In males, sperm have an antiparallel organization within the cysts, a condition observed so far only in members of Tenebrionoidea. Furthermore, we observed sperm dimorphism in *C. cornifer*. We described, for the first time, this characteristic in a Tenebrionoidea taxon, and discussed the possible relationship between sperm dimorphism and antiparallel organization of sperm.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Morphological data of reproductive system and sperm cells have been used for decades to understand the phylogenetic relationships of several taxa, including insects (Burrini et al., 1988; Jamieson et al., 1999; Dallai, 2014; Dallai et al., 1996, 2005, 2011, 2016; Lino-Neto et al., 2000). Studies on the spermatogenesis of darkling beetles (Tenebrionidae: Tenebrionoidea) revealed the formation of bundles with sperm arranged in an antiparallel organization within the testicular cysts (Dias et al., 2012; 2013a, b; 2015). This arrangement can also be observed in Meloidae and Ripiphoridae (Tenebrionoidea) from the images shown in Nardi et al., (2013), suggesting that it is a characteristic shared by distinct lineages of Tenebrionoidea (Dias et al., 2015). Despite such works, studies on

the reproductive system and sperm cells are lacking in all Tenebrionoidea families.

Ciidae (Tenebrionoidea) includes about 750 species in 51 genera distributed in the subfamilies Sphindociinae (with a single monospecific genus) and Ciinae (subdivided into three tribes: Orophini, Xylographellini and Ciini) (Lopes-Andrade and Grebennikov, 2015; Souza-Gonçalves et al., 2020). Ciids are very small beetles (2 mm or less), with a worldwide distribution. They live in association and are feeding on macrofungi known as bracket-fungi (Buder et al., 2008; Lawrence and Lopes-Andrade, 2010; Antunes-Carvalho et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Lopes-Andrade and Grebennikov, 2015). There is only one paper describing the morphology of the male and female reproductive system in *Hadreule blaisdelli* (Casey) (Klopfenstein and Graves, 1992) and a vague citation of the number of testicular follicles in *Cis* spp. (Lopes-Andrade, 2008). To date, there are no published studies on the Ciidae sperm.

C. cornifer (Mellié) (Coleoptera: Ciidae) is one of the four species from the “*furcifer* group”, which also includes *Ceracis furcifer* Mellié, *C. hastifer* (Mellié) and *C. ruficornis* Pic, all of them from the

* Corresponding author.
E-mail address: lino-neto@ufv.br (e.J. Lino-Neto).

Neotropical region (Pecci-Maddalena and Lopes-Andrade, 2017). Species of this group have a similar body shape and mainly use the fungus *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill (Polyporaceae) as shelter, food and oviposition site (Lawrence, 1973; Gumier-Costa et al., 2003; Graf-Peters et al., 2011; Pecci-Maddalena et al., 2014). The *furcifer* group is one of four species-groups within the genus *Ceracis*, that includes 52 species and is the second most speciose genus of Ciidae, surpassed only by *Cis* Latreille with more than 420 species. However, the four species-groups within *Ceracis* represent only 21 of its 54 species, which remain to be studied (Lawrence, 1973, 2016; Pecci-Maddalena et al., 2014; Pecci-Maddalena and Lopes-Andrade, 2017; Souza-Gonçalves and Lopes-Andrade, 2018).

The main goal of this work is to describe the morphology of the reproductive system, of females and males, and the sperm of *C. cornifer* (Figs. 1A and 2A), a species widely distributed in the Neotropical region and frequently collected in basidiomes of *P. sanguineus*. The present study sheds light on the internal morphology and provides, for the first time, a description of the sperm structure of a Ciidae species. Aside from that, the knowledge on the Tenebrionoidea sperm is expanded.

2. Material and methods

Basidiomes of the fungus *P. sanguineus* colonized by *C. cornifer* were collected in the following localities (latitude and longitude coordinates estimated by tracking localities in the online database GeoNames (Wick, 2012)): Serra do Cipó (S18° 49', W43° 49'), Tombos (S20° 52', W 42° 4'), Viçosa (S20° 45', W42° 52') and Laranjal (S 21° 22'; W 42° 28') (State of Minas Gerais), and Porciúncula (S 20° 57', W42° 2') (State of Rio de Janeiro), Brazil, over the years 2016 and 2021. These samples were maintained in the Laboratório de Ultraestrutura Celular, at Universidade Federal de Viçosa (UFV), and the beetles were

studied up to 20 days after field collections. Other information regarding the field collections and the material examined are available as supporting information (see Supporting Information, Table S1).

2.1. Light microscopy

To observe the morphology of female reproductive system in *C. cornifer* we dissected them in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 (PBS), and fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in the same buffer. The samples were washed in the same buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated in an increasing series of ethanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). The samples were embedded in Leica historesin and semi-thin sections (0.5 µm tick) were obtained with an automatic microtome with glass knives. These sections were mounted on histological slides and stained with Giemsa 1:15 in Sørensen buffer. To distinguish the spermatheca and the *bursa copulatrix*, observing the sperm, 10 females were removed from the breeding and maintained isolated from the males for 10 days. Thereafter, the female reproductive system of these 10 females, and of 10 others that remained in contact with the males, were dissected in PBS, fixed in 2.5% glutaraldehyde in the same buffer and stained with 0.2 g/ml de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Then they were washed rapidly, transferred to histological slides and made the total mount, covering it with coverslips using 50% sucrose solution. Images were obtained with an Olympus Q-Color 3 digital camera coupled to an Olympus BX-60 microscope and, for the total mount slides (stained with DAPI), also equipped with a BP 360–370 nm excitation filter. Some females were also dissected in PBS, and the female reproductive systems were fixed and photographed under a Zeiss Discovery V20 equipped with a Zeiss AxioCam 506 digital camera, at the Laboratório de Sistemática e Biologia de Coleoptera (LabCol), UFV.

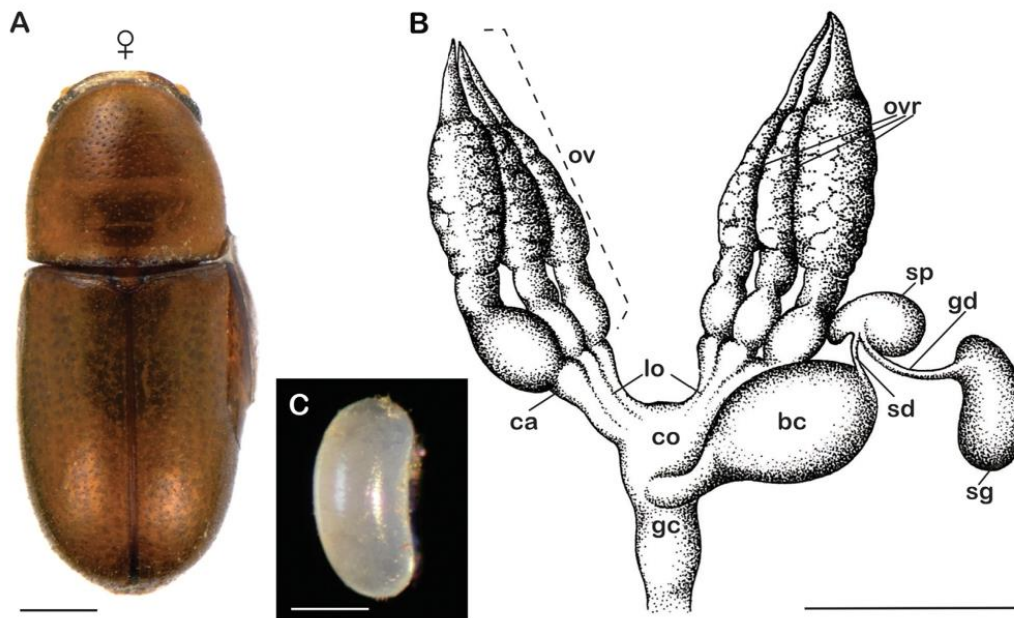


Fig. 1. An adult female (A) and a schematic drawing (B) of the female reproductive system of *Ceracis cornifer* showing the pair of ovaries (ov) composed of three ovarioles (ovr), calyx (ca), lateral oviducts (lo), common oviduct (co), *bursa copulatrix* (bc), spermathecal duct (sd), spermatheca (sp), glandular duct (gd), spermathecal gland (sg) and genital chamber (gc). (C) *Ceracis cornifer* egg. Scale bars: 200 µm.

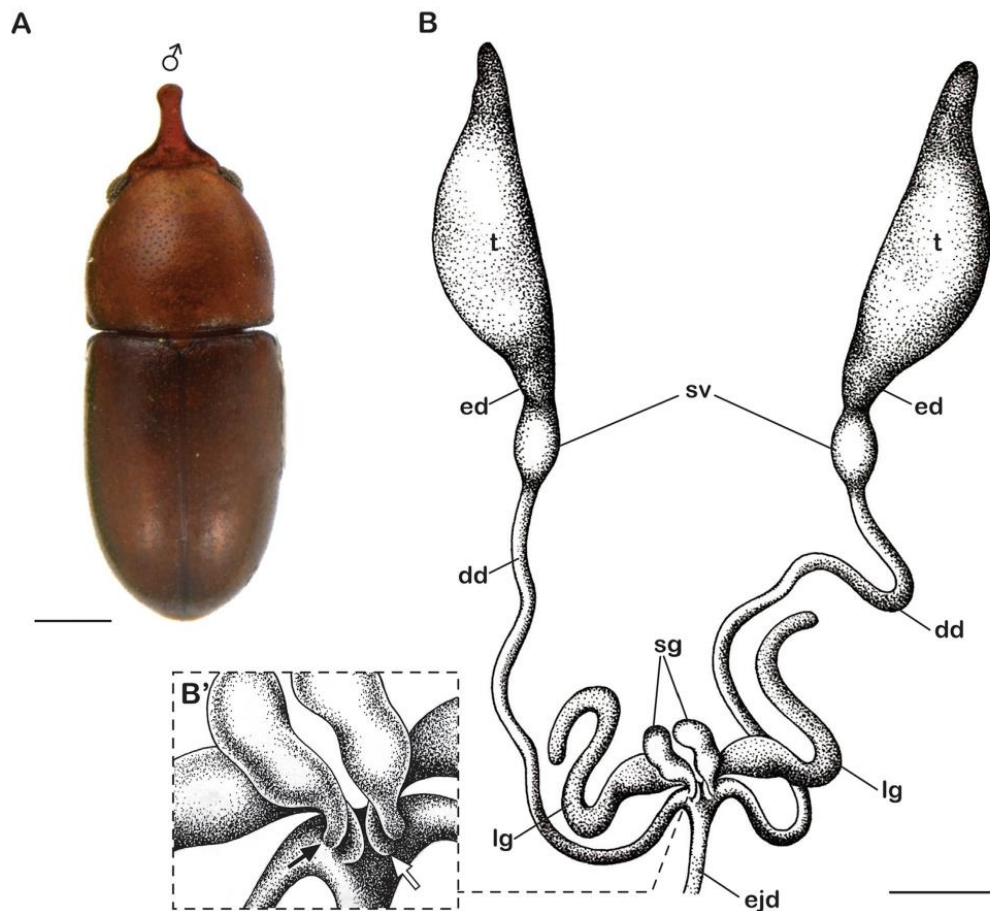


Fig. 2. An adult male (A), and a schematic drawing (B) of the male reproductive system of *Ceracis cornifer* showing: a pair of testes (t), efferent ducts (ed), seminal vesicles (sv), deferent ducts (dd), two pairs of accessory glands (lg = larger glands, sg = smaller glands) and ejaculatory duct (ejd). (B') Schematic drawing showing a detail of the accessory glands insertion (black arrow = smaller gland, white arrow = larger gland). Scale bars: B = 200 μ m.

To observe the morphology of male reproductive system, 10 males of *C. cornifer* were dissected in PBS and the male reproductive system fixed in 2.5% glutaraldehyde in the aforementioned phosphate buffer. Then, the samples were processed as in females. To determine the total length of the sperm and their regions, the seminal vesicles of 12 adult males were dissected in PBS, transferred to a drop of the same buffer on histological slides, where the sperm were spread. Then the samples were washed with distilled water, dried at room temperature, stained with Giemsa and then photographed. To measure the nuclei, some samples were stained with DAPI, washed in running water and covered with coverslips using 50% sucrose solution. All images were obtained with an Olympus Q-Color 3 digital camera coupled to an Olympus BX-60 microscope and, for slides stained with DAPI, also equipped with a BP 360–370 nm excitation filter. For histological images of testes, seminal vesicles and glands (Fig. 4A, B and F), several frames were captured with 40x lens and mounted on panoramic images. Sperm length measurements

were obtained using *Image-J* software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), and the mean was calculated from the total number of cells analyzed ($n = 120$) in male individuals ($n = 12$) from 6 populations.

2.2. Transmission electron microscopy

To observe the sperm ultrastructure, testes and seminal vesicles of 10 individuals were dissected in PBS, and fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution with 2% sucrose and 1% tannic acid in the same buffer, for 5 days (Dallai and Afzelius, 1990). The samples were washed in distilled water and post-fixed in 1% uranyl acetate. Then they were dehydrated in an increasing alcoholic series, in 100% acetone, and embedded in Epoxy resin (Epon 812). Ultrathin sections (~60 nm) were obtained in an RMC Power Tome-X automatic ultramicrotome with a diamond knife, placed on copper grids, and contrasted with 3% uranyl acetate and 0.2% lead citrate. All samples were observed and photographed using a transmission

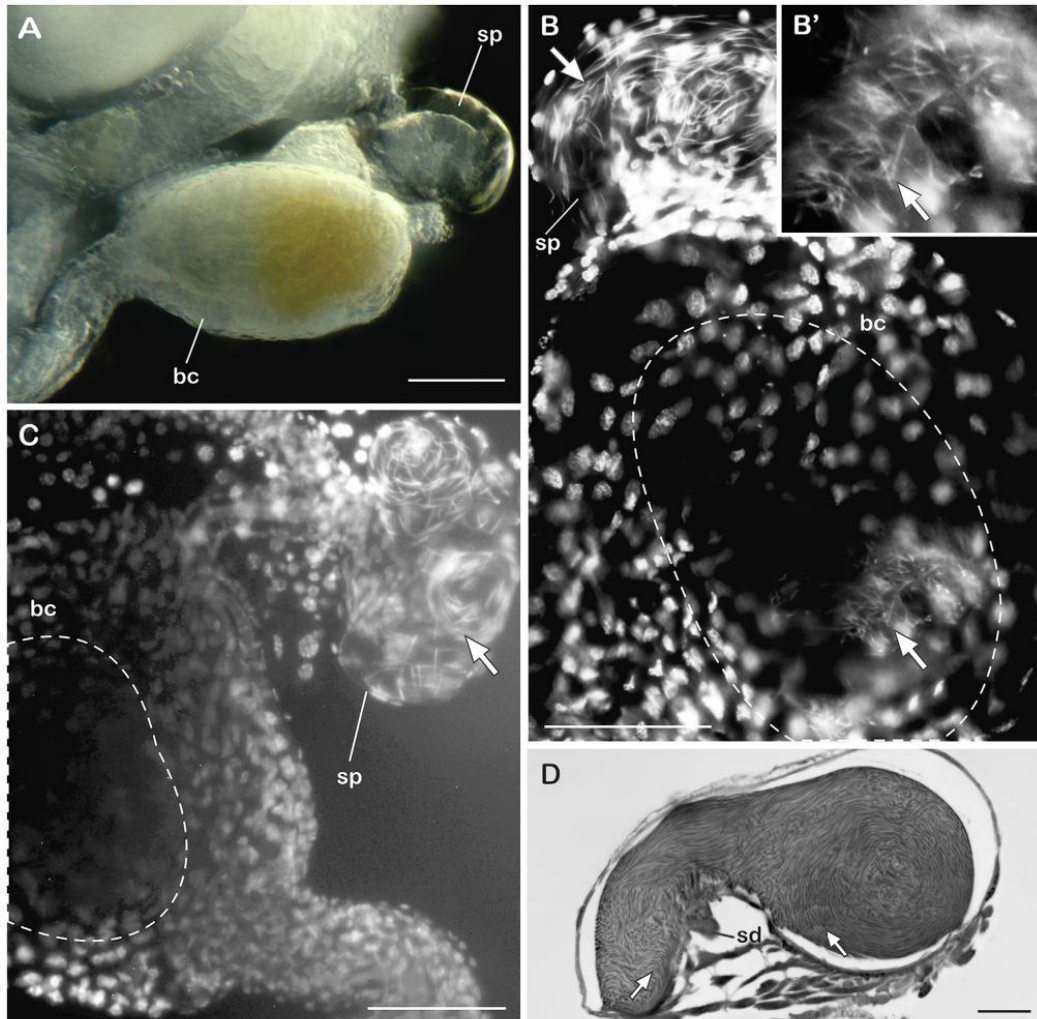


Fig. 3. Female reproductive system of *Ceracis cornifer* (A) Detail showing the bursa copulatrix (bc) and the spermatheca (sp), stained with DAPI, of females maintained with the males (B) and isolated (C). Note in B (detail in B') sperm nuclei (arrows) in the bursa copulatrix (bc), in addition to the spermatheca (sp), but in C they only appear in the spermatheca (sp). The dotted line indicates internal area of the bursa copulatrix (bc). (D) Longitudinal section of the spermatheca filled with sperm (arrows), and the beginning of the spermathecal duct (sd). Scale bars: A–C = 50 μ m; D = 10 μ m.

electron microscope (Zeiss EM109), operating at 80 kV, at the Núcleo de Microscopia e Microanálise, UFV.

3. Results

3.1. Female reproductive system

The female reproductive system of *C. cornifer* (Fig. 1B) consists of a pair of lateral ovaries, with a single oocyte maturing at a time – the eggs measure about 450 μ m in length (Fig. 1C). Each ovary is composed of three ovarioles that converge to the calyx, an enlarged region of the lateral oviducts. The lateral oviducts open

into the common median oviduct, which opens into a genital chamber (or vagina). In the median dorsal region of the genital chamber, a channel is formed that expands, giving rise to an ellipsoidal-shaped bursa copulatrix (Figs. 1B and 3A–C), measuring about 150 μ m in length. A narrow spermathecal duct at the bursa copulatrix distal portion connects it to the spermatheca (~80 μ m), connected to the spermathecal gland (~90 μ m) through the glandular duct (Figs. 1B and 3).

The spermatheca of *C. cornifer* (Fig. 3D) is rhiniform (e.g., kidney shaped), sclerotized, with moving sperm inside it. In all dissected females that were in contact with males, sperm were observed both in the bursa copulatrix and in the spermatheca (Fig. 3B–B', arrows



Fig. 4. Longitudinal section of male reproductive system of *Ceracis cornifer* under light microscopy. (A) Testis (t) (ap = apical region), efferent duct (ed) and seminal vesicle (sv) filled with sperm (black arrow). Note cysts in the early (black asterisks) and advanced (white asterisks) stages of differentiation, and the seminal vesicle (sv). (B–E) Details of cyst stages of differentiation: (B) spermatocyte, (C) early spermatid, (D) advanced spermatid and (E) sperm. Scale bars: A = 50 μ m; B–E = 10 μ m.

indicate the sperm nuclei). Conversely, in isolated females, sperm were only found in spermatheca (Fig. 3C, arrow indicates the sperm nuclei).

3.2. Male reproductive system

The male reproductive system of *C. cornifer* is composed of a pair of elongate testes measuring about 530 μm in length, followed by two short efferent ducts. Aside from that, two seminal vesicles (~130 μm) at the most distal portion of their respective deferent ducts, ending in a single ejaculatory duct concomitant with two pairs of accessory glands (Fig. 2B). Each testis consists of only one follicle and no variation in this number was observed among individuals of all populations examined by us.

The follicles are completely filled with cysts at different stages of spermatogenesis (Fig. 4). The spermatogonia occupy the apical region of the follicles (Fig. 4A), so that only the initial stage of spermatogenesis occurs in this. The cysts have a centripetal organization in the follicles, therefore, cysts in early stages of differentiation (Figs. 4A and 5A, black asterisks) occupy mainly the apical region, but also the follicles periphery. Cysts in more advanced stages of differentiation are closer to the center and the testes exit (Figs. 4A and 5A, white asterisks).

At the beginning of spermiogenesis, spermatids migrate to two opposite poles of the cyst. Firstly, the flagella grow and then the nuclei also begin to elongate. At the end of spermiogenesis, the sperm cells, fusiform and well packaged, are distributed as follows: half of them with the nuclei towards one pole of the cyst and half with the nuclei towards the opposite pole. Thus, in each cyst with up to 256 germ cells (corresponding to 8 division cycles) (Fig. 5B), two clusters of up to 128 spermatozoa each arranged antiparallely are observed (Fig. 5C).

The sperm of *C. cornifer* are long and slender, measuring 355 ± 5.5 (346–361) μm in length, coefficient of variation (CV) = 1.5%, of which only 11 ± 0.3 (10–12) μm correspond to nucleus (Fig. 5D and D'). Each seminal vesicle corresponds to a portion of the deferent duct most distal in relation to the ejaculatory duct (Fig. 2B). The seminal vesicles are short and conspicuously enlarged in relation to the post-vesicular portion of the deferent duct, which, in turn, is long and thin, and flows into a single ejaculatory duct concomitant with the accessory glands (Fig. 2B).

The male reproductive system of *C. cornifer* has also two pairs of accessory glands. One pair is rhiniform, translucent and short (~140 μm) (Figs. 2B and 5E), and the other pair is white, opaque and long (~600 μm) (Figs. 2B and 5E). The pair of larger glands is inserted below the smaller glands, but surrounds them at the base and appears twisted over them (Fig. 2B').

The gland walls have a single layer of columnar cells with a basal nucleus. The smaller accessory glands have a secretory region and a storage region. In these glands the stored secretion is homogeneous (Fig. 5E, asterisk), whereas in the larger glands, the secretion is granular and heterogeneous in appearance (Fig. 5E, arrows). These glands, when stained with Giemsa, have different affinities with the acid-base components of this dye, showing more acid secretion in the smaller gland and more basic secretion in the larger one, although the latter also have acid granules.

3.3. Sperm ultrastructure

The head sperm contains an apical acrosome and a nucleus, followed by the flagellum formed by an axoneme, two long asymmetric mitochondrial derivatives (MD) and two thin and slightly asymmetrical accessory bodies (Fig. 6).

In the acrosome, about 3 μm in length, it was possible to observe a perforatorium covered by the acrosomal vesicle (Fig. 6A). The

nucleus is thin and elongated (Fig. 5D'), homogeneously filled with compact chromatin (Figs. 5D' and 6B,C). The nucleus gradually tapers from its base to the anterior portion (Fig. 5D'), and at the posterior end it forms a lateral indentation which houses the larger MD (Fig. 6C). In the flagellum, the axoneme has a 9 + 9 + 2 microtubules pattern: nine outer single microtubules (accessory tubules) with 16 protofilaments, nine microtubule doublets and two central single microtubules, all connected by intertubular material (Fig. 6G and G'). At the end of the flagellum, the axoneme is disorganized, it is the last flagellar element to end (Fig. 6E).

The MDs run parallel along the axonemal length, they are conspicuously asymmetrical in diameter and shape. The larger one (Fig. 6F and G), positioned diametrically opposite to the axoneme, has an ellipsoidal shape in cross section and is almost completely filled with paracrystalline material (Fig. 6F, asterisk). The larger MD appears first, adjacent to the nucleus (Fig. 6C), and ends after the smaller MD (Fig. 6D). This latter, in turn, is piriform in cross section and represents only about 1/4 of the larger MD diameter (Fig. 6F and G). Laterally to the axoneme, between it and the MDs, are two thin and dense accessory bodies, slightly asymmetrical in diameter (Fig. 6F).

4. Discussion

4.1. Female reproductive system

In insects, the spermatheca is an organ of ectodermal origin responsible for receiving, maintaining and releasing the sperm to fertilize the eggs. In the female reproductive system, the morphology of spermathecae, accessory glands and the number of ovaries per ovary, in general, vary among species (Snodgrass, 1935; Tombes and Roppel, 1972; Doyen, 1993). Due to the small size of the cids, and technical difficulties in dissection, examination and photography of specimens, information on their internal anatomy are rare (e.g., Klopfenstein and Graves, 1992; Lopes-Andrade, 2008), and comparisons among different taxa are limited. However, the general anatomy of the female reproductive system of *C. cornifer* is very similar to that described for *Hadreule blaisdelli* (Ciini), with a conspicuous difference in the spermathecal gland shape: rhiniform in *C. cornifer*, but thin and elongate in *H. blaisdelli* (see Klopfenstein and Graves, 1992).

In the present work, although the females of *C. cornifer* exhibited two ovaries with three ovarioles each, we observed only one oocyte developing at a time, an event also described for *H. blaisdelli* (see Klopfenstein and Graves, 1992). Ovarioles can vary considerably in number in different taxa, and the extremes in ovariole number may reflect the level of egg production (Koçakoglu et al., 2021). Interestingly, in insects with a trend towards miniaturization, size reduction is generally accompanied by specific changes, which can lead, for example, to the occurrence of females with only one ovary, or that only one oocyte at a time can be brought to maturity (Minelli and Fusco, 2019). According to Grebennikov (2008), one of the implications of the so-called "miniaturization process" is that selective pressure on small organisms favors females that lay less eggs. Therefore, it is possible that the maturation of only one oocyte at a time in females of *C. cornifer* may be related to the very small body size of these beetles.

In females that were isolated for 10 days, sperm were found only in the spermatheca. On the other hand, in those females maintained in contact with males, the sperm were observed in the structures that correspond to the spermatheca and the *bursa copulatrix*, even in those individuals that had oviposition marks in their ovaries. During copulation, in some insects, sperm is deposited in the *bursa copulatrix* and then migrates to the spermatheca, where they are stored until released to fertilize eggs. The time of migration

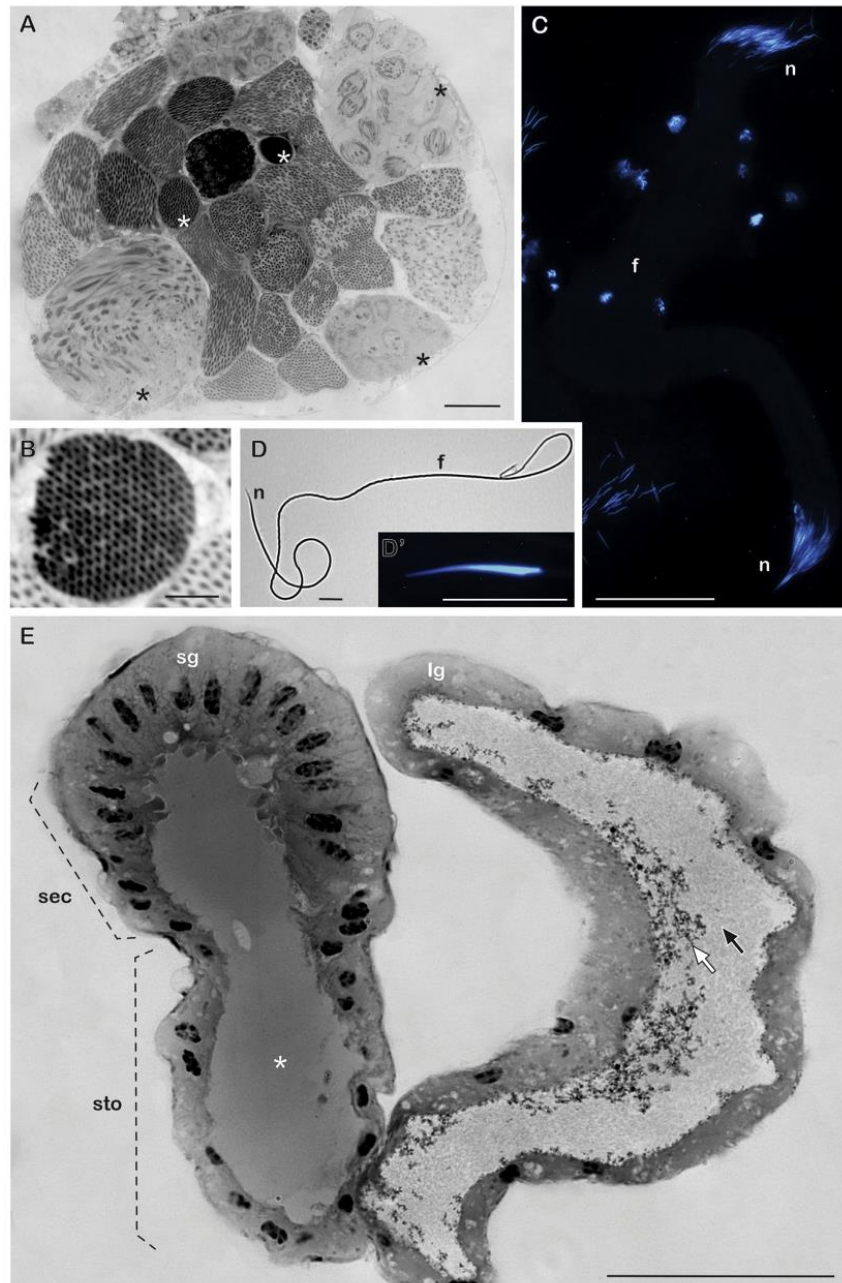


Fig. 5. Male reproductive system of *Ceracis cornifer* under the light microscope. (A) Cross section of a testis showing cysts in early stages of differentiation in the periphery (black asterisks), and others more advanced in the central region (white asterisks). (B) Cross section of a cyst in advanced stage, showing 243 spermatids. (C) A bundle with spermatozoa in antiparallel organization, stained with DAPI, to differentiate nuclei (n) and flagella (f). (D) A sperm cell showing the nucleus (n) and flagellum (f). (D') A sperm nucleus stained with DAPI. Note that it gradually tapers towards the anterior tip, and has a lateral indentation at the posterior tip. (E) Smaller accessory gland (sg) showing the secretory region (sec), the storage region (sto) and the homogeneous contents in the lumen (asterisk). Larger accessory gland (lg). Note the acidic granular content (white arrow), and the basic heterogeneous content (black arrow) in the lumen. Scale bars: A, C and E = 50 μm ; B, D and D' = 10 μm .

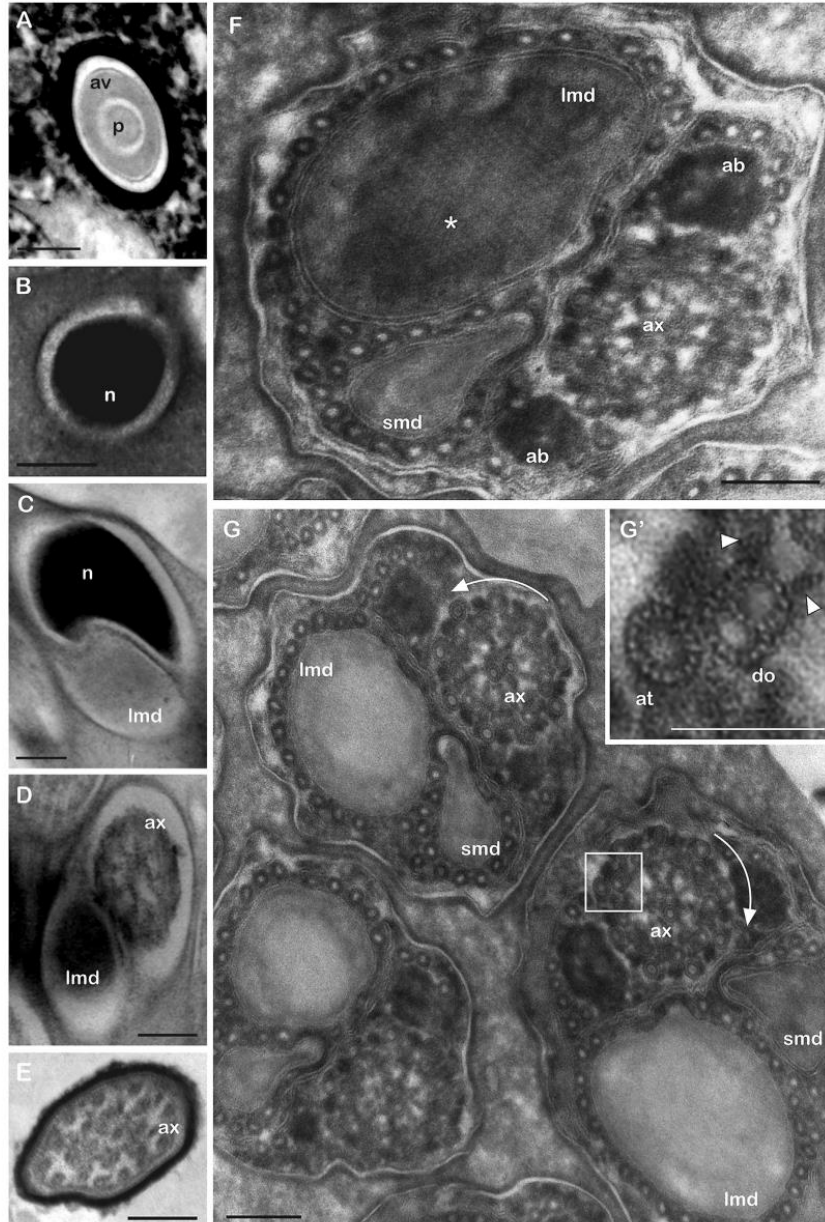


Fig. 6. Cross sections of *Ceracis cornifer* spermatids and sperm under transmission electron microscopy. (A) Acrosome showing perforatorium (p) and acrosomal vesicle (av). (B) A nucleus (n) with homogeneously compact chromatin. (C) Nucleus-flagellum transition region showing the indentation at the nuclear end (n) housing the anterior tip of the larger mitochondrial derivative (lmd). (D, E) Posterior tip of flagella: the larger mitochondrial derivative (lmd) and axoneme (ax). (F) Flagellum of a spermatid showing axoneme (ax), two asymmetric accessory bodies (ab), and smaller (smd) and larger (lmd) mitochondrial derivatives. Note in the latter the large area of paracrystalline material (asterisk). (G) Flagella of two spermatids showing axonemes (ax) clockwise and anticlockwise (curved arrows) with respect to the dynein arms. Note that even with different orientations, the larger mitochondrial derivatives (lmd) appear to the left of axoneme in the two spermatids. Smaller mitochondrial derivatives (smd). (G') Detail of axoneme showing an accessory tubule (at) with 16 protofilaments and a microtubule doublet (do) with the dynein arms (arrowheads) in clockwise orientation. Scale bars: A–G = 100 nm; G' = 50 nm.

is variable, but it usually occurs in just a few hours. Therefore, probably the presence of male gametes also in the *bursa copulatrix* of all females of *C. cornifer* which were maintained in the presence of males is an indication that females of this species exhibit constant copulatory activity.

Following this hypothesis, considering the relation between the small spermathecal size and the large length of *C. cornifer* sperm, a constant copulatory activity by females may provide a constant sperm supply to their spermathecae. Although the present work does not focus on behavior, it is important to consider that multiple matings by females (polyandry) would allow the occurrence of gametes from more than one male in their *bursa copulatrix* and/or spermatheca, increasing the variability and leading to sperm competition (Fitzpatrick and Baer, 2011; De Souza et al., 2018). The latter one acts as a driver of characteristics that lead to longer sperm as well as to a higher quality of the ejaculate, which can be predicted by the long sperm and low coefficient of variation (CV) observed in this ciid. Studies have shown the association of polyandry with low variation in sperm length, because under high risk of sperm competition, males tend to produce more homogeneous sperm cells (Calhim et al., 2007). Thus, the low variation in sperm length can be traduced as higher sperm quality (Fitzpatrick and Baer, 2011; De Souza et al., 2018). For now, our data show that in *C. cornifer* the sperm supply is probably constant; therefore, selective pressure would favour also constant sperm competition.

4.2. Male reproductive system

Anatomically, the male reproductive system of *C. cornifer* resembles that of *Tenebrio molitor* L. (Tenebrionidae), mainly regarding the morphology and number of accessory glands (see Chapman, 1998). However, differences were observed in the position of the seminal vesicles, size of structures and, mainly, in the number of testicular follicles. Interestingly, all ciids studied until now have shown a reduction in number of the testicular follicles, compared to other Tenebrionoidea, as follows: In Ciidae, the number of testicular follicles seems to vary from 1 [*C. cornifer* and *C. furcifer* (personal observation)] to 3 [*Cis chinensis* (2), about 30 other species of *Cis* (3) and *Ha. blaisdelli* (3)] (see Klopfenstein and Graves, 1992; Lopes-Andrade, 2008). On the other hand, other members of Tenebrionoidea, can exhibit from 6 to more than 20 follicles per testis (see Supporting Information, Table S2). Considering the medium length of the members from the studied tenebrionoid families (e.g., Tenebrionidae, Rhipiphoridae and Meloidea) it is plausible to suppose that, in Ciidae, the reduction in the number of testicular follicles may be directly related to the small body size of these insects.

In addition, we verified the antiparallel organization of spermatozoa within the testicular cysts, where in each cyst, up to 256 sperm formed are organized into two antiparallel clusters of up to 128 cells each. Although this antiparallel organization occurs in all previously studied Tenebrionoidea (Dias et al., 2012; 2013a, b; 2015; see also Nardi et al., 2013), the number of cell division cycles and, therefore, the final number of sperm per cyst, is quite variable and can differ as follows: up to 512 in *Tr. castaneum*, *Zoo. confusa*, *Te. molitor* (Tenebrioninae) and *U. dermestoides* (Diaperinae), and up to 2048 in *Lagriia villosa* (Lagriinae) (Dias et al., 2012, 2013a, 2015). In *C. cornifer*, with up to 256 per cyst, the number of cell divisions is the same as exhibited in *Ma. tricuspidata* (Rhipiphoridae) (see Fig. 1C in Nardi et al., 2013) (see Supporting Information, Table S2).

The antiparallel organization of sperm in cysts occurs in families not closely related within Tenebrionoidea. However, this feature has not been observed in representatives from other superfamilies,

as follows: Curculionidae (Burrini et al., 1988; see also the figures in Koçakoğlu et al., 2019), Chrysomelidae (Baccetti and Daccordi, 1988; Dallai et al., 1998); Cerambycidae (Dallai et al., 1998); Coccinellidae (Dallai et al., 2017); Elateridae, Buprestidae and Lampyridae (Dias et al., 2020); Erotylidae and Endomychidae (personal observation). Therefore, it is possible to assume that the antiparallel organization may be an exclusive condition of Tenebrionoidea, a taxon considered monophyletic (see Lawrence and Newton, 1995; Beutel and Friedrich, 2005; Buder et al., 2008; Bocák et al., 2014; Kergoat et al., 2014).

4.3. Sperm ultrastructure

The sperm length of *C. cornifer*, with about 355 μm , is close to that found in *Te. molitor* (310 μm), *Hy. scutellatus* (362 μm) and *Zon. flava* (365 μm) (Baccetti et al., 1973; Nardi et al., 2013), which show the longest sperm lengths among the studied tenebrionoids (see Supporting Information, Table S2). The acrosome (about 3 μm) with a perforatorium similar to that observed in other tenebrionid beetles (Dias et al., 2013b). The sperm nucleus of *C. cornifer* is very small (considering the sperm total size) and, as in *Tr. castaneum* (see Dias et al., 2015), tapers from the base to its anterior tip and, at the posterior tip, forms a lateral indentation housing the anterior portion of the larger mitochondrial derivative.

During spermatogenesis in Tenebrionoidea beetles, by a still unclear cellular mechanism, spermatids give rise to two sperm clusters, inside the same cyst, arranged with their nuclei facing opposite poles (Dias et al., 2015). In a cross section through these cysts, at the mid-flagellar region of sperm, the antiparallel orientation of these cells can be recognized by the orientation of dynein arms in the microtubule doublets of axoneme (Fig. 5G', arrowheads), which in some cells appear clockwise and in others anticlockwise (Fig. 5G, arrows).

The MDs in *C. cornifer* sperm showed strong asymmetry (one MD is about 4x thicker than the other one). Such asymmetry also occurs in another species of the *furcifer* group, *C. furcifer* (personal observation), in *Te. molitor* (Baccetti et al., 1973) and *Tr. castaneum* (Dias et al., 2010, 2015), but it was not observed in the other aforementioned Tenebrionoidea (*U. dermestoides*, *Zoo. confusa*, *L. villosa*, *Ma. tricuspidata*, *Zon. flava*, *Hy. scutellatus* and *My. varabilis*). It is worth noting that, although the orientation of dynein arms of the axoneme is clockwise and anticlockwise due to the antiparallel arrangement of spermatozoa in the cyst, the MDs exhibit the same position in all sperm cell of the cyst (Fig. 5G – note that arrows indicate opposite orientations, but the position of the MDs is the same in both spermatids). Therefore, if we took, for example, these two spermatozoa and placed their axonemes in the same orientation, we would have two different cells, one with the larger MD to the left of the axoneme and the other one with the larger MD to the right of the axoneme. Therefore, what we clearly see in *C. cornifer* sperm (as in *Te. molitor* and *Tr. castaneum*) are two distinct cell types in the same cyst, characterizing a sperm dimorphism.

It is possible to assume that this antiparallel orientation of sperm with this pattern of dimorphism optimizes the organization of cells inside the cyst, allowing a maximum compaction and, therefore, a smaller testicular area per cyst. Thus, it is plausible to suppose that this orientation may have arisen as result of the dimorphism of mitochondrial derivatives and remained in tenebrionid beetles.

5. Conclusion

Some features observed in *C. cornifer* seem to be related to the small size of these beetles: the growth of only one oocyte at a time in

females and the marked reduction in the number of testicular follicles in males. Our observations also point out to a constant copulatory activity of the females, which would provide a continuous supply of sperm in their reduced spermatheca. In males, the antiparallel organization of spermatozoa in the cyst (a condition present to date in all studied Tenebrionoidea and absent in other beetles) reinforces the position of Ciidae within this superfamily. Finally, we observed in *C. cornifer* sperm, as well as in other tenebrionid beetles, two distinct cell types, characterizing sperm dimorphism. Aside from that we also suggest that the antiparallel orientation of spermatozoa in the cyst optimizes its organization, allowing its maximum compaction. We assume that antiparallelism may have arisen as a result of dimorphism in mitochondrial derivatives and has remained in Tenebrionoidea. The descriptions provided here help to unveil the internal and the sperm morphology of Ciidae, expand the knowledge on the Tenebrionoidea sperm, and will contribute to future studies on the coleopteran spermatology.

Funding

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ethics approval

Not applicable.

Authors' contributions

Camila Folly: Conceptualization, Methodology, Investigation, Illustration, Writing - Original Draft, Writing - Review and Editing; Italo Salvatore de Castro Pecci Maddalena: Investigation, Writing - Review and Editing, Visualization; Cristiano Lopes Andrade: Writing - Review and Editing, Visualization; José Lino-Neto: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review and Editing, Supervision.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (research grant numbers 308432/2018-5 (CLA), and 306486/2019-9 (JLN)). We thank Julio Chaul, Ademária M. Novais, Glenda Dias, Hélio P. Pereira-Filho and Lenise S. Carneiro for their help in field collection of *Ceracis cornifer* and other ciids. Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) and Laboratório de Sistemática e Biologia de Coleoptera (LabCol) from Universidade Federal de Viçosa are acknowledged for technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.asd.2021.101088>.

References

Antunes-Carvalho, C., Sandoval-Gómez, V.E., Lopes-Andrade, C., 2012. *Grossicis*, a new genus of Neotropical minute treefungus beetles (Coleoptera: Ciidae), with a detailed discussion on its systematic position in the family. *C R Biol.* 335, 107–119.

Baccetti, B., Burrini, A.G., Dallai, R., Giusti, F., Mazzini, M., Renieri, T., Rosati, F., Selmi, G., 1973. Structure and function in the spermatozoon of *Tenebrio molitor* (the Spermatozoon of Arthropoda XX). *J. Mechanochem. Cell Motil.* 2, 149–161.

Baccetti, B., Daccordi, M., 1988. Sperm structure and phylogeny of the Chrysomelidae. In: Jolivet, P., Petitpierre, E., Hsiao, T.H. (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*. Academic Press, Kluwer, pp. 357–378.

Beutel, R.G., Friedrich, F., 2005. Comparative study of larvae of Tenebrionoidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Eur. J. Entomol.* 102, 241–264.

Bocák, 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. *Syst. Entomol.* 39, 97–110.

Buder, G., Grossmann, C., Hundsdoerfer, A., Klass, K.D., 2008. A contribution to the phylogeny of the Ciidae and its relationship with other cucujoid and tenebrionid beetles (Coleoptera: Cucujiformia). *Arthropod. Syst. Phyl.* 66, 165–190.

Burrini, A.G., Magnano, L., Magnano, A.R., Scala, C., Baccetti, B., 1988. Spermatozoa and phylogeny of Curculionoidea (Coleoptera). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17, 1–50.

Callim, S., Immler, S., Birkhead, T.R., 2007. Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One* 2 (5), e413.

Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*, fourth ed. University Press, New York: Cambridge, p. 788.

Dallai, R., 2014. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod Struct. Dev.* 43, 257–290.

Dallai, R., Afzelius, B.A., 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J. Struct. Biol.* 103, 164–179.

Dallai, R., Afzelius, B.A., Lupetti, P., Osella, G., 1998. Sperm structure of some Curculionoidea and their relationship with Chrysomeloidea. *Mus. Reg. Sci. Nat. (Torino)* 16, 27–50.

Dallai, R., Gottardo, M., Beutel, R.G., 2016. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 1–23.

Dallai, R., Lupetti, P., Frati, F., Afzelius, B.A., Mamaev, B.M., 1996. Spermatozoa from the supertribes Lasioteridi and Stomatosematidi (Insecta, Diptera, Cecidomyiidae): ultrastructure data and phylogeny of the subfamily Cecidomyiinae. *Zool. Scripta* 25, 51–60.

Dallai, R., Machida, R., Uchifune, T., Lupetti, P., Frati, F., 2005. The sperm structure of *Galloisiana yuasai* (Insecta, Grylloblattodea) and implications for the phylogenetic position of Grylloblattodea. *Zoomorphology* 124, 204–212.

Dallai, R., Mercati, D., Carapelli, A., Nardi, F., Machida, R., Sekiya, K., Frati, F., 2011. Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta s.s. *Arthropod Struct. Dev.* 40, 77–92.

Dallai, R., Mercati, D., Lino-Neto, J., Dias, G., Lupetti, P., 2017. Evidence of a pro-centriole during spermiogenesis in the coccinellid insect *Adalia decempunctata* (L.): an ultrastructural study. *Arthropod Struct. Dev.* 46, 815–823.

De Souza, A.R., Folly, C., Dias, G., Santos, E.F.S., Lino-Neto, J., 2018. Sperm morphometric in males of the paper wasp *Polistes simillimus*. *Bull. Insectol.* 71, 51–56.

Dias, G., Gomes, L.F., Lino-Neto, J., 2010. Sperm morphology of *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Disponível em*. <http://www.csbmm2011.com.br/arearestrita/arquivos/16873>.

Dias, G., Lino-Neto, J., Dallai, R., Mercati, D., Lupetti, P., 2020. The sperm ultrastructure of the click beetles (Elateridae) and related groups (Buprestidae and Lampyridae). *Arthropod Struct. Dev.* 49, 100978.

Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., Dallai, R., 2015. The sperm ultrastructure and spermiogenesis of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) with evidence of cyst degeneration. *Micron* 73, 21–27.

Dias, G., Oliveira, C.M., Lino-Neto, J., 2013a. Testicular and spermatogenic characteristics of *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae) with taxonomic inferences. *Tissue Cell* 45, 227–230.

Dias, G., Oliveira, C.M., Lino-Neto, J., 2013b. Sperm morphology and phylogeny of lagriids (Coleoptera, Tenebrionidae). *Arthropod Struct. Dev.* 42, 379–384.

Dias, G., Yotoko, K.S.C., Gomes, L.F., Lino-Neto, J., 2012. Uncommon formation of two antiparallel sperm bundles per cyst in tenebrionid beetles (Coleoptera). *Naturwissenschaften* 3, 1–5.

Doyen, J.T., 1993. Cladistic relationships among Pimeliinae Tenebrionidae (Coleoptera). *J. New York Entomol. S.* 101, 443–514.

Fitzpatrick, J.L., Baer, B., 2011. Polyandry reduces sperm length variation in social insects. *Evolution* 65, 3006–3012.

Graf-Peters, L.V., Lopes-Andrade, C., Silveira, R.M.B., Moura, L.A., Reck, M.A., Nogueira-de-Sá, F., 2011. Host fungi and feeding habits of Ciidae (Coleoptera) in a subtropical rainforest in southern Brazil, with an overview of host-fungi of neotropical ciids. *Fla. Entomol.* 94, 553–566.

Grebennikov, V.V., 2008. How small you can go: factors limiting body miniaturization in winged insects with a review of the pantropical genus *Discheramocephalus* and description of six new species of the smallest beetles (Pterygota: Coleoptera: Ptiliidae). *Eur. J. Entomol.* 105, 313–328.

Gumier-Costa, F., Lopes-Andrade, C., Zacaro, A.A., 2003. Association of *Ceracis cornifer* (Mellié) (Coleoptera: Ciidae) with the bracket fungus *Pycnoporus sanguineus* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *Neotrop. Entomol.* 32, 359–360.

Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*, first ed. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, p. 555.

Kergoat, G.J., Soldati, L., Clamens, A.L., Jourdan, H., Zahab, R., Genson, G., Bouchard, P., Condamine, F.L., 2014. Higher-level molecular phylogeny of darkling beetles (Coleoptera, Tenebrionoidea, Tenebrionidae). *Syst. Entomol.* 39, 486–499.

Klopfenstein, W.G., Graves, R.C., 1992. Morphology of the digestive and reproductive systems of adult *Hadraule blaisdelli* (Casey) (Coleoptera: Ciidae). *Coleopt. Bull.* 46, 344–356.

Koçakoglu, N.O., Candan, S., Güllü, M., 2019. The histomorphological structure of the male reproductive system of maize leaf weevil *Tanymeus dilaticollis* Gyllenhal, 1834 (Coleoptera: Curculionidae). *Microsc. Res. Tech.* 82, 1345–1352.

- Koçakoglu, N.Ö., Candan, S., Güllü, M., 2021. Structural and ultrastructural characters of the reproductive tract in females of the mint leaf beetle *Chrysolina herbacea* (Duftschmid 1825) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Zool.* 1–11, 00.
- Lawrence, J.F., 1973. Host preference in ciid beetles (Coleoptera: Ciidae) inhabiting the fruiting bodies of Basidiomycetes in North America. *Bull. MCZ* 145, 163–212.
- Lawrence, J.F., 2016. The Australian Ciidae (Coleoptera: Tenebrionoidea): a preliminary revision. *Zootaxa* 4198, 1–208.
- Lawrence, J.F., Lopes-Andrade, C., 2010. Ciidae leach in Samouelle, 1819. In: Leschen, R.A.B., Beutel, R.G., Lawrence, J.F. (Eds.), *Handbook of Zoology*, second ed., vol. 2. Walter de Gruyter GmbH and Co. KG, Germany/USA, pp. 504–514.
- Lawrence, J.F., Newton Jr., A.F., 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). In: Pakaluk, J., Silipiniski, S.A. (Eds.), *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating 80th Birthday of Roy Albert Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN., Warszawa, pp. 779–1006.
- Lino-Neto, J., Bão, S.N., Dolder, H., 2000. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool.* 81, 205–211.
- Lopes-Andrade, C., 2008. The first record of *Cis chinensis* Lawrence from Brazil, with the delimitation of the *Cis multidentatus* species-group (Coleoptera: Ciidae). *Zootaxa* 1755, 35–46.
- Lopes-Andrade, C., Grebennikov, V.V., 2015. First record and five new species of Xylographellini (Coleoptera: Ciidae) from China, with online DNA barcode library of the family. *Zootaxa* 4006, 463–480.
- Minelli, A., Fusco, G., 2019. No limits: breaking constraints in insect miniaturization. *Arthropod Struct. Dev.* 48, 4–11.
- 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, 463–475.
- Oliveira, E.H., Lopes-Andrade, C., Lawrence, J.F., 2013. Review of the neotropical Ciidae (Insecta: Coleoptera) in the *Cis taurus* species-group. *Arthropod. Syst. Phyl.* 71, 181–210.
- Pecci-Maddalena, I.S.C., Lopes-Andrade, C., 2017. Systematics of the *Ceracis furcifer* species-group (Coleoptera: Ciidae): the specialized consumers of the blood-red bracket fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Insects* 8, 70.
- Pecci-Maddalena, I.S.C., Sandoval-Gómez, V.E., Lopes-Andrade, C., 2014. *Ceracis zarathustrai* sp. nov. (Coleoptera: Ciidae) from the atlantic forest biome. *Zoologia-Curitiba* 31, 482–488.
- Snodgrass, R.E., 1935. *Principles of Insect Morphology*, 1st edition. McGraw-Hill Book Company, New York, p. 667.
- Souza-Gonçalves, I., Lopes-Andrade, C., 2018. The *Cis bilamellatus* species-group (Coleoptera: Ciidae) in southern Africa: *Cis mooihoeke* sp. n. and new distributional records. *Afr. Invertebr.* 59, 25–35.
- Souza-Gonçalves, I., Lopes-Andrade, C., Lawrence, J.F., 2020. Three new species of *Hadrule* Thomson (Coleoptera: Ciidae) from the Southern Hemisphere with an identification key to world species. *Aust. Entomol.* 59, 74–87.
- Tombs, A.S., Roppel, R.M., 1972. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Insect Morphol.* 1, 141–152.
- Wick, M., 2012. The GeoNames geographical database. Available online. www.geoNames.org. (Accessed 11 April 2021).

CAPÍTULO 2 – EROTYLIDAE

Descrição dos espermatozoides em Erotylinae (Coleoptera, Erotylidae), a primeira em Cucujoidea

Camila Folly, Ítalo S.C. Pecci-Maddalena, José Lino-Neto

Resumo

Estudos sobre a ultraestrutura dos espermatozoides em besouros Cucujiformia ainda estão restritos a poucas famílias dentro de Tenebrionoidea, Chrysomeloidea, Curculionoidea e Coccinelloidea. Apesar da recente redefinição de Cucujoidea, a classificação interna dessa superfamília ainda é problemática, e sinapomorfias morfológicas ainda não foram reconhecidas para a superfamília. Historicamente, Erotylidae (Cucujoidea) passou por diferentes classificações sistemáticas e, embora atualmente seja considerada monofilética, existem dúvidas sobre as relações internas de vários táxons. Até o momento, em Erotylidae, há trabalhos descrevendo a terminália abdominal e um estudo anatômico do sistema reprodutor em *Megalodacne heros*, porém, os espermatozoides em Erotylidae – ou qualquer táxon dentro de Cucujoidea – são, até então, desconhecidos. Aqui, fornecemos, pela primeira vez, um estudo histológico dos testículos e uma descrição dos espermatozoides de Erotylidae, sob microscopia de luz e MET. Membros das três tribos de Erotylinae de ocorrência na região Neotropical (Erotylini, Tritomini e Megalodacnini) foram examinados. Mostramos que a morfologia testicular e dos espermatozoides podem fornecer dados importantes para a sistemática de Erotylidae. Evidenciamos características ultraestruturais que ainda não foram observadas em nenhum outro táxon de Coleoptera, e que podem caracterizar os espermatozoides dessa família. Além das características comuns entre as tribos, e diferenças na região de transição núcleo-flagelo colocam Tritomini e Megalodacnini mais próximas entre si do que qualquer uma delas com Erotylini.

1. Introdução

Nos insetos, o estudo dos espermatozoides tem fornecido caracteres informativos em diversos táxons, incluindo besouros (Baccetti e Daccordi, 1988; Burrini et al., 1988; Jamieson et al., 1999). No entanto, estudos sobre a ultraestrutura dos espermatozoides em besouros Cucujiformia ainda estão restritos a poucas famílias dentro de Tenebrionoidea (Baccetti et al., 1973; Dias et al., 2013a, 2015, 2021; Nardi et al., 2013; Folly et al., 2021), Chrysomeloidea (Baccetti and Daccordi, 1988; Jamieson et al., 1999), Curculionoidea (Burrini et al., 1988; Lino-Neto e Dolder, 1995; Jamieson et al., 1999) e Coccinelloidea (Dallai et al., 2017, 2018, 2019; Dias et al., 2020). Apesar da sua redefinição recente, a classificação interna da superfamília Cucujoidea ainda é problemática, e sinapomorfias morfológicas que sustentem o grupo ainda não foram reconhecidas (Leschen et al., 2005; Robertson et al., 2015). Historicamente, Cucujoidea tem sido considerada um “lixo taxonômico” para besouros cujas famílias possuem hábitos similares (Leschen et al., 2005; Robertson et al., 2015).

Erotylidae (Cucujoidea), composta principalmente por espécies micetófagas (Leschen & Buckley, 2007; Leschen et al., 2010), passou por diversas classificações sistemáticas até ser estabelecida como a conhecemos atualmente (Węgrzynowicz, 2002; Leschen et al., 2005). Erotylidae inclui cerca de 3500 espécies em 260 gêneros (Lawrence & Ślipiński, 2013), distribuídos em seis subfamílias: Cryptophilinae, Erotylinae, Languriinae, Loberinae, Pharaxonothinae e Xenoscelinae. A subfamília Erotylinae é a mais diversa (mais de 2500 espécies) e inclui cinco tribos: Dacnini, Encaustini, Erotylini, Megalodacnini e Tritomini (Leschen et al., 2010; Bouchard et al., 2011) – as três últimas de ocorrência na Região Neotropical.

Erotylidae foi considerada monofilética nas três hipóteses filogenéticas disponíveis para a família (ver Węgrzynowicz, 2002; Leschen, 2003; Robertson et al., 2004), porém existem dúvidas sobre as relações internas de vários táxons (Leschen et al., 2010; Pecci-Maddalena et al., 2020). Em Erotylinae, as tribos Erotylini, Megalodacnini e Encaustini são consideradas monofiléticas em todas as análises (Węgrzynowicz, 2002; Leschen, 2003; Robertson et al., 2004), Dacnini aparece como grupo artificial apenas em Robertson et al. (2004), enquanto Tritomini seria um grupo artificial em todas as hipóteses (Węgrzynowicz, 2002; Robertson et al., 2004; Leschen et al., 2010; Pecci-Maddalena et al., 2020).

Até o momento, em Erotylidae, há trabalhos que descrevem a terminália abdominal de machos e fêmeas (e.g. Pecci-Maddalena e Lopes-Andrade, 2017; Pecci-Maddalena et al., 2020, 2021; Powell e Skelley, 2021) e um trabalho descrevendo a morfologia do sistema reprodutor em *Megalodacne heros* (Say) (Megalodacnini) (McHugh et al., 1997). Porém, não

existem estudos publicados sobre os espermatozoides em Erotylidae ou qualquer outra família de Cucujoidea. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia dos espermatozoides de táxons pertencentes às três tribos de Erotylinae que ocorrem na região Neotropical (Erotylini, Tritomini e Megalodacnini), e discutir as implicações dos resultados em relação à classificação desses grupos.

2. Material e Métodos

2.1. Espécies Examinadas

A classificação supragenérica de Erotylidae usada aqui segue Bouchard et al. (2011), e a nomenclatura taxonômica das espécies segue os trabalhos de Alvarenga (1994) e Skelley (2020). Representantes das seguintes tribos de Erotylinae foram examinados:

Erotylini Latreille:

Iphiclus abdominalis (Olivier)

Iphiclus flavovittatus (Duponchel)

Iphiclus rubidus (Duponchel)

Tritomini Curtis:

Mycotretus trifasciatus Guérin

Pselaphacus signatus Guérin-Ménéville

Triplax brasiliensis (Guérin)

Megalodacnini Sen Gupta:

Megalodacne indica (Linnaeus)

Os indivíduos foram coletados entre 2016 e 2021, na Mata do Paraíso e no campus da Universidade Federal de Viçosa, incluindo a Mata da Biologia, todos no município de Viçosa, MG, Brasil (S20° 45', W42° 52'). Posteriormente, foram fotografados em estereomicroscópio Zeiss Discovery V20 equipado com câmera digital Zeiss AxioCam 506, no Laboratório de Sistemática e Biologia de Coleoptera (LabCol) da UFV.

2.2. Microscopia de Luz

Para examinar testículos e espermatozoides, indivíduos machos sexualmente maduros de cada espécie foram dissecados em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2 (PBS). Os testículos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em PBS por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e incluídas em historesina Leica. Cortes semifinos (0,5 μ m) foram obtidos em micrótomo automático com navalhas de vidro, montados em lâminas histológicas e corados com solução filtrada de Giemsa 1:15 em água destilada.

Para determinar o comprimento total dos espermatozoides e de suas regiões, ductos deferentes dos mesmos indivíduos, imediatamente após a dissecação, foram transferidos para uma gota de PBS sobre lâminas histológicas, onde os espermatozoides foram espalhados. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente, coradas com Giemsa e fotografadas. Para medir os núcleos, algumas amostras foram coradas com DAPI, lavadas em água corrente e cobertas com lamínula sobre solução de sacarose a 50%.

Todas as imagens foram obtidas em microscópio Olympus BX-60 equipado com câmera digital Olympus Q-Color3 e, para lâminas coradas com DAPI, equipado também com filtro de excitação BP 360-370 nm. Para imagens histológicas de testículos, vários quadros foram capturados com a lente objetiva de 40x e montados em imagens panorâmicas. As medições do comprimento dos espermatozoides e de suas partes foram obtidas usando o software Image-J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), e a média foi calculada a partir do número total de células analisadas (n = 30, por indivíduo).

2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para observar a ultraestrutura dos espermatozoides, testículos e ductos deferentes foram dissecados em PBS e fixados em solução de glutaraldeído 2,5% com sacarose 2% em PBS. As amostras foram lavadas em água destilada e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol, em acetona 100%, e incluídos em resina Epoxi (Epon 812). Cortes ultrafinos (~ 60 nm) foram obtidos em ultramicrótomo automático RMC Power Tome-X com navalha de diamante, colocados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 0,2%. Todas as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM109), operando a 80 kV, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3. Resultados

Todos os *Erotylinae* examinados (Fig. 1A–B) possuem dois testículos esféricos, e cada um composto por apenas um folículo (Fig. 2A e C). Uma cápsula testicular envolve cada testículo e parte do respectivo ducto deferente (Fig. 2A), que inicialmente aparece justaposto lateralmente ao testículo. No entanto, ao remover a cápsula, ocorre uma rotação lateral (de 90°) do testículo em relação à extremidade anterior do ducto deferente. O único folículo testicular é totalmente preenchido com cistos em diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 2A e C). Ao final da espermiogênese os cistos, contendo até 512 células germinativas cada (Fig. 2D), são observados próximos à saída para o ducto deferente, onde se rompem liberando os espermatozoides que deixam os testículos individualizados (Fig. 1A e C).

Em todos os táxons amostrados, os espermatozoides exibem os mesmos componentes estruturais (Figs. 1, 3–5): um complexo acrossomal apical trilaminar (vesícula acrossomal com uma cavidade interna irregular onde se insere o perforatório e uma camada extracrossomal) (Figs. 3A, 4A–B, 5A), seguido de um núcleo filiforme e eletrondenso que, em corte transversal, tem forma elipsoidal com duas calhas laterais quase diametralmente opostas (Figs. 3B, 4C e 5B). Os componentes flagelares são dois derivados mitocondriais, um axonema e dois corpos acessórios (Figs. 3E, 4F e 5E). Os derivados mitocondriais (DMs) são quase tão longos quanto ao axonema, têm forma elipsoidal em corte transversal, ambos com uma região central menos eletrondensa, e são notavelmente assimétricos em diâmetro. O DM maior está posicionado diametralmente oposto ao axonema, enquanto o DM menor, à direita do axonema, representa cerca de 1/4 do diâmetro maior. O axonema começa abaixo da ponta posterior do núcleo, e tem o padrão de 9+9+2 microtúbulos: nove microtúbulos únicos externos (túbulos acessórios), nove duplas de microtúbulos periféricas e dois microtúbulos centrais, todos conectados por pouco material intertubular (Figs. 3E e 4F).

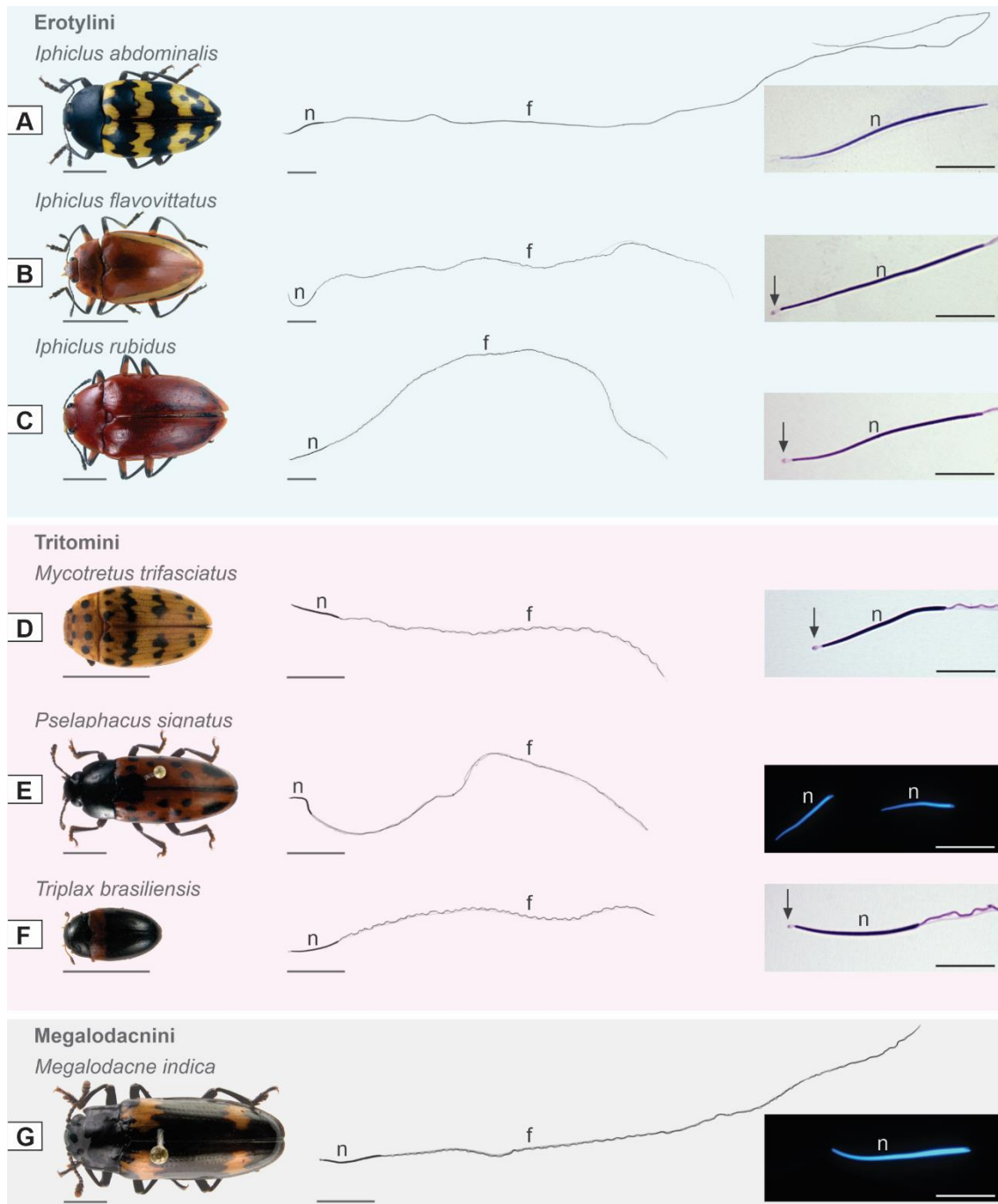


Figura 1 – Espécies examinadas seguidas, na mesma linha, de seu espermatozoide, evidenciando região de núcleo (n) e flagelo (f), e de um detalhe da região da cabeça do espermatozoide, corado com DAPI para evidenciar o núcleo (n) (E e G) ou Giemsa (A–D e F), mostrando acrosso (seta) e núcleo (n) . (A) *Iphiclus abdominalis* (Olivier), (B) *Iphiclus flavovittatus* (Duponchel), (C) *Iphiclus rubidus* (Duponchel), (D) *Mycotretus trifasciatus* Guérin, (E) *Pselaphacus signatus* Guérin-Méneville, (F) *Triplax brasiliensis* (Guérin) e (G) *Megalodacne indica* (Linnaeus). Barras: espécimes = 3mm; espermatozoides = 25 μ m; núcleos = 10 μ m.

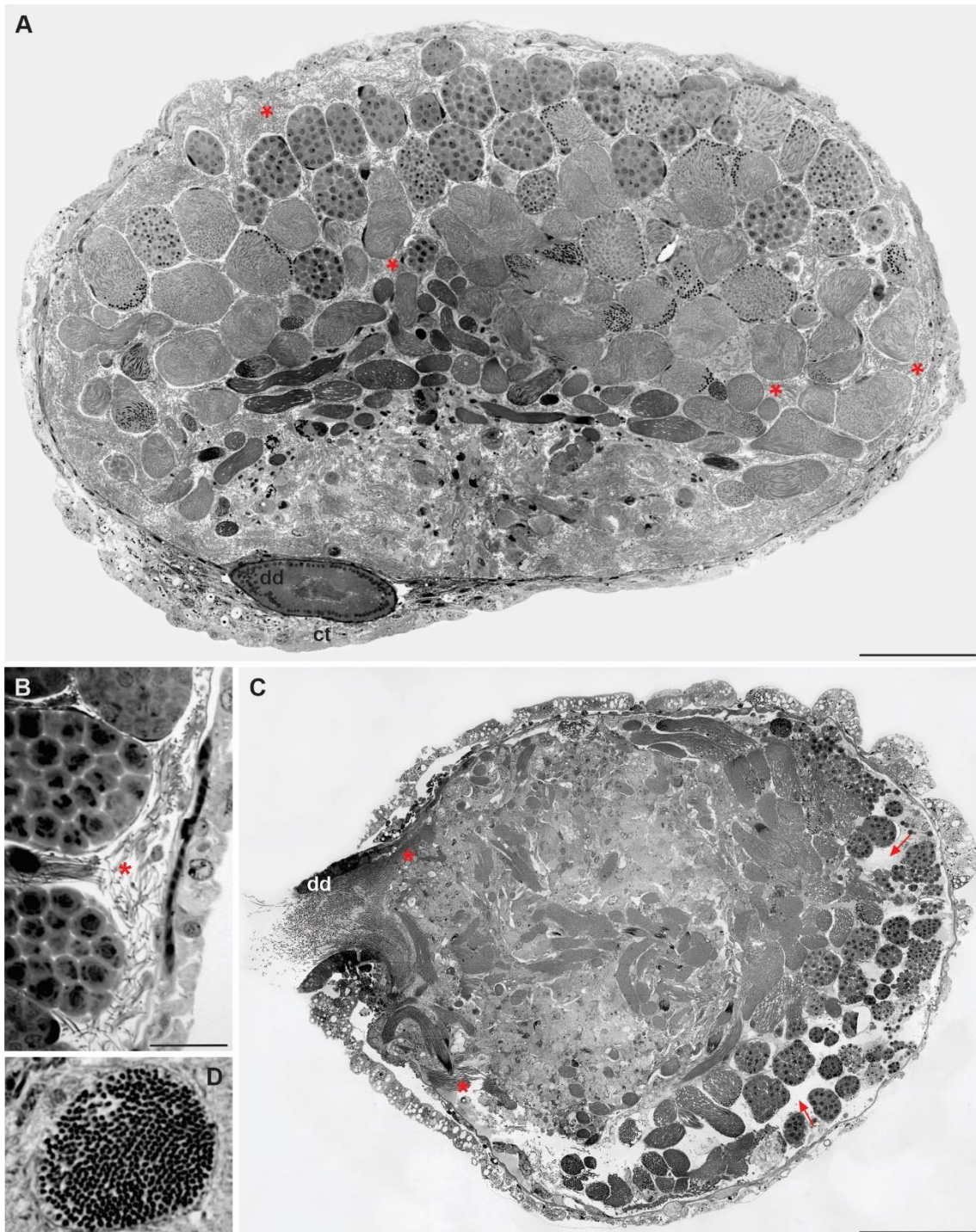


Figura 2 – Cortes histológicas de testículo de besouros Erotylidae. (A) Corte transversal em *Iphiclus flavovittatus* (Duponchel). Note a cápsula testicular (ct) envolvendo o testículo e o ducto deferente (dd), os cistos em diferentes estágios da espermatogênese (1, 2, 3), e os espermatozoides maduros espalhados por todo o testículo (asteriscos). (B) Detalhe de um corte transversal em *Iphiclus rubidus* (Duponchel), mostrando os espermatozoides (asterisco) mesmo entre os cistos (c) jovens. (C) Corte longitudinal em *Pselaphacus signatus* Guérin-Méneville. Note os cistos em diferentes estágios da espermatogênese (1, 2, 3), e os espermatozoides livres (asteriscos) apenas na região próxima ao ducto deferente (dd) e não preenchendo os espaços entre os cistos (setas). (D) Corte transversal em *Megalodacne indica* (Linnaeus) mostrando um cisto, em estágio avançado, com 465 espermatozoides. Barras: A e C = 200 μm ; B = 50 μm ; D = 10 μm .

Os corpos acessórios, envolvendo parcialmente o axonema, exibem uma porção eletrondensa com aspecto fusiforme ou subtriangular em corte transversal, e uma expansão (“puff like”) em forma de “C” – mais desenvolvida do lado do DM maior – composta por um material menos compacto e, na cavidade do “C”, outro material ainda mais frouxo (Figs. 3E, 4F e 5E). No final do flagelo, os corpos acessórios terminam primeiro (Fig. 3F), em seguida o DM menor (Figs. 3G e 4G), depois o DM maior, então o axonema, que desorganizou antes do término do DM maior (Figs. 3H e 4H). Ainda nessa região do flagelo, uma camada de material denso, circundando o axonema e parcialmente o DM maior é observada (Figs. 3G–H e 4G–H). É possível notar na microscopia de luz que, quando os componentes do flagelo são separados pela manipulação, dois deles permanecem unidos nessa extremidade.

Apesar das similaridades que definem um padrão geral, algumas particularidades podem ser observadas nos testículos, no tamanho e no arranjo dos componentes estruturais dos espermatozoides, como será descrito a seguir.

3.1. *Erotylini*

Em *I. flavovittatus* e *I. rubidus*, quando os cistos se rompem, os espermatozoides se espalham por todo o testículo, entre os cistos ainda em desenvolvimento (Fig. 2A–B). Ainda, nos ductos deferentes dos indivíduos dessas duas espécies não foram observadas regiões correspondentes à vesícula seminal. Os espermatozoides de *I. abdominalis*, *I. flavovittatus* e *I. rubidus* têm cerca de 880 μm (núcleo: 35 μm), 470 μm (núcleo: 37 μm) e 400 μm (núcleo: 35 μm) de comprimento, respectivamente (Fig. 1A–C). O acrossomo apresenta uma camada extracrossomal discreta; em corte transversal, tem formato elíptico a quase circular, e aparenta ter a base contínua com a extremidade anterior do núcleo (Fig. 3A). O núcleo é uniformemente preenchido por cromatina densamente compactada (Fig. 3B) e, na sua extremidade posterior, ele é chanfrado e, próximo a uma das calhas laterais, há um recuo onde se aloja a extremidade anterior do DM maior e um discreto material do adjunto do centríolo (Fig. 3C). Logo depois surge o DM menor (Fig. 3D) e, depois da extremidade posterior do núcleo, surgem o axonema e os dois corpos acessórios (Fig. 3E).

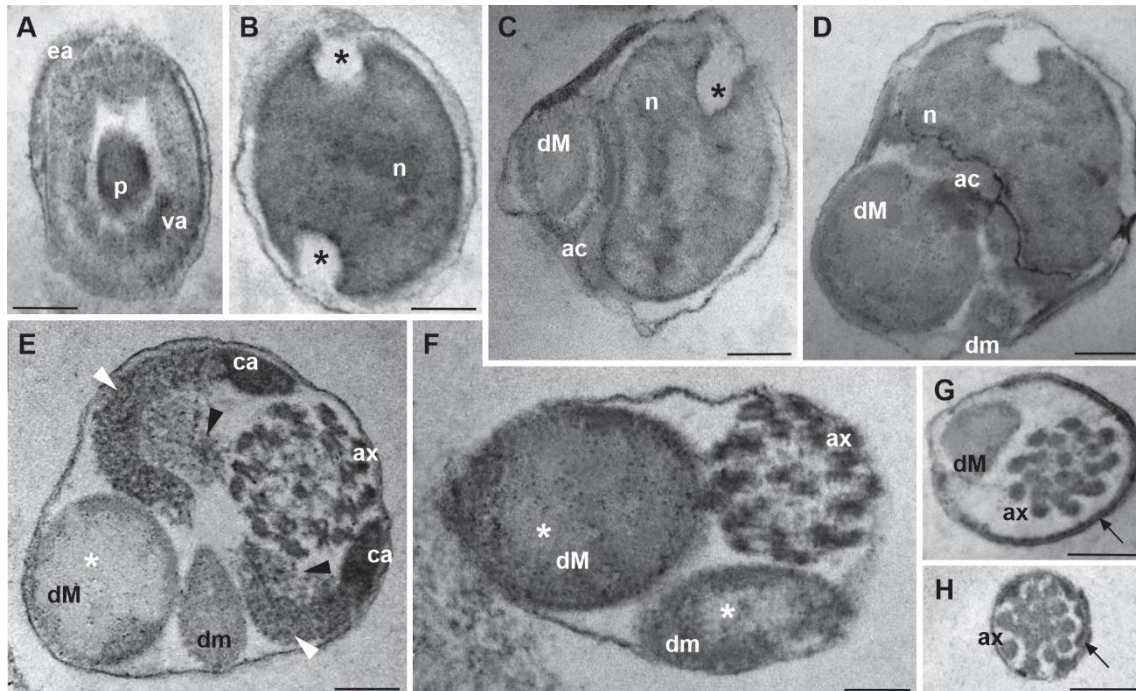


Figura 3 – Cortes transversais em espermatozoides de *Iphiclus flavovittatus* (Duponchel) (A–C, E, F e H) e *Iphiclus abdominalis* (Olivier) (D e G), sob microscopia eletrônica de transmissão. (A) Acrossomo mostrando perforatório (p), vesícula acrossomal (va) e camada extracrossomal (ea). (B) Núcleo (n) com cromatina homogeneamente compacta; note as calhas laterais (asteriscos). (C, D) Região de transição núcleo-flagelo mostrando um recuo do núcleo (n), onde surge a ponta anterior do derivado mitocondrial maior (dM) e, posteriormente, o derivado mitocondrial menor (dm). Note o adjunto de centríolo (ac) discreto. (E) Flagelo mostrando axonema (ax), dois corpos acessórios (ca) e dois derivados mitocondriais assimétricos e dois corpos acessórios (ca). Observe um derivado maior (dM), oposto ao axonema, e um derivado menor (dm), deslocado lateralmente, ambos com uma região central menos eletrondensa (asteriscos em E e F). Nos corpos acessórios (ca); note uma expansão com um material menos compacto (cabeças de seta brancas) e uma região amorfa ainda menos densa (cabeças de seta pretas). (F–H) Porção final do flagelo. Observe que os corpos acessórios terminam primeiro (F), posteriormente, o derivado menor (G) e o derivado maior, restando apenas o axonema (ax) desorganizado (H); note, em G e H, uma camada densa (seta) unindo os elementos flagelares. Barras: 100 nm.

3.2. Tritomini

Nas espécies examinadas de Tritomini, quando os cistos se rompem ao final da espermiogênese, os espermatozoides não se espalham por todo o testículo, sendo observados apenas próximo à saída para o ducto deferente (Fig. 2C). Uma região dilatada do ducto deferente, que corresponde à vesícula seminal, foi observada. Os espermatozoides de *My. trifasciatus*, *P. signatus* e *T. brasiliensis*, têm cerca de 177 μm (núcleo: 22 μm), 195 μm (núcleo: 13 μm) e 165 μm (núcleo: 22 μm) de comprimento, respectivamente (Fig. 1D–F). O acrossomo é mais afilado, achatado e curvado na extremidade anterior, ao mesmo tempo que a camada extracrossomal se torna mais espessa e com projeções laterais (Fig. 4A–B). A base do perforatório se insere em uma cavidade excêntrica na ponta do núcleo. O núcleo, ainda que preenchido por cromatina compactada, apresenta pequenas regiões eletrólucidas (Fig. 4C). Diferentes das espécies anteriores, a extremidade anterior do DM maior está inserida em uma

cavidade excêntrica na base do núcleo, entre as duas calhas laterais (Fig. 4D). A porção posterior de núcleo que circunda o DM maior vai diminuindo até que as duas estruturas assumem formato de meia-lua e se posicionem lado a lado associadas pelas faces planas (Fig. 4E). O DM menor aparentemente surge depois da extremidade final do núcleo, junto com o axonema.

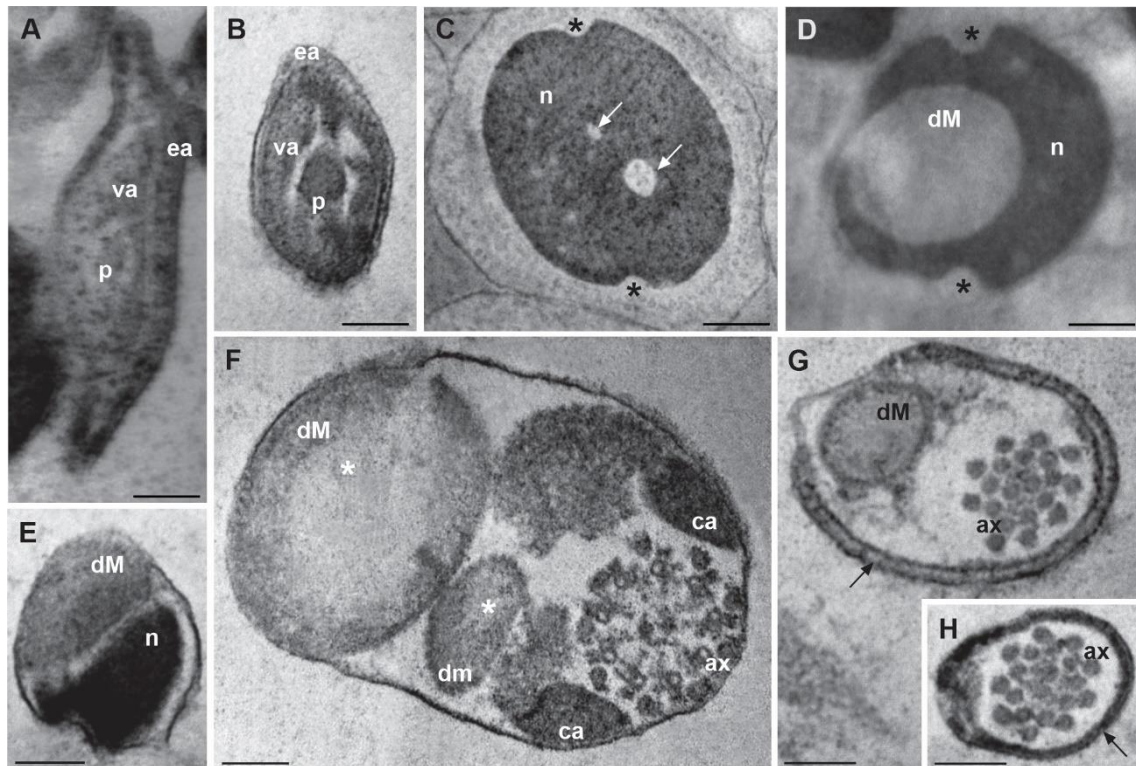


Figura 4 – Cortes transversais em espermatíde e espermatozoides de *Mycotretus trifasciatus* Guérin (A e C), *Pselaphacus signatus* Guérin-Ménéville (D) e *Triplax brasiliensis* (Guérin) (B e E–H) sob microscopia eletrônica de transmissão. (A, B) Acrossomo mostrando perforatório (p), vesícula acrossossal (va) e camada extracrossossal (ea); note o corte na região apical (A), mais achatado do que na base (B), e com projeções laterais da camada extracrossossal. (C) Núcleo (n) com cromatina homogeneamente compacta; note as calhas laterais (asteriscos) e as cavidades no núcleo (setas brancas). (D, E) Região de transição núcleo-flagelo mostrando o derivado mitocondrial maior (dM) surgindo dentro do núcleo (n), abraçado por ele (D), e posteriormente (E), quando a extremidade final do núcleo já está menor e não envolve mais o derivado mitocondrial. (F) Flagelo mostrando axonema (ax), dois derivados mitocondriais assimétricos e dois corpos acessórios (ca). Observe os derivados mitocondriais com uma região central menos eletrondensa (asteriscos). (G, H) Porção final do flagelo. Observe que derivado menor termina primeiro (G) e, posteriormente, o derivado maior, restando apenas o axonema (ax) desorganizado (H), note que uma camada densa (seta preta) une os elementos flagelares. Barras: 100 nm.

3.3. *Megalodacnini*

Em *Me. indica*, como nos *Erotylini*, quando os cistos se rompem os espermatozoides se espalham por entre os cistos em todo o testículo. Nesta espécie, os espermatozoides têm aproximadamente 257 μm , dos quais 22 μm representam o núcleo (Fig. 1G). A estrutura geral

dos espermatozoides nesta espécie é quase a mesma dos Tritomini (Fig. 5). O DM maior, como nos Tritomini, tem a extremidade anterior inserida em uma cavidade excêntrica na base do núcleo (Fig. 5C–D), entre suas duas calhas laterais, mas mais próxima a uma delas.

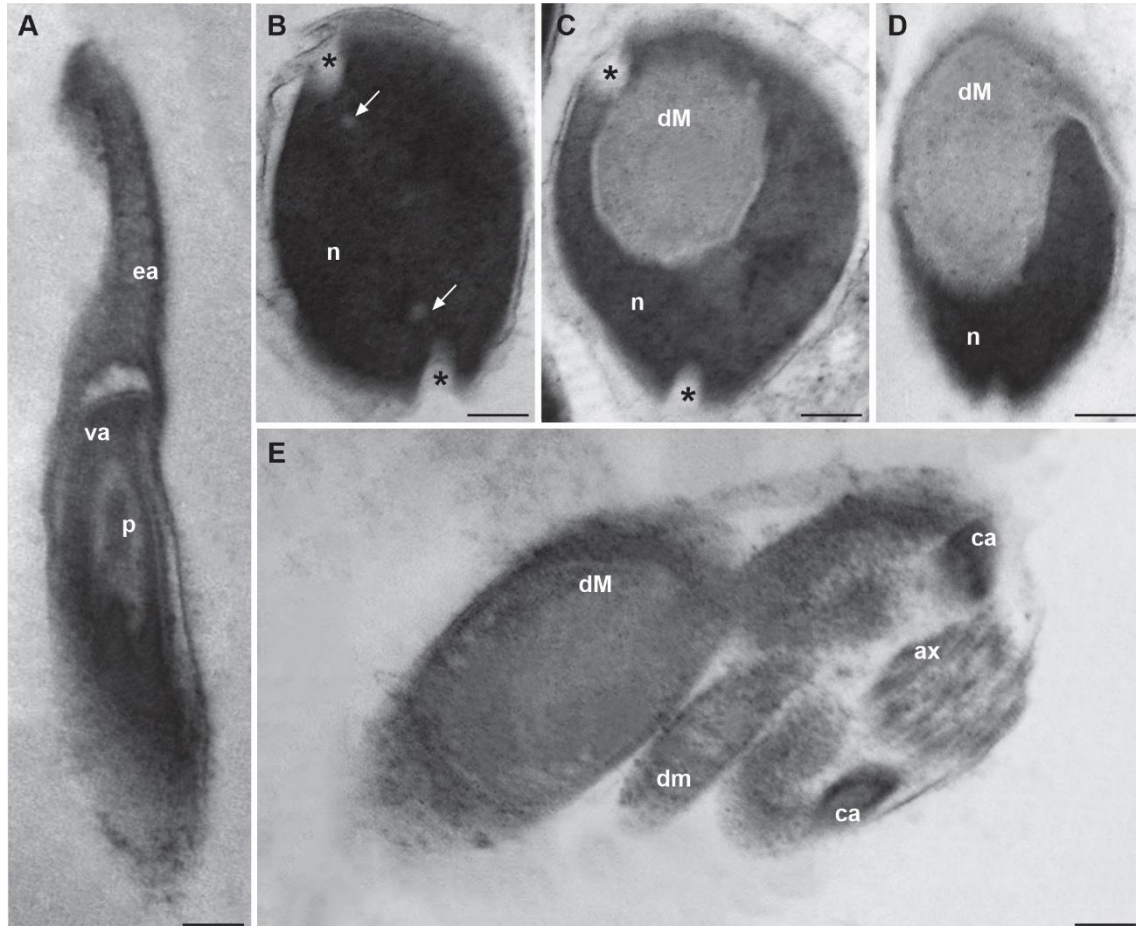


Figura 5 – Cortes longitudinal (A) e transversais (B–E) em espermatozoides de *Megalodacne indica* (Linnaeus) sob microscopia eletrônica de transmissão. (A) Região apical do acrossomo, mostrando perfuratório (p), vesícula acrossomal (va) e camada extracrossomal (ea). (B) Núcleo (n) com cromatina homogeneamente compacta; note as calhas laterais (asteriscos) e as cavidades no núcleo (setas). (C, D) Região de transição núcleo-flagelo mostrando o derivado mitocondrial maior (dM) surgindo dentro do núcleo (n), abraçado por ele (C), e posteriormente (D), quando a extremidade final do núcleo já não envolve completamente o derivado mitocondrial. (E) Flagelo mostrando axonema (ax), dois derivados mitocondriais assimétricos e dois corpos acessórios (ca). Barras: 100 nm.

4. Discussão

A anatomia dos testículos de todos os táxons examinados segue o mesmo padrão descrito por McHugh et al. (1997) para *Me. heros*. A organização dos cistos testiculares e o número de espermatozoides por cisto foram as mesmas em todas as espécies. No entanto, espermatozoides maduros e individualizados espalhados por toda área interna dos testículos foram notados apenas em *I. flavovittatus*, *I. rubidus* (Erotylini) e *Me. indica* (Megalodacnini).

Essa característica incomum está, provavelmente, relacionada com a ausência de uma vesícula seminal diferenciada. Os testículos não são, originalmente, locais de armazenamento e maturação de espermatozoides, assim, nas espécies em que não ocorrem vesículas conspícuas ou diferenciadas, é possível que os testículos desempenhem o papel de reservatórios, i.e., onde os espermatozoides maduros permanecem e, aos poucos, vão passando para os ductos deferentes à medida que estes esvaziam devido às cópulas.

Os tamanhos médios dos espermatozoides foram diferentes entre as três tribos, embora similares dentro de cada tribo; exceto em *I. abdominalis*, cujos espermatozoides são aproximadamente duas vezes mais longos em relação às outras duas espécies de *Iphichlus* (Erotylini).

O padrão ultraestrutural dos espermatozoides pode oferecer bons caracteres diagnósticos (Dias et al., 2013a). Nos flagelos dos espermatozoides de Erotylidae observamos uma expansão dos corpos acessórios conhecida como “puff-like”, que também ocorre em outros Cucujoidea, e.g., *Carpophilus hemipterus* (Nitidulidae) e *Cryptolestes ferrugineus* (Laemophloeidae) (obs. pes.). Tal característica foi também observada em Curculionoidea (ver Burrini et al., 1988; Lino-Neto e Dolder, 1995; Jamieson et al., 1999) e Chrysomeloidea (ver Baccetti e Daccordi, 1988; Jamieson et al., 1999), mas não ocorre nos táxons já examinados de Tenebrionoidea (ver Dias et al., 2013a, 2015, 2021; Nardi et al., 2013; Folly et al., 2021). Na hipótese de Robertson et al. (2015), Cucujoidea + (Curculionoidea + Chrysomeloidea) formam um clado, enquanto Tenebrionoidea seria um grupo filogeneticamente mais distante. Portanto, é possível que a presença de “puff-like” seja uma sinapomorfia compartilhada por Cucujoidea + (Curculionoidea + Chrysomeloidea).

Em geral a ultraestrutura dos espermatozoides é bastante similar ou pode exibir variações discretas em níveis taxonômicos abaixo de família. Aqui observamos diferenças entre as tribos examinadas, especialmente na região de transição entre o núcleo e o flagelo. Em Erotylini, por exemplo, o núcleo chanfrado forma um recuo lateral que abriga as extremidades anteriores dos derivados mitocondriais, especialmente do derivado maior; enquanto em Tritomini e Megalodacnini, o derivado maior é inserido em uma cavidade na base do núcleo. Chrysomeloidea (Baccetti e Daccordi, 1988) e de muitos Curculionoidea – exceto Curculioninae e Apionidae – (ver Burrini et al., 1988; Lino-Neto e Dolder, 1995). Ainda, o núcleo é completamente preenchido por cromatina em Erotylini, mas é cavitado em Tritomini e Megalodacnini.

De acordo com as hipóteses filogenéticas atuais, Erotylini e Megalodacnini representam grupos monofiléticos (Węgrzynowicz, 2002; Leschen, 2003; Robertson et al., 2004), e o

padrão ultraestrutural dos espermatozoides, revelado aqui, concorda com essa hipótese. Apesar do monofiletismo de Erotylini ser suportado por dados morfológicos e moleculares, o gênero *Iphiclus* – que atualmente inclui 10 subgêneros (Alvarenga, 1994) – seria parafilético segundo Robertson et al. (2004) e carece de revisão taxonômica. Cabe notar que os subgêneros de *Iphiclus* foram estabelecidos com base em características superficiais (e.g. forma do corpo), em antigos trabalhos de taxonomia (e.g. Crotch, 1876; Kuhnt, 1909), sem uma metodologia cladística e, portanto, sem suporte filogenético. As três espécies de *Iphiclus* amostradas neste estudo pertencem ao mesmo subgênero (*Iphiclus* Chevrolat), no entanto as diferenças encontradas entre *I. abdominalis* (tanto no comprimento dos espermatozoides quanto na ausência de espermatozoides maduros e individualizados espalhados pelo testículo) e as outras duas espécies de *Iphiclus* examinadas, sugere que elas talvez pertençam a grupos ou subgrupos distintos, o que deverá ser verificado em futuros estudos filogenéticos sobre o gênero.

Tritomini, por sua vez, constitui um grupo artificial em todos os cenários (ver Węgrzynowicz, 2002; Leschen et al., 2010; Robertson et al., 2004; Pecci-Maddalena et al., 2020). É importante notar que as três espécies examinadas dessa tribo, provavelmente, pertencem ao mesmo complexo morfológico, i.e., um potencial clado, definido por similaridades morfológicas no aparelho bucal, metendosternito, genitália, dentre outras estruturas (Pecci-Maddalena et al., 2020; Pecci-Maddalena com. pess.). O padrão morfológico similar verificado na ultraestrutura dos espermatozoides de *My. trifasciatus*, *P. signatus* e *T. brasiliensis*, está de acordo com a hipótese de que essas, e outras espécies dentro de Tritomini, podem ser proximamente relacionadas. As similaridades morfológicas observadas na ultraestrutura dos espermatozoides de *Megalodacne indica* (Megalodacnini) e os Tritomini examinados também são congruentes com a hipótese de Węgrzynowicz (2002), que coloca Megalodacnini (+ Encaustini), de maneira parafilética, dentro de Tritomini.

É importante notar que as três hipóteses filogenéticas disponíveis para Erotylidae foram publicadas há quase duas décadas (ver Węgrzynowicz, 2002; Leschen, 2003; Robertson et al., 2004) e novos caracteres e táxons precisam ser examinados e analisados para a proposição de novas hipóteses sobre as relações evolutivas dentro da família, especialmente à luz das mudanças classificatórias recentes em Cucujoidea (ver Robertson et al., 2015).

Estudos sobre a ultraestrutura dos espermatozoides de espécimes coletados em campo e que, muitas vezes, ocorrem em um intervalo de tempo curto ao longo do ano – como é o caso de Erotylidae – dificultam o aumento da amostragem taxonômica utilizada. Ainda assim,

representantes das três tribos de Erotylinae presentes na região Neotropical foram amostrados aqui.

5. Conclusão

Em conclusão, mostramos que a morfologia testicular e dos espermatozoides podem fornecer dados importantes para a sistemática de Erotylidae. Características ultraestruturais, como as calhas laterais no núcleo, ainda não foram observadas em nenhum outro táxon de Coleoptera, e pode caracterizar os espermatozoides dessa família – ou, pelo menos, dessa subfamília. As especificidades da região de transição núcleo-flagelo também colocam Tritomini e Megalodacnini mais próximas entre si do que qualquer uma delas com Erotylini. As características morfológicas encontradas aqui podem, futuramente, ser incorporadas em matrizes filogenéticas de dados morfológicos em Erotylidae.

Agradecimentos:

Este trabalho foi apoiado pelas agências brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (bolsa de pesquisa nº 306486 / 2019-9 (JLN)). Agradecemos ao Prof. Cristiano Lopes Andrade, Igor Gonçalves, Artur Orsetti, Glauco Martins, Paulo H. Rezende e Glenda Dias por sua ajuda nas coletas dos exemplares de Erotylidae, e à Profa. Lêda Faroni pelos exemplares de Nitidulidae e Laemophloeidae. O Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) e o Laboratório de Sistemática e Biologia de Coleoptera (LabCol) da Universidade Federal de Viçosa são reconhecidos pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas:

- Alvarenga, M., 1994. Catálogo dos Erotylidae (Coleoptera) Neotropicais. *Revista Brasileira de Zoologia*, 11, 1–175.
- Baccetti, B., Burrini, A.G., Dallai, R., Giusti, F., Mazzini, M., Renieri, T., Rosati, F., Selmi, G., 1973. Structure and function in the spermatozoon of *Tenebrio molitor*. *The*

- spermatozoon of Arthropoda XX. *Journal of Mechanochemistry & Cell Motility* 2, 149e161.
- Baccetti, B., Daccordi, M., 1988. Sperm structure and phylogeny of the Chrysomelidae. In: Jolivet, P., Petitpierre, E., Hsiao, T.H. (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*. Academic Press, Kluwer, pp. 357e378.
- 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., Ślipiński, A., Smith, A.B.T., 2011. Family-group names in Coleoptera (Insecta). *Zookeys*, 88, 1–972.
- 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 Embryology* 17, 1e50.
- Crotch, G.R., 1876. A revision of the coleopterous family Erotylidae. *Cistula Entomologica*, 1, 377–572.
- 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, 286e298.
- Dallai, R., Mercati, D., Lino-Neto, J., Dias, G., Folly, C., Lupetti, P., 2019. The peculiar structure of the flagellar axoneme in Coccinellidae (Insectae Coleoptera). *Arthropod Structure & Development*, 49, 19e50.
- Dallai, R., Mercati, D., Lino-Neto, J., Dias, G., Lupetti, P., 2017. Evidence of a procentriole during spermiogenesis in the coccinellid insect *Adalia decempunctata* (L): an ultrastructural study. *Arthropod Structure & Development*, 46, 815e823.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Dallai, R., Mercati, D., Lupetti, P., 2020. Sperm ultrastructure of three species of ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). *Arthropod Structure & Development*, 55, 100919.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., Dallai, R., 2015. The sperm ultrastructure and spermiogenesis of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) with evidence of cyst degeneration. *Micron* 73, 21e27.
- Dias, G., Oliveira, C.M., Lino-Neto, J., 2013a. Sperm morphology and phylogeny of lagriids (Coleoptera, Tenebrionidae). *Arthropod Structure & Development*, 42, 379e384.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., Fanciulli, P.P., Lupetti, P., Dallai, R., 2021. The sperm ultrastructure of *Pytho depressus* (Linnaeus, 1767) (Coleoptera, Pythidae). *Micron*, 148, 103111.

- Folly, C., Pecci-Maddalena, I.S.C., Lopes-Andrade, C., Lino-Neto, J., 2021. 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.
- Jamieson, B.G.M., Dallai, R., Afzelius, B.A., 1999. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*, first ed. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, p. 555.
- Kuhnt, P., 1909. Coleoptera, fam. Erotylidae, subfam. Erotylinae. Fasc. 88. In: Wytsman, P, (Ed.), *Genera Insectorum*, vol. 5. Verteneuil & L. Desmet, Brussels, 139 p.
- Lawrence, J.F., Ślipiński, A., 2013. *Australian beetles. Morphology, classification and keys*. Collingwood: CSIRO.
- Leschen, R.A.B., 2003. Erotylidae (Insecta: Coleoptera: Cucujoidea): phylogeny and review. *Fauna of New Zealand*, 47, 1–108.
- Leschen, R.A.B., Lawrence, J.F., Ślipiński, A., 2005. Classification of basal Cucujoidea (Coleoptera: Polyphaga), cladistic analysis, keys and review of new families. *Invertebrate Systematics*, 19, 17–73.
- Leschen, R.A.B., Buckley, T.R., 2007. Multistate characters and diet shifts: Evolution of Erotylidae (Coleoptera). *Systematic Biology*, 56, 97–112.
- Leschen, R.A.B., Skelley, P.E., McHugh, J.V., 2010. Erotylidae Leach, 1815. In: Leschen, R.A.B., Beutel, R.G., Lawrence, J.F., (Eds.), *Handbook of Zoology*, vol. 4. Walter de Gruyter GmbH and Co. KG, Germany/USA, pp. 311–319.
- Lino-Neto, J., Dolder, H., 1995. Characteristics of the spermatozoon of *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). In: Jamieson, B.G.M., Ausio, J., Justine, J.-L. (Eds.), 1995. *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*, vol. 166. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, pp. 297e300.
- McHugh, J.V., Marshall, C.J., Fawcett, F.L., 1997. A study of adult morphology in *Megalodacne heros* (Say) (Coleoptera: Erotylidae). *Transactions of the American Entomological Society*, 123, 167–223.
- 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, 463e475.
- Pecci-Maddalena, I.S.C., Lopes-Andrade, C., 2017. Redescription of two species and proposal of a new synonym in the genus *Mycotretus* Lacordaire, 1842 (Coleoptera: Erotylidae: Tritomini). *Zootaxa*, 4282, 147–165.

- Pecci-Maddalena, I.S.C., Lopes-Andrade, C., Skelley, P., 2020. The metendosternite and penile flagellum: two unexplored character systems of pleasing fungus beetles (Coleoptera: Erotylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1–20.
- Pecci-Maddalena, I.S.C., Skelley, P., Lopes-Andrade, C., 2021. Taxonomic review of *Mycomystes* Gorham, 1888 (Coleoptera: Erotylidae: Tritomini). *Journal of Natural History*, 54,47–48.
- Powell, G.S., Skelley, P.E., 2021. Revision of *Myceporthus* Skelley & Powell, 2018 (Coleoptera: Erotylidae: Erotylinae: Tritomini). *Insect Systematics & Evolution*. doi: 10.1163/1876312X-bja10007.
- Robertson, J.A., McHugh, J.V., Whiting, M.F., 2004. A molecular phylogenetic analysis of the pleasing fungus beetles (Coleoptera: Erotylidae): evolution of colour patterns, gregariousness and mycophagy. *Systematic Entomology*, 29, 173–187.
- Robertson, J.A., Ślipiński, A., Moulton, M., Shockley, F.W., Giorgi, A., Lord, N.P., Mckenna, D.D., Tomaszewska, W., Forrester, J., Miller, K.B., Whiting, M.F., McHugh, J.V., 2015. Phylogeny and classification of Cucujoidea and the recognition of a new superfamily Coccinelloidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Systematic Entomology*, 40, 1–34.
- Skelley, P.E., 2020. Nomenclatural notes for the Erotylinae (Coleoptera: Erotylidae). *Insecta Mundi*, 2020.
- Węgrzynowicz, P., 2002. Morphology, phylogeny and classification of the family Erotylidae based on adult characters (Coleoptera: Cucujoidea). *Genus*, 13, 435–504.
- Wick, M., 2012. The GeoNames geographical database. Available online. www.geonames.org. (Accessed 11 April 2021).

CAPÍTULO III – ENDOMYCHIDAE

Sistema reprodutor masculino, espermiogênese e espermatozoides em uma espécie de *Stenotarsus* Perty (Coccinelloidea: Endomychidae)

Camila Folly, Ítalo S.C. Pecci-Maddalena, José Lino-Neto

Resumo

Endomychidae são besouros considerados estreitamente relacionados aos Coccinellidae e, historicamente, ambas as famílias eram classificadas dentro da superfamília Cucujoidea, incluídos na Série “Cerylonid”. Desde a recente redefinição de Cucujoidea, a série tem sido reconhecida como uma superfamília independente, Coccinelloidea, considerada monofilética. No entanto, não existe consenso sobre suas relações internas e existem inúmeros problemas taxonômicos a serem resolvidos. Endomychidae têm um histórico taxonômico com muitas mudanças de classificação e movimento de táxons entre subfamílias. Até o momento, em Endomychidae, há trabalhos descrevendo a terminália abdominal em muitos táxons, mas nenhum descreveu as características ultraestruturais dos espermatozoides de Endomychidae – ou de qualquer outra família dentro de Coccinelloidea, que não Coccinellidae. Aqui, descrevemos, pela primeira vez, o sistema reprodutor e os espermatozoides em um representante de *Stenotarsus* (Endomychidae), um gênero com grande número de espécies, encontrado na região Neotropical. Mostramos as principais semelhanças entre os espermatozoides de Endomychidae e Coccinellidae: um acrossomo seguido de um corpo basal, que dá origem a um axonema com 9+9+2 microtúbulos, e um núcleo que corre paralelo aos componentes flagelares. Além disso, nossos estudos histológicos revelaram a presença de uma bomba ejaculatória, que parece ocorrer outros táxons de Endomychidae e Anamorphidae (Coccinelloidea), mas não em Coccinellidae. as estruturas descritas aqui jogam luz sobre o conhecimento morfológico em Endomychidae e podem auxiliar em futuros estudos taxonômicos em Coccinelloidea.

1. Introdução

Os Endomychidae são besouros, em sua maioria micetófagos, considerados estreitamente relacionados aos Coccinellidae (Tomaszewska 2000a, 2010). Ambas as famílias, historicamente, estiveram classificadas dentro da superfamília Cucujoidea, incluídos na Série “Cerylonid”, originalmente proposta por Crowson (1955). Estudos moleculares e pesquisas abrangentes em Cucujoidea resultaram na separação da antiga Série “Cerylonid” (Hunt, 2007; Bocak, 2014; Robertson et al., 2015) e, desde o estudo de Robertson et al. (2015), a série tem sido reconhecida como uma superfamília independente, Coccinelloidea, considerada monofilética.

A classificação atual de Endomychidae é baseada em dados morfológicos, a partir das análises cladísticas realizadas por Tomaszewska (2000a, 2005, 2010) e na filogenia molecular de Robertson et al. (2015). Essa classificação reconhece cerca de 90 gêneros e mais de 1600 espécies distribuídas em 9 subfamílias: Cyclotominae, Danascelinae, Endomychinae, Epipocinae, Leiestinae, Lycoperdininae, Merophysyiinae, Pleganophorinae e Xenomycetinae (Robertson et al., 2015; Tomaszewska et al., 2018b), com máxima diversidade em regiões tropicais e subtropicais (Shockley et al., 2009, Robertson et al., 2015; Bouchard et al., 2017; Tomaszewska et al., 2018b). Apesar dessa diversidade, o estudo morfológico de Endomychidae na região Neotropical tem sido negligenciado há décadas.

Desde o estabelecimento de Coccinelloidea como superfamília, diversas hipóteses de relacionamentos foram propostas para seus grupos internos. Porém, não existe consenso sobre essas relações e existem vários problemas taxonômicos a serem resolvidos (ver Robertson et al., 2015). Apesar das pesquisas que envolvem a descrição dos espermatozoides de Coccinellidae (e.g., Wang, 1998; Dallai et al., 2017, 2018, 2019; Dias et al. 2020), não existem informações sobre essas estruturas para os outros táxons de Coccinelloidea, como é o caso de Endomychidae.

Endomychidae têm um histórico taxonômico com muitas mudanças de classificação e movimento de táxons entre subfamílias, e muitos grupos necessitam de revisão taxonômica. As análises cladísticas de Endomychidae conduzidas por Tomaszewska (2000a, 2005) forneceram inúmeros caracteres morfológicos e propuseram alguns agrupamentos de espécies. No entanto, até hoje, nenhum trabalho descreveu as características ultraestruturais dos espermatozoides de Endomychidae – ou de qualquer outra família dentro de Coccinelloidea, que não Coccinellidae. Deste modo, o objetivo deste trabalho é descrever o sistema reprodutor e os espermatozoides em um representante de *Stenotarsus* Perty (Endomychidae), um gênero

com ~ 250 espécies (Shockley et al., 2009a; Arriaga-Varela et al., 2013) e tipicamente encontrado em áreas florestais na região Neotropical.

2. Material e Métodos

Indivíduos de *Stenotarsus* sp. (Fig. 1A) foram coletados em dezembro de 2019, sobre fungos em troncos de árvores, em dias ensolarados que sucederam um período chuvoso. As coletas foram realizadas na Mata do Paraíso, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa, MG, Brasil (S20° 45', W42° 52'). Posteriormente, foram fotografados em estereomicroscópio Zeiss Discovery V20 equipado com câmera digital Zeiss AxioCam 506, no Laboratório de Sistemática e Biologia de Coleoptera (LabCol) da UFV.

2.1. Microscopia de Luz

Machos sexualmente maduros de *Stenotarsus* sp. foram dissecados em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2 (PBS). Para examinar a histologia dos testículos, vesícula seminal e bomba ejaculatória, a fixação foi feita em glutaraldeído 2,5% em PBS por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e incluídas em historesina Leica. Cortes semifinos (0,5 µm) foram obtidos em micrótomo automático com navalhas de vidro, montados em lâminas histológicas e corados com solução filtrada de Giemsa 1:15 em água destilada. Para observar os cistos dentro dos folículos testiculares, alguns folículos foram individualizados depois da fixação, lavados, colocados sobre lâmina histológica e coberto com lamínula sobre uma solução de DAPI + meio de montagem.

Para determinar o comprimento total dos espermatozoides e de suas regiões, vesículas seminais foram transferidas para uma gota de PBS sobre lâminas histológicas, onde os espermatozoides foram espalhados. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente, coradas com Giemsa e fotografadas. Para determinar os tamanhos dos núcleos, algumas amostras foram coradas com solução de DAPI + meio de montagem e cobertas com lamínula.

As ilustrações do aparelho reprodutor foram feitas a partir das dissecções e observações em estereomicroscópio e, no caso da bomba ejaculatória, a reconstrução foi feita a partir de cortes histológicos sequenciais. Todas as imagens foram obtidas em microscópio Olympus BX-60 equipado com câmera digital Olympus Q-Color3 e, para lâminas coradas com DAPI,

equipado também com filtro de excitação BP 360-370 nm. Para imagens histológicas, vários quadros foram capturados com lentes de 40x ou 100x e montados em imagens panorâmicas. As medições do comprimento dos espermatozoides foram obtidas usando o software Image-J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), e a média foi calculada a partir do número de células íntegras analisadas (n = 18) a partir de 5 indivíduos.

2.2. *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

Para observar a ultraestrutura dos espermatozoides, folículos testiculares e vesículas seminais foram dissecados em PBS e fixados em solução de glutaraldeído 2,5% com sacarose 2% em PBS. As amostras foram lavadas em água destilada e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol, em acetona 100%, e incluídos em resina Epoxi (Epon 812). Cortes ultrafinos (~ 60 nm) foram obtidos em ultramicrotomo automático RMC Power Tome-X com navalha de diamante, colocados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 0,2%. Todas as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM109), operando a 80 kV, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3. Resultados

3.1. *Sistema Reprodutor Masculino*

O sistema reprodutor masculino de *Stenotarsus* sp. (Fig. 1B–C) consiste em um par de testículos, seguido por duas vesículas seminais bem desenvolvidas. Os dois ductos deferentes pós-vesiculares desembocam na extremidade anterior de um ducto ejaculatório único juntamente com, e ao lado de, dois pares de glândulas acessórias. Na porção posterior do ducto ejaculatório há uma bomba ejaculatória e, então, o edeago.

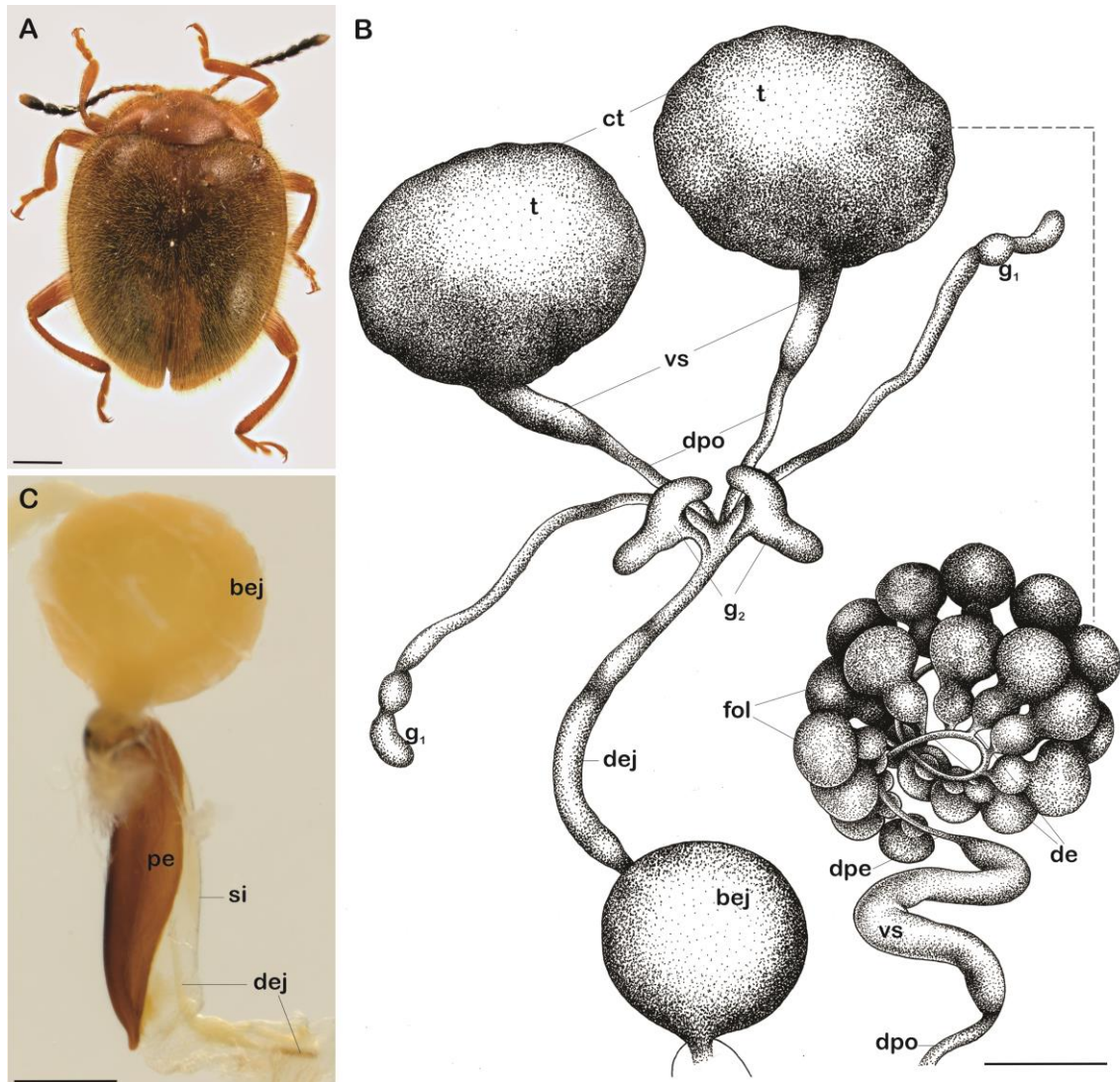


Figura 1 – Indivíduo macho (A) e aparelho genital (B, C) de *Stenotarsus* sp. (B) Desenho esquemático do sistema reprodutor mostrando testículos (t), vesículas seminais (vs), ducto deferente pós-vesicular (dpo), glândulas acessórias (g_1 , g_2), ducto ejaculatório (dej) e bomba ejaculatória (bej). No detalhe à direita, de um testículo sem a cápsula testicular, note o formato dos folículos (fol) e como cada um deles desemboca no ducto deferente pré-vesicular (dpe) por meio do ducto eferente (de). (D) Bomba ejaculatória seguida do pênis (pe). Extremidade final do ducto ejaculatório (dej); saco interno (si). Barras: A = 1mm; B, C = 0,5 mm.

Cada testículo é composto por cerca de 22 folículos piriformes, com uma porção globosa maior e uma constrição, seguida por uma porção menor, também globosa, seguida de um ducto eferente curto (Figs. 1B, detalhe, e 3A). Os folículos testiculares estão dispostos lado a lado ao longo da porção pré-vesicular delgada e longa do ducto deferente; como resultado desse arranjo, a porção pré-vesicular do ducto deferente é espiralada (Fig. 1B, detalhe). Nos folículos, internamente, são observados cistos em diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 3A–B).

Logo após a porção espiralada do ducto deferente – onde desembocam os folículos testiculares – há um alargamento conspicuo que corresponde à vesícula seminal (Fig. 1B).

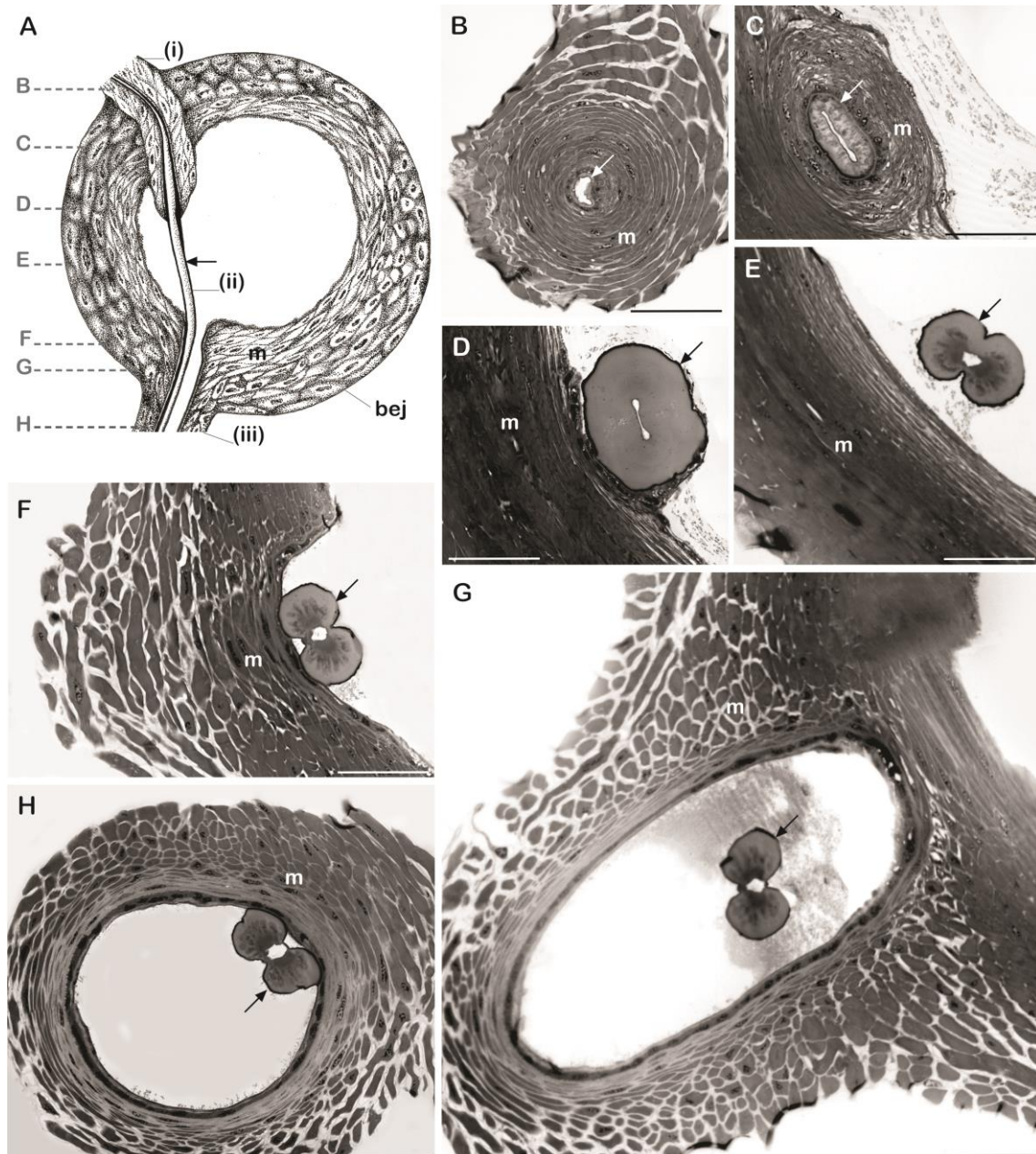


Figura 2 – Bomba ejacutória de *Stenotarsus* sp. (A) Desenho esquemático representando um corte longitudinal mostrando a espessa camada muscular (m) e o ducto ejacutório (seta) atravessando assimetricamente a bomba ejacutória (bej). As letras à esquerda representam a altura aproximada dos cortes transversais a seguir (B–G). Os números romanos representa as porções do ducto ejacutório descritas no texto: (i) (B–C) a porção anterior; (ii) (D–F) porção dentro na bomba ejacutória, quando a camada muscular não envolve diretamente o ducto; (iii) (G–H) porção pós-bomba ejacutória, onde a camada muscular se projeta posteriormente formado um canal por onde passa o ducto ejacutório. Barras: 200 μ m.

Cada vesícula possui uma porção dobrada, que fica coberta pela cápsula conjuntiva juntamente com os folículos testiculares, e uma porção não coberta (compare Fig. 1B e o detalhe). Nos indivíduos sexualmente maduros, a vesícula seminal fica completamente preenchida por espermatozoides já individualizados (Fig. 3C, D). A porção pós-vesicular do ducto deferente também é delgada – porém, não tanto quanto sua porção pré-vesicular – e alcança o ducto ejacutório concomitante com as glândulas acessórias (Fig. 1B).

Dois pares diferentes de glândulas acessórias (Fig. 1B) estão associados à extremidade anterior do ducto ejaculatório, lado a lado com os ductos deferentes: um par é branco, opaco e longo, com uma constrição próximo à sua porção anterior, e o outro par é curto, sinuoso – em forma de "s" – e translúcido.

O ducto ejaculatório é longo (Fig. 1B), e sua porção posterior atravessa o pênis até a extremidade posterior do saco interno (Fig. 1C). Esse ducto é revestido internamente por cutícula e, ao longo do seu comprimento, são observadas as seguintes porções distintas: (i) a porção mais anterior é longa, envolvida por uma camada muscular circular e se insere no bulbo ejaculatório (Figs. 1B, 2A–C); (ii) em seguida, essa camada muscular forma uma invaginação e, deixando de envolver o ducto ejaculatório, forma a bomba ejaculatória, que é larga e globosa (Figs. 1B–C e 2A); (iii) posteriormente a camada muscular da bomba ejaculatória se estreita formando um canal curto através do qual passa o ducto ejaculatório (Fig. 2A, D–F); (iv) a porção final do ducto ejaculatório é longa, atravessa o interior do pênis e se estende quase até a região posterior do saco interno (Fig. 1C).

3.2. *Espermiogênese e Espermatozoides*

Os cistos no estágio inicial da espermatogênese ocupam principalmente a região apical dos folículos (Fig. 3A). À medida que as espermátides se alongam dentro dos cistos, eles passam a ocupar a periferia dos folículos (Fig. 3B). Conforme a espermiogênese avança e as células vão eliminando o citoplasma, os cistos se movem em direção à saída do folículo que é o início do ducto eferente (Fig. 3B).

Logo no início da espermiogênese, nas espermátides ainda jovens e esféricas, as mitocôndrias se fundem formando o nebenkern (Fig. 4A). Imediatamente depois, este se separa em dois complexos mitocondriais (Fig. 4B) e, então, darão origem a dois derivados mitocondriais iguais nos espermatozoides (Fig. 5G). É possível identificar, próximo ao núcleo ainda esférico, um material do adjunto do centríolo fortemente corado (Fig. 4C, cabeças de setas). O núcleo assume diferentes formas à medida que se alonga durante a espermiogênese, variando desde esférico nas espermátides iniciais, passando por uma fase fusiforme nas espermátides medianas e tardias (Fig. 4D), até se alongar completamente e assumir uma posição lateral aos elementos flagelares (Fig. 5E–G). Enquanto as espermátides ainda estão alongando, percebe-se uma espécie de “bolha” encaixada em uma depressão formada lateralmente na metade posterior do núcleo, que desaparece no espermatozoide maduro. Ao final da espermiogênese, cada cisto contém até 128 espermatozoides (Fig. 4E).

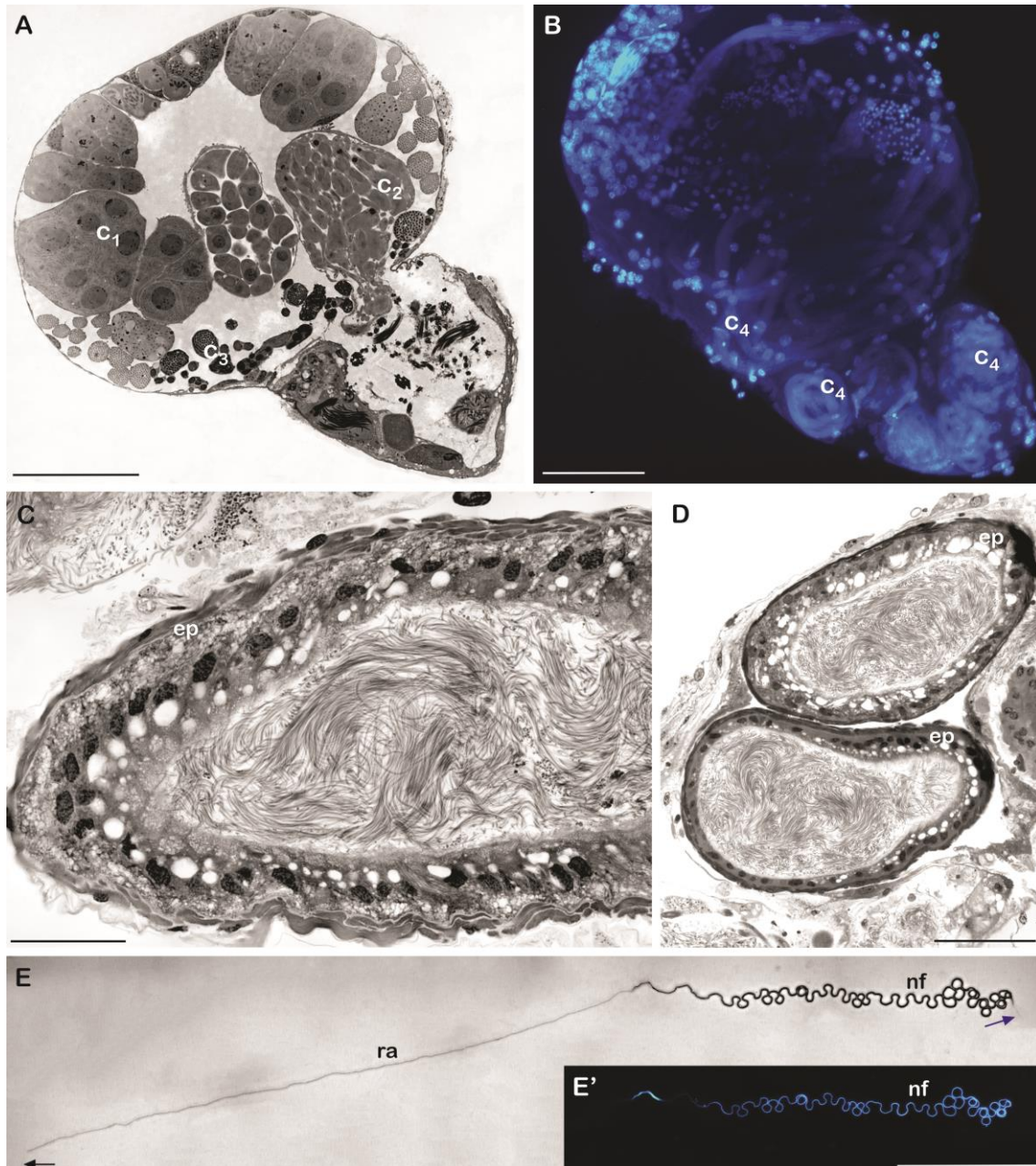


Figura 3 – Folículo testicular e espermatozoides de *Stenotarsus* sp. (A) Corte longitudinal de um folículo testicular mostrando cistos em diversos estágios da espermatogênese (c_1 , c_2 e c_3). (B) Montagem total de folículo testicular corado com DAPI, mostrando cistos em estágios avançados da espermiogênese (c_4). (C–D) Corte longitudinal (C) e transversal (D) das vesículas seminais; note o epitélio vesicular (ep) espesso e os espermatozoides preenchendo completamente o lúmen. (E–E') O mesmo espermatozoide corado com Giemsa (E) e DAPI (E'); note as regiões distintas: acrossomo (seta preta), região anterior (ra), região núcleo-flagelo (nf) e porção final (seta azul). Barras: 100 μm .

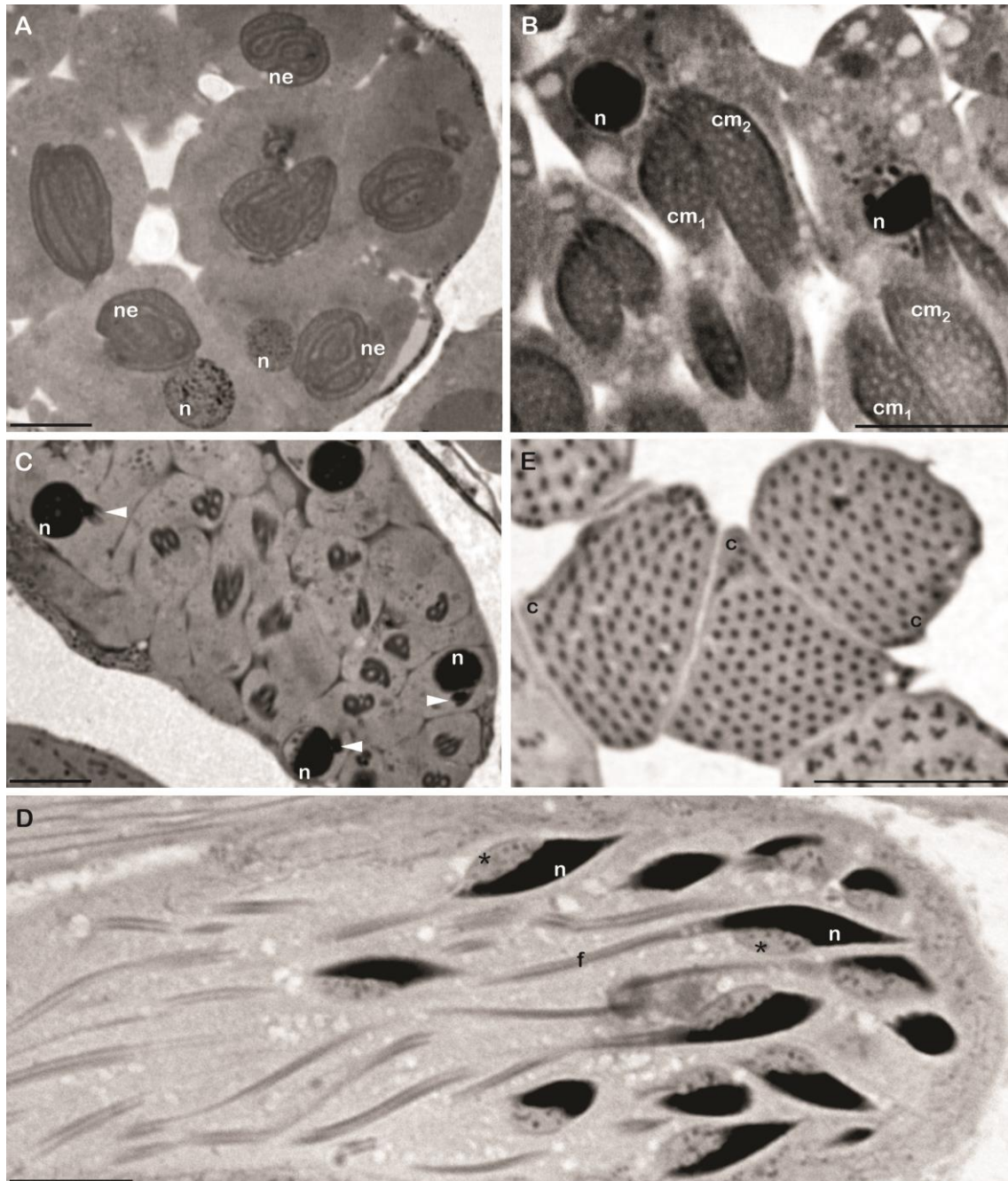


Figura 4 – Cortes histológicas de folículos testiculares mostrando detalhes da espermiogênese em *Stenotarsus* sp. (A) Espermátides jovens evidenciando nebenkern (ne) e núcleo (n). (B) Em seguida, o nebenkern se separa formando dois complexos mitocondriais (cm1 e cm2) próximos ao núcleo (n). (C) Detalhe de espermátides mostrando núcleo (n), ainda esférico, e o material do adjunto do centríolo (cabeça de seta). (D) Em uma fase mais avançada da espermiogênese, os núcleos (n) estão fusiformes e os flagelos (f) também estão se alongando; é possível notar uma “bolha” pouco densa associada à metade posterior do núcleo (asterisco). (E) Cistos (c) em estágio avançado da espermiogênese, com até 128 espermatozoides cada.

Os espermatozoides de *Stenotarsus* sp. são muito longos, com aproximadamente 1230 μm de comprimento (Fig. 3E). À microscopia de luz, é possível observar uma porção anterior longa e bastante delgada medindo aproximadamente 470 μm , seguida de uma porção mais longa e espessa, em geral, bastante ondulada medindo por volta de 760 μm , em que o núcleo

está ao lado dos elementos flagelares (Fig. 3E'). A parte final do espermatozoide, onde o núcleo já não está presente, tem apenas cerca de 13 μm de comprimento (Fig. 3E).

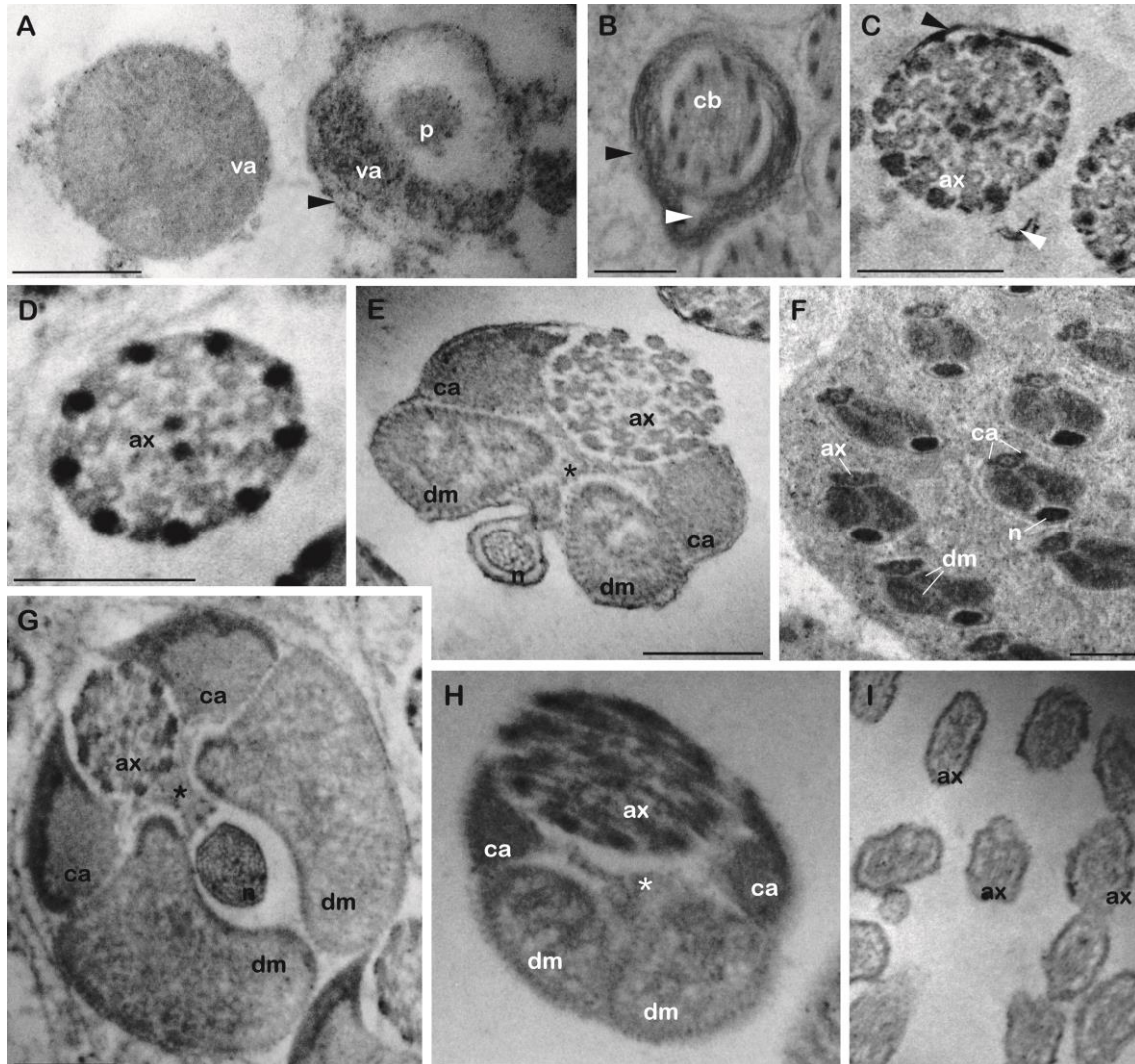


Figura 5 – Cortes transversais de espermatozoides de *Stenotarsus* sp. sob microscopia eletrônica de transmissão. (A) Acrossomo mostrando perforatório (p), vesícula acrossomal (va) e uma camada de material circundante (cabeça de seta). (B) Região anterior mostrando o corpo basal (cb); note uma extensão lateral do acrossomo (cabeça de seta branca), e a camada circundante (cabeça de seta preta), agora mais espessa. (C–D) Axonema com resquícios da extensão do acrossomo (cabeça de seta branca) e da camada circundante (cabeça de seta preta) (C), e uma região posterior sem esses elementos (D). (E–G) Região núcleo-flagelo. Note que anteriormente os derivados mitocondriais (dm) aparecem de ambos os lados do núcleo (n) (E); posteriormente eles aumentam em diâmetro (F), até ocuparem mais da metade do diâmetro total nessa região e envolverem completamente o núcleo (G). Os corpos acessórios (ca) aparecem sempre ao lado do axonema. (H) Extremidade posterior do flagelo, onde o núcleo já não está presente. (I) Extremidade final do espermatozoide, apenas com axonema já desorganizado. Barras: 200 nm.

À microscopia de eletrônica foi possível observar que na extremidade anterior da porção delgada está o acrossomo com o perforatório medindo aproximadamente 17 μm . Imediatamente depois do acrossomo tem-se o corpo basal (Fig. 5B), ambos revestidos pelo mesmo material, que é mais delgado no acrossomo que no corpo basal. No axonema, contínuo

com corpo basal, já é possível notar o padrão 9+9+2 microtúbulos (Fig. 5C–D). A porção espessa e longa é a região onde estão os componentes do flagelo e, paralelamente a eles, um núcleo bastante delgado (Fig. 5E–G). Na região do flagelo, além do axonema e do núcleo, ocorrem dois derivados mitocondriais simétricos e dois conspícuos corpos acessórios (Fig. 5E–G). No início do flagelo (Fig. 5E), os derivados mitocondriais são aproximadamente ovais e têm diâmetro um pouco menor do que o diâmetro do axonema. Ainda nessa região, os corpos acessórios, situados na lateral e entre o axonema e os derivados mitocondriais, circunda mais da metade do axonema e tem projeções que conectam os derivados e o núcleo (Fig. 5E). Então, os derivados mitocondriais, agora com diâmetro por volta de três vezes aquele do axonema, e tornam-se alongados, justapostos e situado entre o núcleo axonema (Fig. 5F). Em alguma região flagelar, os derivados mitocondriais tornam-se subtriangulares e curvados, abraçando completamente o núcleo que é o componente mais delgado do (Fig. 5G). Na porção final do flagelo (Fig. 3E), o núcleo é o primeiro a terminar (Fig. 5H) e, finalmente, o axonema com seus microtúbulos totalmente desorganizados (Fig. 5I).

4. Discussão

A anatomia dos testículos de *Stenotarsus* sp. difere de algumas espécies já examinadas em outras famílias de Coccinelloidea, e.g., *Cryptolaemus montrouzieri* (ver Kaufmann, 1996), *Colleomegila maculata* (Nere, com. pes.), *Eriopis connexa* (Bolivar-Silva, 2020), *Epilachna clandestina* (Dias, com. pes.) e *Ep. vigintioctomaculata*, *Ep. pustulosa* e *Ep. sparsa* (ver Ehara, 1952), onde os folículos testiculares – circulares ou levemente alongados – se encontram em uma região anterior do ducto deferente. Também difere do padrão observado em uma espécie de *Bystus* (Anamorhidae), cujos testículos são esféricos e unifoliculares (obs. pes.). Para fins de comparação, não existem trabalhos, até o momento, que incluam dados sobre aparelho reprodutor completo – ou, ao menos, sobre testículos – em Endomychidae.

Tomaszewska (2000a, 2005) conduziu grandes estudos incluindo caracteres morfológicos da terminália abdominal em machos e fêmeas; apesar da importância desses trabalhos, as descrições para alguns táxons mencionam apenas um “ducto ejaculatório com glândula acessória”, sem maiores detalhes (ver Tomaszewska, 2000a). Contudo, as evidências histológicas aqui obtidas sobre essa estrutura indicam que a porção dilatada do ducto ejaculatório, circundada por uma camada muscular muito espessa, é uma modificação que atua como uma bomba ejaculatória, e não há qualquer tipo celular com característica secretora

que poderia caracterizá-la como uma glândula. Uma estrutura anatomicamente diferente, também com características de bomba ejaculatória, ocorre em *Bystus* sp. (Anamorphidae) (obs. pes.). A bomba ejaculatória constitui uma especialização do ducto ejaculatório para transferência do ejaculado ou parte dele (Snodgrass, 1935; Evans, 1961; Jaloszynski e Ruta, 2021), e é reconhecível por um alargamento no lúmen do ducto ejaculatório e algum grau de esclerotização para fixação do músculo compressor (Jaloszynski e Ruta, 2021).

A bomba ejaculatória tem reconhecido potencial filogenético, por exemplo em Diptera, Mecoptera, Siphonaptera, Strepsiptera (Hüenefeld e Beutel, 2005) e em diversas famílias de Coleoptera (Evans, 1961; Lawrence, 1994; Wanat, 2001; Hüenefeld e Beutel, 2005; Nasserzadeh et al., 2005; Navarrete-Heredia et al., 2005; Matsumura e Suzuki, 2008; Matsumura et al., 2019; Jaloszynski, 2020; Jaloszynski e Ruta, 2021), porém, ainda não havia sido descrita em Endomychidae. A robusta filogenia de Coleoptera publicada por Lawrence et al. (2011), com mais de 500 caracteres morfológicos, inclui uma extensa matriz de caracteres baseada em diversos trabalhos taxonômicos sobre diferentes famílias de besouros. Nota-se que Lawrence et al. (2011), baseando-se nas descrições de Tomaszewska (2000a), consideram a bomba ejaculatória um caráter “ausente” nos táxons amostrados por eles, incluindo *Bystus* sp. – à época descrito na subfamília Anamorphinae (Endomychidae), hoje incluído em Anamorphidae (sensu Robertson et al. (2015)). Possivelmente, a codificação “ausente” tenha ocorrido porque a estrutura foi descrita como “glândula”, e não como “bomba ejaculatória”, tal como mencionada aqui. O reconhecimento dessa estrutura como uma bomba ejaculatória fornece novos elementos a serem explorados em futuras análises filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos de Endomychidae e táxons relacionados, por exemplo, Anamorphidae.

Os espermatozoides de *Stenotarsus* sp., medindo cerca de 1230 µm, podem ser considerados gigantes (ver Pitnick et al., 2009). Dois estudos recentes amostraram 15 espécies de Coccinellidae, de quatro subfamílias, e todas exibiram tamanhos expressivamente menores dos espermatozoides (105–257 µm) (Dallai et al., 2018; Dias et al., 2020). Os espermatozoides do Endomychidae aqui estudado, exibiu características ultraestruturais muito semelhantes àquelas descritas para Coccinellidae (Wang, 1998; Dallai et al., 2017, 2018, 2019; Dias et al. 2020): um acrossomo com perforatório, seguido de um corpo basal, que dá origem a um axonema com 9+9+2 microtúbulos, dois derivados mitocondriais, dois corpos acessórios e um núcleo que corre paralelo aos componentes flagelares, oposto ao axonema, e com um material amorfo conectando todos os elementos da região núcleo-flagelo. No entanto, uma diferença notável refere-se aos derivados mitocondriais que, além de envolverem

completamente o núcleo por alguma extensão, têm o diâmetro de duas a três vezes maior que em Coccinellidae (Wang, 1998; Dallai et al., 2017, 2018, 2019; Dias et al. 2020) ou Anamorphidae (obs. pes.). As características mais marcantes dos espermatozoides de *Stenotarsus* sp. são o acrossomo seguido posteriormente pelo corpo basal e o núcleo junto aos componentes flagelares, como também observado em Coccinellidae e Anamorphidae – táxons estreitamente relacionados a Endomychidae (Robertson et al, 2015; McKenna et al, 2019). Tais características parecem preservadas em Coccinelloidea, pelo menos no clado que inclui essas três famílias (Endomychidae, Anamorphidae e Coccinellidae) e concordam com o monofiletismo da família, proposto nos estudos supracitados. Futuros estudos incluindo mais táxons de Endomychidae e de outras famílias de Coccinelloidea precisam ser realizados, a fim de contribuir com a resolução de problemas taxonômicos na superfamília. Por ora, as estruturas descritas no presente estudo jogam luz sobre o conhecimento morfológico em Endomychidae e abre o caminho para futuros trabalhos dessa natureza em Coccinelloidea.

Agradecimentos:

Este trabalho foi apoiado pelas agências brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (bolsa de pesquisa nº 306486 / 2019-9 (JLN)). Agradecemos à Dra. Wioletta Tomaszewska pela sua valiosa ajuda na identificação dos exemplares de Endomychidae e Anamorphidae. Ao Prof. Cristiano Lopes Andrade, Artur Orsetti, e Elisa von Groll pela ajuda nas coletas em campo. À Dra. Glenda Dias e ao MSc. Pedro Nere pela comunicação pessoal de seus estudos sobre Coccinellidae. O Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) e o Laboratório de Sistemática e Biologia de Coleoptera (LabCol) da Universidade Federal de Viçosa são reconhecidos pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas:

Arriaga-Varela, E., Zaragoza-Caballero, S., Tomaszewska, W., Navarrete-Heredia, J.L., 2013. Preliminary review of the genus *Stenotarsus* Perty (Coleoptera: Endomychidae) from

- México, Guatemala and Belize, with descriptions of twelve new species. *Zootaxa*, 3645, 001–079.
- Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., Vogler, A.P., 2014. Building the Coleoptera tree-of-life for >8000species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, 39, 97–110.
- Bolivar-Silva, D.A., 2020. *Biologia reprodutiva de joaninha (Coleoptera: Coccinellidae): Comportamento e morfologia do sistema reprodutor*. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 61.
- Bouchard, P., Grebennikov, V.V., Smith, A.B., Douglas, H., 2009. Biodiversity of Coleoptera. *Insect biodiversity: Science and society*, 265–301.
- Crowson, R.A., 1981. *The biology of Coleoptera*. New York (NY): Academic Press. 802p.
- Dallai, R., Mercati, D., Lino-Neto, J., Dias, G., Lupetti, P., 2017. Evidence of a procentriole during spermiogenesis in the coccinellid insect *Adalia decempunctata* (L): an ultrastructural study. *Arthropod Structure & Development*, 46, 815e823.
- 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., Lino-Neto, J., Dias, G., Folly, C., Lupetti, P., 2019. The peculiar structure of the flagellar axoneme in Coccinellidae (Insecta, Coleoptera). *Arthropod Structure & Development*, 49, 50–61.
- Dias, G., Lino-Neto, J., Dallai, R., Mercati, D., Lupetti, P., 2020. Sperm ultrastructure of three species of ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). *Arthropod Structure & Development*, 55, 100919.
- Ehara, S., 1952. Comparative Anatomy of the Genitalia and the Internal Reproductive Organs of Ladybeetles belonging to *Epilachna*: Systematic Studies of Coccinellidae, I. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University*, 11, 21–33.
- Evans, M.E.G., 1961. The muscular and reproductive systems of *Atomaria ruficornis* (Marsham) (Coleoptera, Cryptophagidae). *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 64, 297–399.
- Hünefeld, F., Beutel, R.G., 2005. The sperm pumps of Strepsiptera and Antliophora (Hexapoda). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43, 297–306.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., John, O.S., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M.S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough,

- T.G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A.P., 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, 318, 1913–1916.
- Jałoszynski, 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.
- Jałoszynski, P., Ruta, R., 2021. Discovery of a complex sclerotized sperm pump in Monotomidae (Coleoptera): Functional morphology and phylogenetic value. *Journal of Morphology*, 1–11
- Kaufmann, T., 1996. Dynamics of sperm transfer, mixing, and fertilization in *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) in Kenya. *Annals of the Entomological Society of America*, 89, 238–242.
- 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., Ślipiński, A., Seago, A.E., Thayer, M.K., Newton, A.F., Marvaldi, A.E., 2011. Phylogeny of the Coleoptera based on morphological characters of adults and larvae. *Annales Zoologici*, 61, 1–217.
- Matsumura, Y., Michels, J., Rajabi, H., Shimosawa, T., Gorb, S.N., 2019. Sperm transfer through hyper-elongated beetle penises – Morphology and theoretical approaches. *Scientific Reports*, 9.
- Matsumura, Y., Suzuki, K., 2008. Comparative morphology of internal reproductive systems in leaf beetles of the Donaciinae and Criocerinae (Coleoptera: Chrysomelidae) and its implication for the phylogeny. *Zootaxa*, 1845, 1–32.
- McKenna, D.D., Shin, S., Ahrens, D., Balke, M., Beza-Beza, C., Clarke, D.J., Donath, A., Escalona, H.E., Friedrich, F., Letsch, H., Liu, S., Maddison, D., Mayer, C., Misof, B., Murin, P.J., Niehuis, O., Peters, R.S., Podsiadlowski, L., Pohl, H., Scully, E.D., Yan, E.V., Zhou, X., Slipinski, A., Beutel, R.G., 2019. The evolution and genomic basis of beetle diversity. *P.N.A.S.*, 116, 24729e24737.
- Nasserzadeh, H., Hosseinie, S., Monsefi, K., 2005. Morphology of the reproductive systems of the Iranian species of *Hydrochara* Berthold (Coleoptera: Hydrophilidae). *Koleopterologische Rundschau*, 75, 227–245.
- Navarrete-Heredia, J.L., Cortés-Aguilar, J., Beutel, R.G., 2005. New findings on the enigmatic beetle family Lepiceridae (Coleoptera: Myxophaga). *Entomologische Abhandlungen*, 62, 193–201.

- Pitnick, S., Markow, T.A., Spicer, G.S., 1999. Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. *Evolution*, 53, 1804–1822.
- Robertson, J.A., Ślipiński, S.A., Moulton, M., Shockley, F.W., Giorgi, A., Lord, N.P., McKenna, D.D., Tomaszewska, W., Forrester, J., Miller, K.B., Whiting, M.F., McHugh, J.V., 2015. Phylogeny and classification of Cucujoidea and the recognition of a new superfamily Coccinelloidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Systematic Entomology*, 40, 745–778.
- Shockley, F.W., Tomaszewska, W., McHugh, J.V., 2000a. An annotated checklist of the handsome fungus beetles of the world (Coleoptera: Cucujoidea: Endomychidae). *Zootaxa*, 1999, 1–113.
- Shockley, F.W., Tomaszewska, W., McHugh, J.V., 2009a. An annotated checklist of the handsome fungus beetles of the world (Coleoptera: Cucujoidea: Endomychidae). *Zootaxa*, 1999, 1–113.
- Snodgrass, R.E., 1935. *Principles of Insect Morphology*, 1st edition. McGraw-Hill Book Company, New York, p. 667.
- Tomaszewska, W., 2000a. Morphology, phylogeny and classification of adult Endomychidae (Coleoptera: Cucujoidea). *Annales Zoologici*, 50, 449–558.
- Tomaszewska, W., 2005. Phylogeny and generic classification of the subfamily Lycoperdininae with re-analysis of the family Endomychidae (Coleoptera: Cucujoidea). *Annales Zoologici*, 55, 1–172.
- Tomaszewska, W., 2010. Endomychidae Leach, 1815. In: Leschen, R.A.B., Beutel, R.G., Lawrence, J.F. (Eds) *Handbook of Zoology*, vol. 2, Coleoptera. Walter de Gruyter GmbH and Co. KG, Germany/USA, pp. 442–454.
- Tomaszewska, W., Ślipiński, A., Bai, M., Zhang, W., Ren, D., 2018b. The oldest representatives of Endomychidae (Coleoptera: Coccinelloidea) from the Upper Cretaceous Burmese amber. *Cretaceous Research*, 91, 287–298.
- Wanat, M., 2001. Genera of Australo-Pacific Rhadinocybinae and Myrmacielinae, with biogeography of the Apionidae (Coleoptera: Curculionoidea) and phylogeny of the Brentidae (s. lato) (p. 432). *Mantis*.
- Wang, Z., 1998. Ultrastructure of the flagellum in sperm of *Coccinella septempunctata*. *Acta Entomologica Sinica*, 5, 83e88.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados desta tese sobre a morfologia do sistema reprodutor e ultraestrutura dos espermatozoides de besouros Cucujiformia das famílias Ciidae (Tenebrionoidea), Erotylidae (Cucujoidea) e Endomychidae (Coccinelloidea) evidenciaram tanto características que se distribuem dentro de cada superfamília, quanto características particulares, capazes de distinguir táxons menores – ao nível de família e tribo (no caso de Erotylidae). Deste modo, ressaltamos o potencial do estudo espermatozoides na sistemática dessas famílias de besouros, bem como da sua biologia reprodutiva.

APÊNDICE

Material suplementar referente ao Capítulo I

Table S1 – Additional information on the collects and the total number of *Ceracis cornifer* individuals examined. Some samples here included were not mentioned in the main text, however they were relevant to our conclusions. MRS = male reproductive system; FRS = female reproductive system.

Collection	Localities	Total of examined males (N = 78)			Total of examined females (N = 48)			
		Sperm slides	MRS	Sperm structure	Sperm slides	FRS	Experiment	Laid eggs
04.xi.2016	Serra do Cipó (MG)	5	2	0	0	0	0	0
29.vii.2017	Tombos (MG)	5	2	5	1	2	0	0
05.x.2017	Porciúncula (RJ)	7	8	3	3	6	0	6
13.vi.2019	Porciúncula (RJ)	5	3	4	4	4	20	0
03.xii.2019	Viçosa (MG)	5	4	2	1	4	0	0
01.iii.2021	Laranjal (MG)	6	10	2	1	2	0	5

Table S2 – Personal observations and published dataset on testicular follicles and sperm in tenebrionoid beetles with their respective references, as follows: (1) Baccetti et al., 1973; (2) Klopfenstein and Graves, 1992; (3) Chapman, 1998; (4) Almeida and Cruz-Landin, 2000; (5) Lopes-Andrade, 2008; (6) Dias et al., 2010; (7) Dias et al., 2013a; (8) Dias et al., 2013a; (9) Dias et al., 2013b; (10) Nardi et al., 2013; (11) Dias et al., 2015; (12) Personal observation.

Species	Follicles per testis	Sperm per cyst	Sperm length	MD symmetry	References
Ciidae:					
<i>Ceracis cornifer</i>	1	256	355 µm	Asymmetrical	12
<i>Ceracis furcifer</i>	1	–	490 µm	Asymmetrical	12
<i>Hadraula blaisdelli</i>	3	–	–	–	2
<i>Cis chinensis</i>	2	–	–	–	5
other <i>Cis</i> spp.	3	–	–	–	5
Meloidae:					
<i>Hycleus scutellatus</i>	≥ 20	–	362 µm	Symmetrical	10
<i>Mylabris variabilis</i>	≥ 20	–	603 µm	Symmetrical	10
<i>Zonitidis flava</i>	≥ 20	–	365 µm	Symmetrical	10
Rhipiphoridae:					
<i>Macrostigona tricuspidata</i>	12	256	1.236 µm	Symmetrical	10
Tenebrionidae:					
<i>Lagria villosa</i>	60	2.048	78 µm	Symmetrical	8 and 9
<i>Tenebrio molitor</i>	6	512	310 µm	Asymmetrical	1, 3, 7 and 8
<i>Tribolium castaneum</i>	6	512	90 µm	Asymmetrical	6–9 and 11
<i>Ulomoides dermestoides</i>	6	512	100 µm	–	4, 7 and 9
<i>Zoophobas confusa</i>	6	512	107 µm	Asymmetrical	7–9 and 11