

**CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS NA SUBFAMÍLIA
CICHLINAE (PERCIFORMES: CICHLIDAE) E SUAS
IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS.**

RINALDO JOSÉ ORTIZ

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. IRANI QUAGIO-GRASSIOTTO*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para a
obtenção do título de Doutor em Biologia
Geral e Aplicada, Área de Concentração:
Biologia Celular Estrutural e Funcional

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS NA SUBFAMÍLIA
CICHLINAE (PERCIFORMES: CICHLIDAE) E SUAS
IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS.

RINALDO JOSÉ ORTIZ

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. IRANI QUAGIO-GRASSIOTTO*

CO-ORIENTADOR: *PROF. DR. RICARDO CARDOSO BENINE*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ortiz, Rinaldo José.

Características espermáticas na subfamília Cichlinae (Perciformes: Cichlidae) e suas implicações filogenéticas / Rinaldo José Ortiz. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Irani Quagio-Grassiotto

Coorientador: Ricardo Cardoso Benine

Capes: 20100000

1. Células - Biologia. 2. Peixe – Reprodução. 3. Espermatozóides.

Palavras-chave: Cichlidae; Cichlinae; Espermogênese; Espermatozóide; Perciformes.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.
(Francisco Cândido Xavier)

Meus agradecimentos

- À Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto pela orientação, atenção, dedicação, amizade, apoio e por todos os ensinamentos;
- Ao Prof. Dr. Ricardo Cardoso Benine pela orientação, ajuda e amizade;
- Ao Prof. Dr. César Martins pela ajuda e pelos peixes;
- Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade e por terem aceitado fazer parte da banca;
- Ao Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu pela oportunidade de realização da pós-graduação;
- À secretária do Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, Luciana pela amizade e ajuda;
- Ao técnico do Laboratório de Rotina em Biologia Celular e de Reprodução de Peixes Neotropicais, Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, Antônio Vicente Salvador pela amizade, incentivo, ajuda e companheirismo;
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu e à sua supervisora Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, pela atenção e pela utilização das instalações;
- Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu, Claudete, Tiago e Ligia por toda ajuda prestada;
- Ao técnico da Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia, Medicina, UNESP, Botucatu, Carlos pela amizade e por toda ajuda prestada;
- Aos funcionários da seção de pós-graduação, Luciene, Herivaldo, Davi e Luciana, pela amizade, ajuda e por todos os serviços prestados;
- Aos meus pais, Rinaldo e Lazara e à minha irmã, Cibele, pelo apoio, amor, carinho, dedicação e incentivo;
- À minha esposa, Cleozita, pelo amor, carinho, dedicação, apoio, sempre ao meu lado me incentivando e por nossa filha Sabrina;
- As minhas avós Isolina e Emilia, pelo amor, carinho e pelos cuidados;
- Aos meus avôs José Carlos (em memória) e Roque (em memória) e a minha sogra Cleunice (em memória), pelo amor, carinho e pelos cuidados;
- À Clarianna e Renata, pela amizade, toda ajuda e companheirismo;
- Aos amigos do laboratório Daniel, Júlio e Talita, pelo companheirismo;
- A todos que contribuíram de alguma forma.

Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência.

(Francisco Cândido Xavier)

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract.....	02
Introdução	
A Família Cichlidae	03
A Subfamília Cichlinae.....	05
Os Caracteres Reprodutivos Masculinos	05
A Espermiogênese e a Ultraestrutura dos Espermatozóides.....	15
Objetivos.....	19
Materiais e Métodos	
Espécies Analisadas	19
Métodos.....	5
Análise Filogenética.....	5
Resultados	
Tribo Retroculini.....	5
Tribo Cichlini.....	5
Tribo Geophaginae.....	5
Tribo Astronotini	5
Tribo Cichlasomatini	5
Tribo Heroini	5
Subfamília Pseudocrenilabrinae.....	5
Matriz de Caracteres	5
Lista de Caracteres	5
Lista de Sinapomorfias	5
Documentação Fotográfica	5
Discussão	
Espermiogênese	5
Espermatozóide.....	5
Análise Filogenética.....	5
Conclusão	4

RESUMO

Cichlidae é a maior família de peixes não-Ostariophysi de água doce, e uma das maiores famílias de vertebrados. De ampla distribuição mundial, os gêneros neotropicais atualmente foram elevados a status de subfamília, Cichlinae. As hipóteses existentes para as relações de parentesco em Cichlinae, tendo por base características osteológicas e de partes moles e mais recentemente dados moleculares, não são congruentes entre si. Sabe-se que as características espermáticas contêm informações filogenéticas e podem ser úteis no estudo do relacionamento entre as espécies. Neste estudo, descreveu-se a espermiogênese e os caracteres ultraestruturais dos espermatozóides de membros da subfamília Cichlinae e da subfamília Pseudocrenilabrinae. Os dados resultantes foram utilizados numa análise filogenética, que comparada as proposta pré-existentes, recupera alguns dos grupos mais proximamente relacionados, caso dos gêneros *Retroculus* e *Cichla*. Estes gêneros são reconhecidos como basais dentro da subfamília. Outro grupo que se mantém, é o formado por *Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma portalegrense* e *Aequidens tetramerus*, membros da tribo Cichlasomatini. Além disso, a tribo Cichlasomatini ocupa posição derivada no cladograma, como em hipóteses anteriores.

ABSTRACT

ABSTRACT

Cichlidae is the largest family of non-Ostariophysi freshwater fish and one of the largest family of vertebrates. With a worldwide distribution, the Neotropical genera have been now elevated to a subfamily status, Cichlinae. The existing hypotheses for the phylogenetic relationships in Cichlinae, based on osteological features and soft tissue and more recently on molecular data, are not congruent. It is known that the spermiogenesis characteristics contains phylogenetic information and can be useful in the studies of the relationship between species. Then, this study described the spermiogenesis and sperm ultrastructural characteristics from some members of the Neotropical subfamily Cichlinae and from the African, Pseudocrenilabrinae. The data was used in a phylogenetic analysis, that when compared to pre-existing proposals, recovers some of the most closely related genera, for example, *Cichla* and *Retroculus*. These genera are recognized as basal within the subfamily Cichlinae. Another group that remains, it is that formed by *Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma portalegreense* and *Aequidens tetramerus*, members of the tribe Cichlasomatini. The tribe Cichlasomatini occupies a derivative position in the cladograma.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A Família Cichlidae

A família Cichlidae constitui o maior grupo de peixes euteleosteos de água doce (Nelson, 2006) e apresenta distribuição Gondwana, com representantes distribuídos através da África, Américas do Sul e Central e uma espécie no Texas (*Herichthys*), Madagascar, Índia, Sri Lanka, Síria, Israel e Iran (Stiassny, 1991; Sparks & Smith, 2004). Juntas, as famílias Cichlidae, Embiotocidae, Labridae, Odacidae, Pomacentridae e Scaridae formam a subordem Labroidei, a qual tem seu monofiletismo reconhecido com base em caracteres da região faringeal, particularmente da mandíbula faringeal, que é especializada para o processamento de alimentos (Nelson, 2006). Para Galis e Metz (1998) a flexibilidade e a versatilidade do aparato mandibular faringeal dos ciclídeos promoveu a diversificação evolucionária por duas razões. Primeiro, causou uma plasticidade comportamental; segundo, forneceu condições à evolução. Embora, os ciclídeos atuem geralmente como especialistas, ocupando nichos alimentares particulares, eles podem variar sua alimentação quando necessário, com baixa especificidade (Galis & Metz, 1998). O reconhecimento da família Cichlidae pode ser feito, externamente, pela presença de apenas uma narina em cada lado da cabeça, linha lateral interrompida com geralmente 20-50 escamas, nadadeira dorsal geralmente com 7-25 espinhos e 5-30 raios moles, e nadadeira anal com 3-15 espinhos e 4-15 raios moles (Nelson, 2006). Outra característica da família é à saída do intestino pelo lado esquerdo do estômago, ao contrário dos grupos de peixes restantes (Zihler, 1982). A forma do corpo pode ser variada entre as espécies da família. O corpo pode ser em forma de disco com nadadeiras curtas como no gênero *Symphysodon*, ou alongado como no gênero *Crenicichla*, embora, a maioria dos ciclídeos tenha o corpo comprimido lateralmente (Nelson, 2006). Apesar da ampla tolerância comportamental de várias espécies de ciclídeos, eles mostram diversidade morfológica relativamente pequena, o que pode dificultar na identificação de espécies (Mcandrew & Majumdar, 1983) e a compreensão das suas relações de parentesco (Mcandrew & Majumdar, 1984). Kornfield e Parker (1997) consideram a rápida radiação evolutiva envolvendo um grande número de táxons um dos problemas mais difíceis na resolução das análises filogenéticas. A rápida evolução adaptativa e a explosiva taxa de especiação simpátrica fazem dos ciclídeos dos grandes lagos do leste africano foco de atenção de muitos pesquisadores (ver Kocher, 2004 para revisão). Ao longo dos anos, espécies de ciclídeos vêm sendo

descritas e atribuídas a um ou a outro gênero, entretanto as posições e o relacionamento entre eles não são estáveis (ver Kullander, 1998 para revisão).

A situação para a sistemática da família teve avanço significativo com a apresentação de dois estudos nas décadas de 70 e 80 (teses de doutorado não publicadas). O primeiro deles, em 1976, de Frederick Cichocki teve por foco os ciclídeos Sul Americanos, ao lado de alguns representantes Africanos e Asiáticos. Na sua análise o autor utiliza a compatibilidade de caráter segundo Estabrook (1976) (Figura 01).

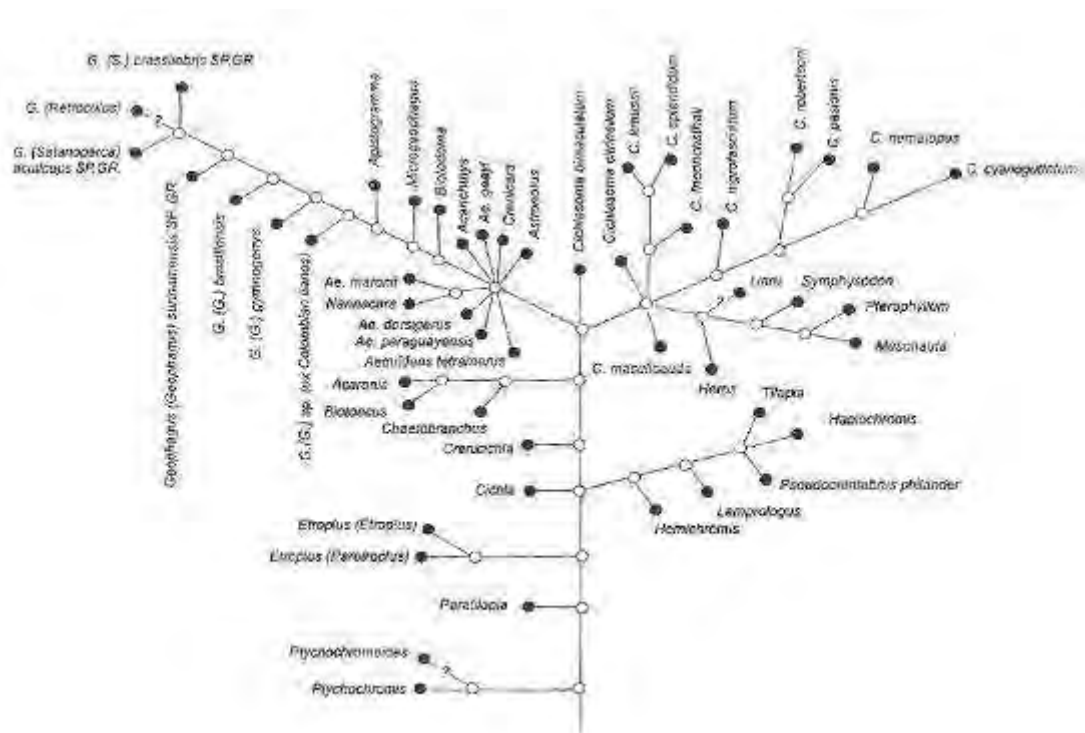


Figura 01: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Cichocki, 1976).

Seu resultado levou a uma hipótese testável do interrelacionamento de ciclídeos, assim como uma classificação que reconhece quatro subfamílias (Etroplinae, Haplochrominae, Cichlinae e Geophaginae) e um conjunto de tribos. A Subfamília Etroplinae constituída por gêneros da Índia e Madagascar, a subfamília Haplochrominae Hoedeman (1947) constituída por todos os ciclídeos africanos, a subfamília Cichlinae Bonaparte (1840) formada pelo gênero sul americano *Cichla* e a subfamília Geophaginae Haseman (1911) constituída por outros gêneros sul americanos. Este estudo foi retomado, em 1984, por Michael Oliver agora com foco nos ciclídeos africanos. A filogenia de Oliver (1984) utiliza a mesma base de caracteres que Cichocki (1976), e inclui o gênero *Heterochromis* entre as espécies analisadas (Figura 02).

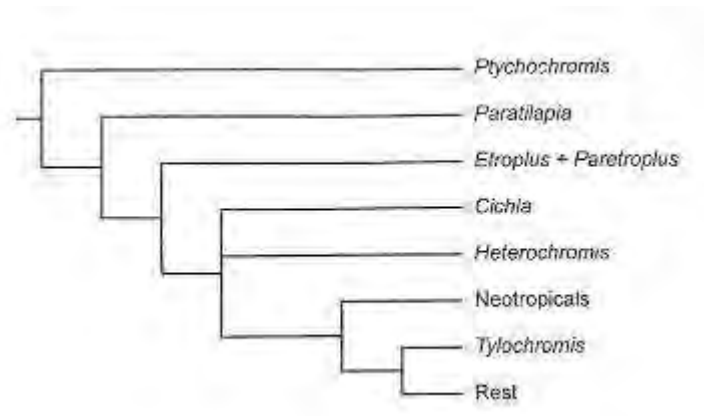


Figura 02: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Oliver, 1984).

Nessa filogenia *Heterochromis* ocupa posição entre o gênero *Cichla* e os neotropicais, o que altera apenas ligeiramente a proposta de Cichocki (1976) a qual teve como principal achado o reconhecimento dos ciclídeos de Madagascar e Índia como formas mais plesiomórficas na família, resultado corroborado por Stiassny (1991).

A Subfamília Cichlinae

Sparks (2004) reúne em Cichlinae, duas subfamílias anteriormente reconhecidas por Cichocki (1976), a subfamília Cichlinae Bonaparte (1840) mais a subfamília Geophaginae Haseman (1911). Cichlinae conforme Sparks (2004) é formada por todos os gêneros de ciclídeos distribuídos através das Américas do Sul e Central e também da região sul da América do Norte.

Os ciclídeos neotropicais formam um clado monofilético grupo-irmão do clado, também monofilético, dos ciclídeos africanos (Stiassny, 1991; Farias *et al.*, 1999; Sparks & Smith, 2004) e podem ser encontrados em quase todos os rios das Américas do Sul e Central, com espécies distribuídas desde a Patagônia até o Texas (López-Fernández *et al.*, 2010).

O clado neotropical inclui aproximadamente 60 gêneros com muitas espécies ainda não descritas (Reis *et al.*, 2003; López-Fernández *et al.*, 2010). A maioria dos ciclídeos neotropicais está classificada dentro das três maiores tribos, Geophagini, Cichlasomatini e Heroïni, com as demais espécies distribuídas nas tribos Cichlini, Retroculini, Chaetobranchini e Astronotini (Kullander, 1998; Smith *et al.*, 2008; López-Fernández *et al.*, 2010). Geophagini é restrito da América do Sul e sul do Panamá com aproximadamente 18 gêneros e cerca de

250 espécies (López-Fernández *et al.*, 2005 a, b). Cichlasomatini inclui 11 gêneros descritos e mais de 70 espécies distribuídas pela América do Sul e Panamá (López-Fernández *et al.*, 2010). Heroini inclui aproximadamente 30 gêneros e cerca de 150 espécies distribuídas pela América do Sul e América Central, com 1 gênero em Cuba e Hispaniola (López-Fernández *et al.*, 2010).

Entre os ciclídeos neotropicais, o tamanho pode variar de 2,5 a 3,0 cm em adultos dos gêneros *Apistogramma* e *Taeniacara*, para cerca de 1 metro em *Cichla temensis*. Entretanto, a maioria das espécies está entre 10 a 20 cm (Reis *et al.*, 2003). A maior parte das espécies da subfamília Cichlinae ocupa habitat lânticos de rios e riachos, mas há também espécies reofílicas moderada a fortemente adaptadas. São descritas como reofílicas muitas espécies de *Crenicichla* e os gêneros *Teleocichla* e *Retroculus*, distribuídos principalmente no Brasil e Guiana (Reis *et al.*, 2003). A maioria dos ciclídeos neotropicais alimenta-se de uma variedade de invertebrados e alguns de matéria vegetal. *Cichla*, espécies grandes de *Crenicichla*, *Petenia*, *Parachromis*, *Caquetaia*, *Astronotus* e *Acaronia* se alimentam de peixes e grandes invertebrados. *Chaetobranchopsis*, *Chaetobranchus* e *Satanoperca acuticeps* se alimentam de plânctons (Reis *et al.*, 2003).

O dimorfismo sexual pode variar de moderado a forte entre a maioria dos ciclídeos neotropicais (Reis *et al.*, 2003). Não apenas a subfamília Cichlinae, mas toda a família Cichlidae é bastante estudada com relação ao seu avançado cuidado parental. Fishelson (2003) divide o comportamento reprodutivo em dois tipos, os incubadores de substrato e os incubadores bucais. Nas espécies incubadoras de substrato a fêmea deposita seus ovos adesivos em ninhos no substrato. O macho libera seus espermatozóides sobre os ovos, os fecundando. Então, ambos os pais cuidam de sua prole até que os jovens possam nadar livremente (Fishelson, 2003). Nas espécies incubadoras bucais a fêmea, o macho ou ambos os pais coletam os ovos e o esperma para dentro da boca, durante ou após a desova. Na maioria destas espécies, no entanto, a fecundação ocorre antes que os ovos sejam recolhidos, quando o macho libera seu esperma sobre os ovos em um local de desova (Fishelson, 1983). No entanto, em algumas espécies como *Oreochromis aureus* e *O. hornorum* (Grier & Fishelson, 1995), e possivelmente outros, a fecundação ocorre dentro da cavidade bucal. Este tipo de incubação bucal também pode ser observado em *Astatotilapia flavijosefii* e em outro Haplochromineos de incubação bucal estudados, em que a fêmea encosta o focinho na papila genital do macho durante a desova, a fim de coletar o esperma (Fishelson, 2003).

Na subfamília Cichlinae as espécies podem ser incubadoras de substrato ou incubadoras bucais. Nas espécies incubadoras de substrato, como em espécies dos gêneros *Rocio* e *Amatitlania*, os ovos são tipicamente depositados em ninhos no substrato e ambos os pais cuidam da prole por várias semanas, ainda por algum tempo depois dos jovens nadarem livremente (Reis *et al.*, 2003). Incubação bucal pode ser observada em muitas espécies de *Geophagus*, *Gymnogeophagus* e *Satanoperca*, e também em uma espécie de *Aequidens* e em uma espécie de *Heros* (Reis *et al.*, 2003). O cuidado é biparental em espécies de incubação bucal, onde os ovos são guardados em ninhos no substrato até próximo a eclosão, quando se inicia a incubação bucal dos ovos e posteriormente das larvas. Poucas espécies neotropicais apresentam tipo de incubação bucal exclusivamente materno, em que a fêmea recolhe os ovos logo após a fecundação, *Gymnogeophagus balzanii* e algumas espécies colombianas de *Geophagus* (Reis *et al.*, 2003). Ciclídeos dos lagos Malawi e Victória apresentam cuidado parental exclusivamente do tipo incubação bucal materno (Eccles & Trewavas, 1989; Barlow, 1991; Keenleyside, 1991). Em contraste, os ciclídeos do lago Tanganyika apresentam uma grande variedade de cuidado parental, não apenas diferentes estilos de incubação bucal, mas também de desova em ninhos de diferentes substratos e proteção à sua prole (Kuwamura, 1986; Keenleyside, 1991).

Pouco se sabe sobre a origem da diversidade de ciclídeos neotropicais, com a maioria dos estudos focados na rápida radiação adaptativa dos ciclídeos na região dos três grandes lagos, Tanganyika, Malawi e Victória, do leste da África (Meyer, 1993; Kornfield & Smith, 2000; Streelman & Danley, 2003; Kocher, 2004; López-Fernández *et al.*, 2010).

Para Kullander (1998) o ponto chave para o entendimento da evolução dos ciclídeos está na ictiofauna riverina, que apresenta diversidade morfológica e ampla distribuição geográfica e é mais provável conservar padrões ancestrais da evolução de caracteres e distribuição geográfica.

A revisão por Stiassny (1991) dos trabalhos de Cichocki (1976), Oliver (1984), Kullander (1983, 1986, 1988, 1989) e outros de sua própria autoria (1982, 1987, 1990) contribuiu decisivamente para o entendimento da evolução dos ciclídeos. Além do reconhecimento como grupos irmão dos clados monofiléticos, Pseudocrenilabrinae (ciclídeos africanos) e Cichlinae (ciclídeos neotropicais). E, embora tenha excluído o gênero *Heterochromis* desse clado monofilético, o considerando como grupo irmão de Etroplines (subfamília Etroplinae, segundo Cichocki, 1976) a revisão de Stiassny (1991), também,

corroborar a proposta de Cichocki (1976) no reconhecimento dos ciclídeos de Índia-Madagascar como grupo irmão e formas mais plesiomórficas na família (Figura 03).

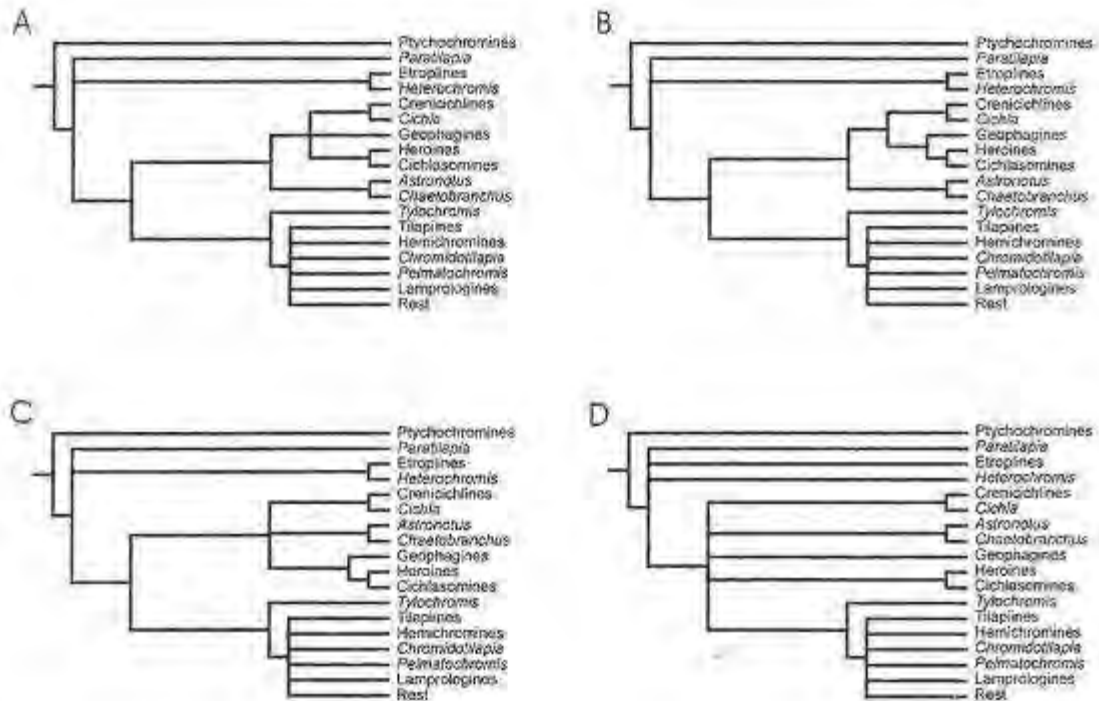


Figura 03: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Stiassny, 1991).

Em um estudo filogenético para a família, com foco nos ciclídeos neotropicais, Kullander (1998) analisou 91 caracteres morfológicos de ciclídeos neotropicais e dos inicialmente chamados de ciclídeos do Velho Mundo, grupo formado pelos ciclídeos africanos e os da Índia-Madagascar (Figura 04).

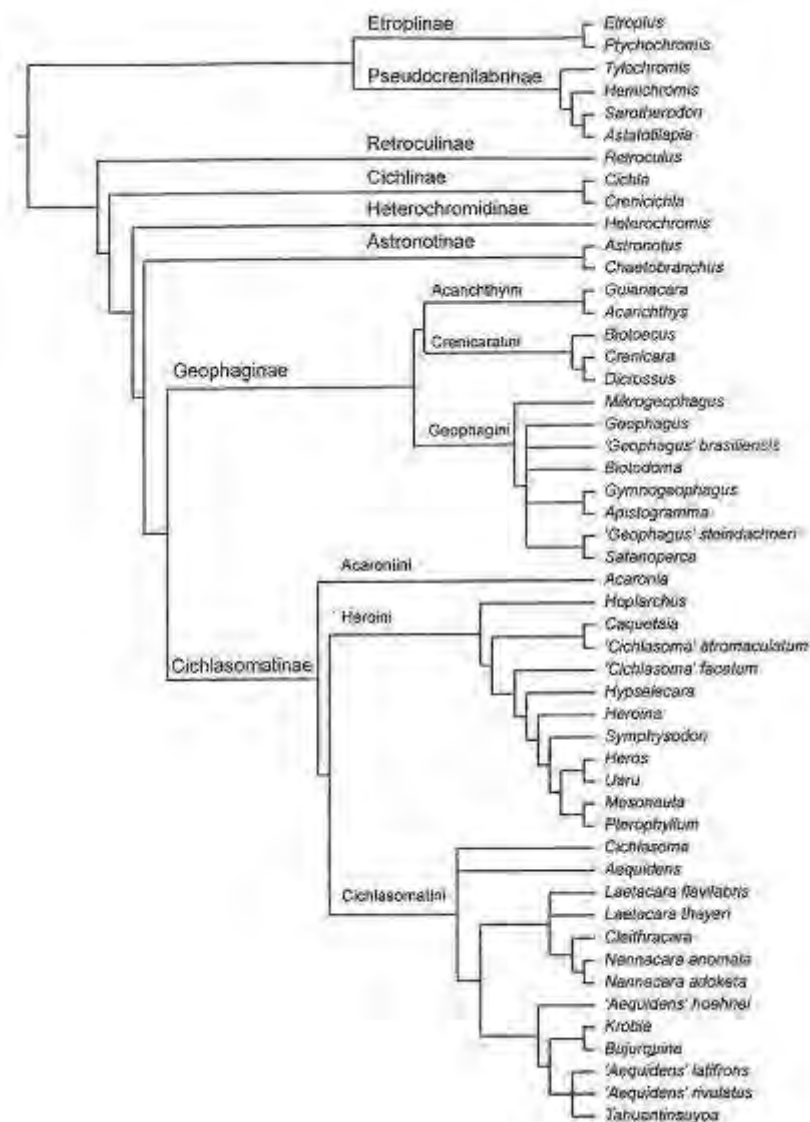


Figura 04: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Kullander, 1998).

Este trabalho resultou em uma nova classificação para os ciclídeos com as subfamílias Etroplinae (*Etroplus* e *Ptychochromis*), Pseudocrenilabrinae (todos ciclídeos africanos, exceto *Heterochromis* que foi considerado gênero monotípico da subfamília Heterochromidinae) mais cinco subfamílias neotropicais (Retroculinae, Cichlinae, Astronotinae, Geophaginae e Cichlasomatinae), tendo *Retroculus* como grupo irmão dos demais ciclídeos neotropicais. Além de Heterochromidinae alocada entre as subfamílias do clado neotropical.

Em uma filogenia com base em seqüências gênicas da subunidade 16S do rDNA mitocondrial, Farias e colaboradores (1999) no primeiro estudo com essa abordagem incluindo *Heterochromis*, tiveram como resultado uma politomia entre os Pseudocrenilabrinae. Com Pseudocrenilabrinae incluindo o controverso gênero riverino da

bacia do Congo *Heterochromis* (Figura 05), não mais o considerando dentro do clado neotropical conforme Kullander (1998).

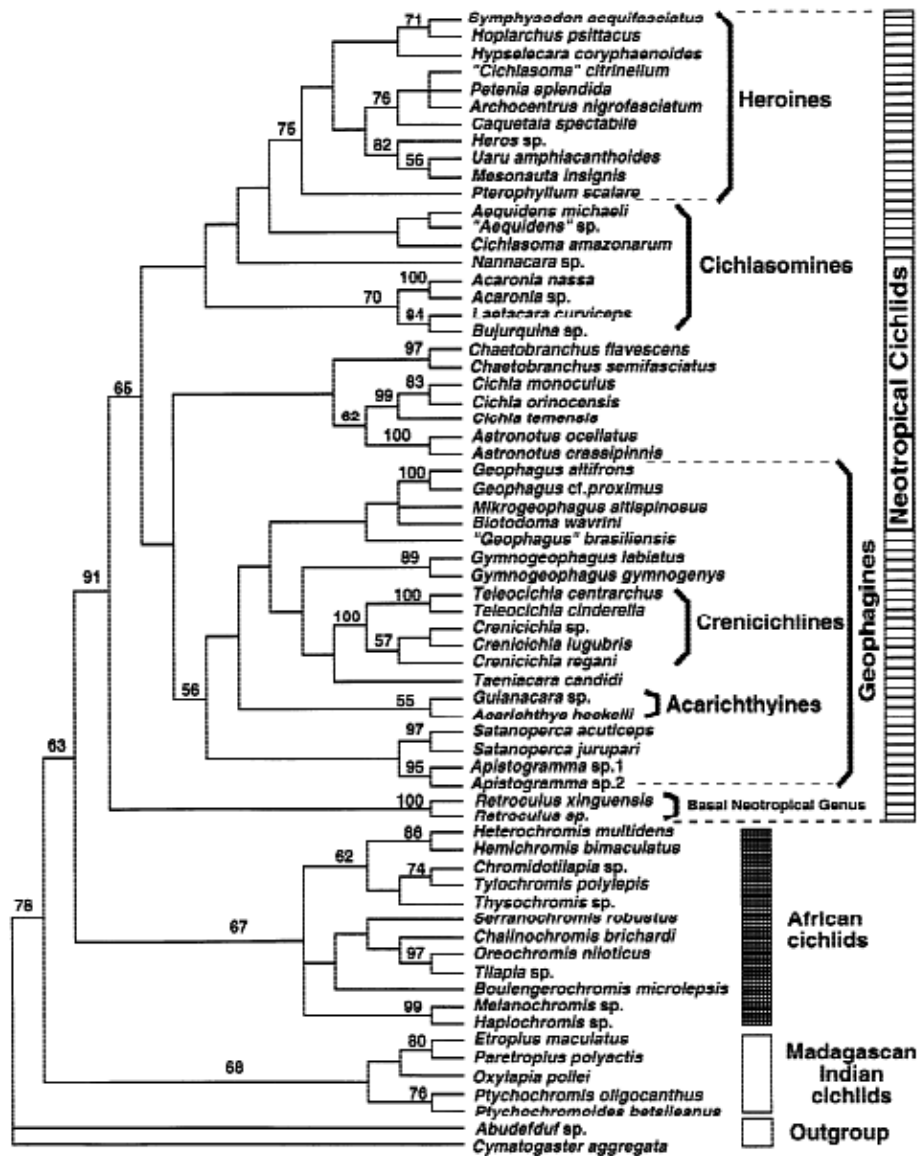


Figura 05: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Farias *et al.*, 1999).

Sparks (2004) num outro estudo molecular, agora usando dois genes mitocondriais, um da subunidade ribossomal 16S e outro da subunidade I do complexo citocromo *c* oxidase (COI), com ênfase e com amostragem de todos os gêneros dos ciclídeos Índia-Madagascar confirma o monofiletismo do clado (Figura 06). Entretanto o autor aponta para a necessidade de fragmentar a subfamília Etroplinae, proposta por Kullander (1998), mudando a sua composição e criando uma nova subfamília, Ptychochrominae. Ptychochrominae aqui formada pelos gêneros *Ptychochromis*, *Ptychochromoides*, e *Oxylapia*, alocando na

subfamília Etroplinae apenas os gêneros *Etroplus* e *Paretroplus*, com o gênero *Paratilapia*, também de Madagascar, sem posição definida. Nessa filogenia entre os gêneros da subfamília neotropical (Cichlinae) *Retroculus*, assim como estudo de Kullander (1998), é considerado grupo irmão dos demais ciclídeos neotropicais.

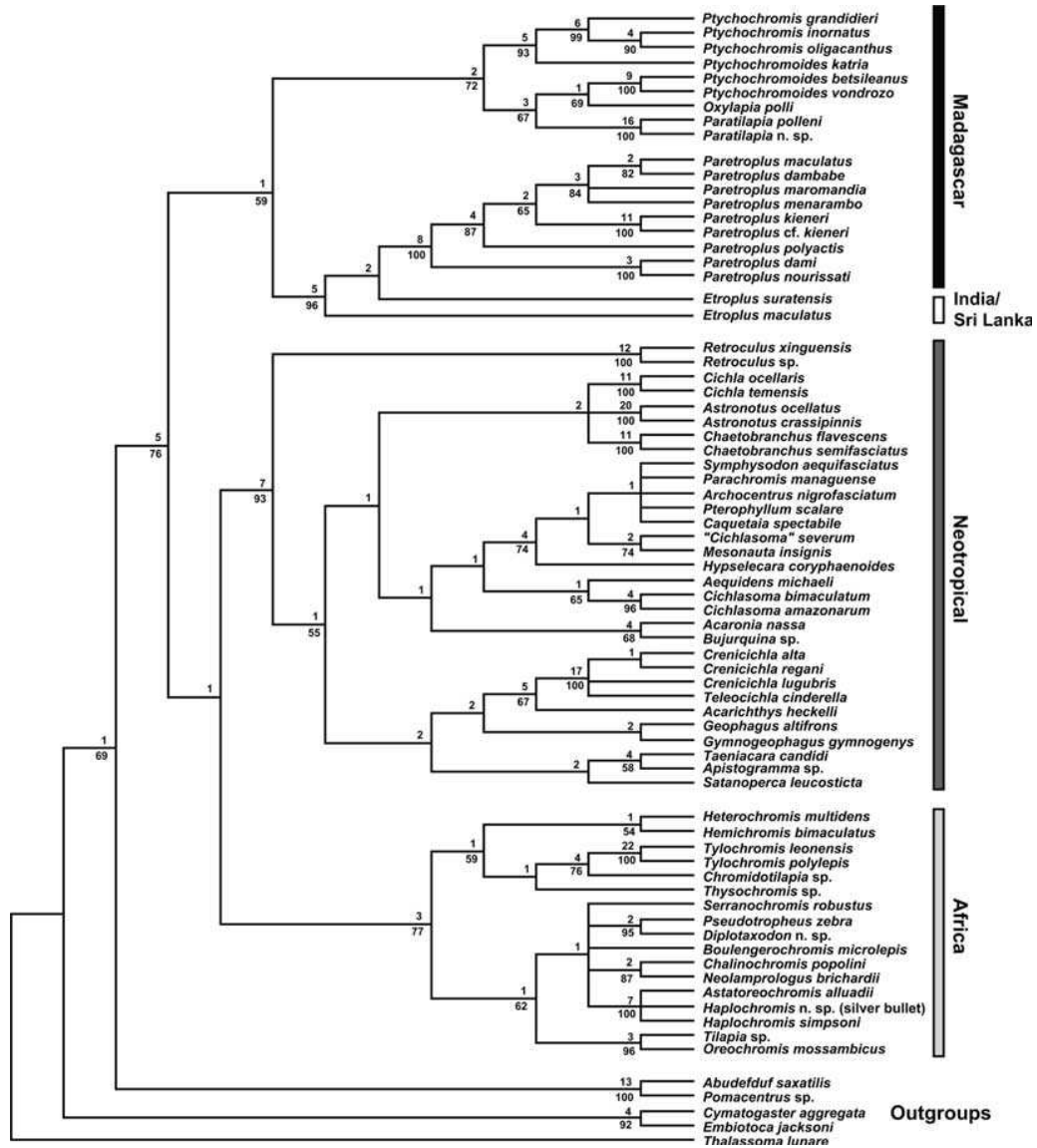


Figura 06: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Sparks, 2004).

Sparks e Smith (2004) com base no resultado da análise de dois genes nucleares e dois genes mitocondriais corroboram o monofilismo da subfamília Etroplinae, e a recuperam como grupo irmão dos demais ciclídeos. Ptychochrominae, também monofilética, é recuperada como grupo irmão do clado monofilético entre Cichlinae (neotropical) e

Pseudocrenilabrinae (africanos). Neste estudo, o gênero *Paratilapia* é inserido na subfamília Ptychochrominae (Figura 07).

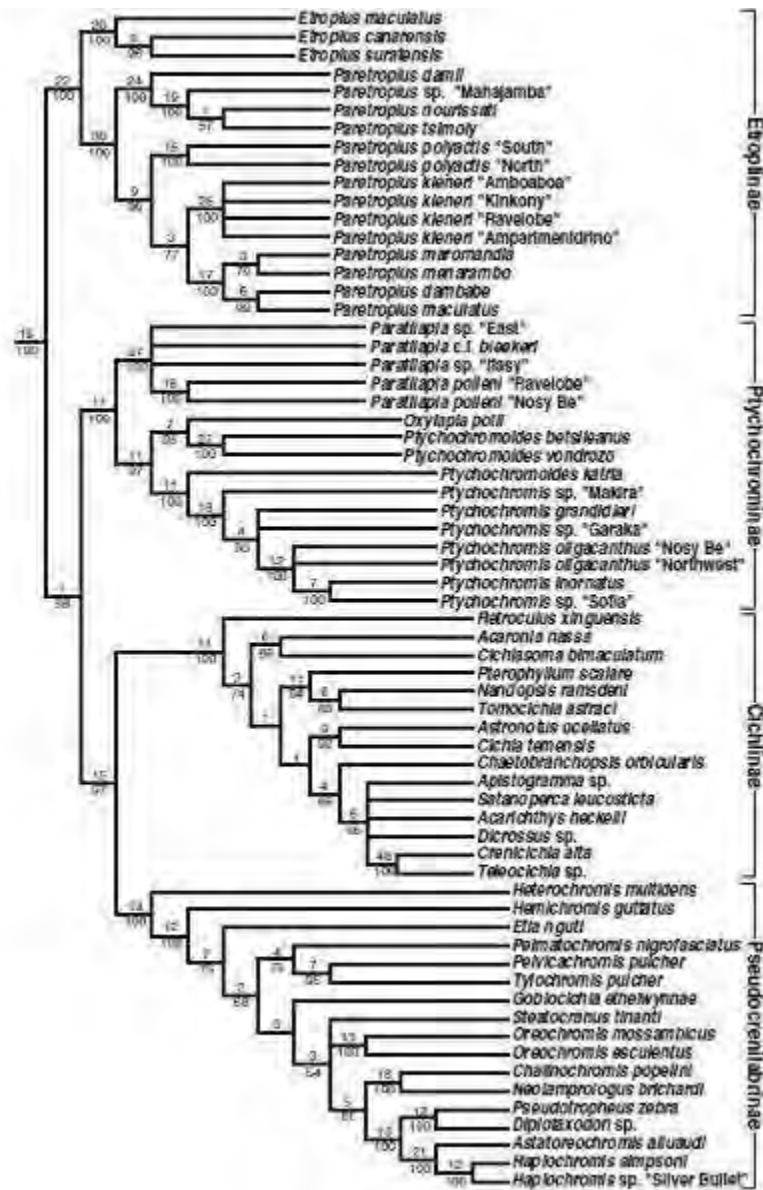


Figura 07: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Sparks & Smith, 2004).

Um outro estudo filogenético da família Cichlidae, também com foco em Cichlinae, foi levado a efeito por Smith e colaboradores (2008). Esse estudo teve por base os 91 caracteres morfológicos de Kullander (1998) somados a caracteres moleculares mitocondriais e nucleares. Nele os autores corroboram a proposta de Sparks (2004) para as subfamílias Etroplinae, Ptychochrominae e Pseudocrenilabrinae incluindo o gênero *Heterochromis* que também é recuperado como basal e grupo irmão dos demais pseudocrenilabríneos. Além, disso a subfamília Cichlinae é recuperada como grupo irmão dos Pseudocrenilabríneos.

Cichlinae agora dividida em sete tribos (Cichlini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchini, Geophagini, Cichlasomatini e Heroini) e tem o gênero *Cichla* (Cichlini) como grupo irmão de *Retroculus* (Retroculini). O clado formado por *Cichla* mais *Retroculus* como grupo irmão das demais tribos e *Astronotus* (Astronotini) como grupo irmão dos clados formados por Chaetobranchini + Geophagini e por Cichlasomatini + Heroini (Figura: 08).

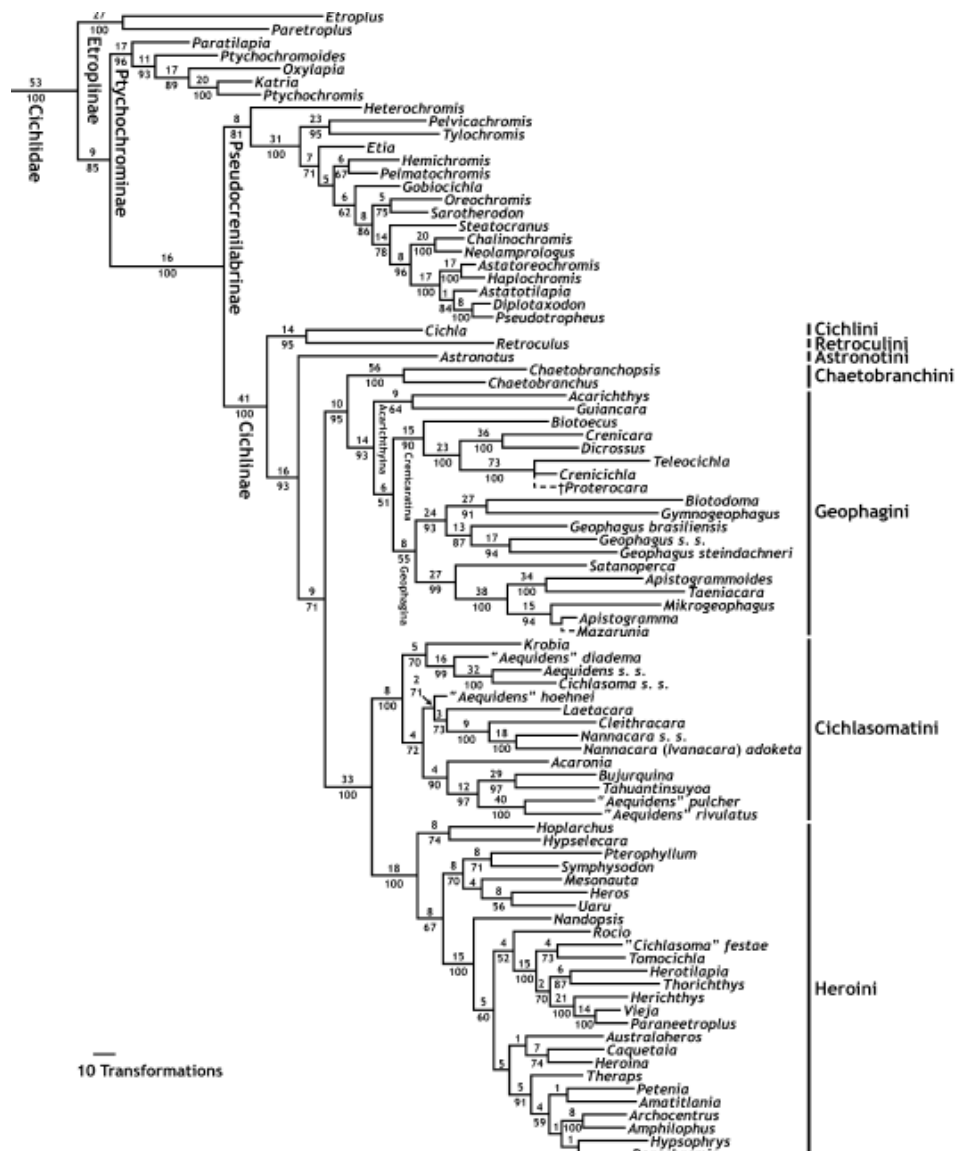
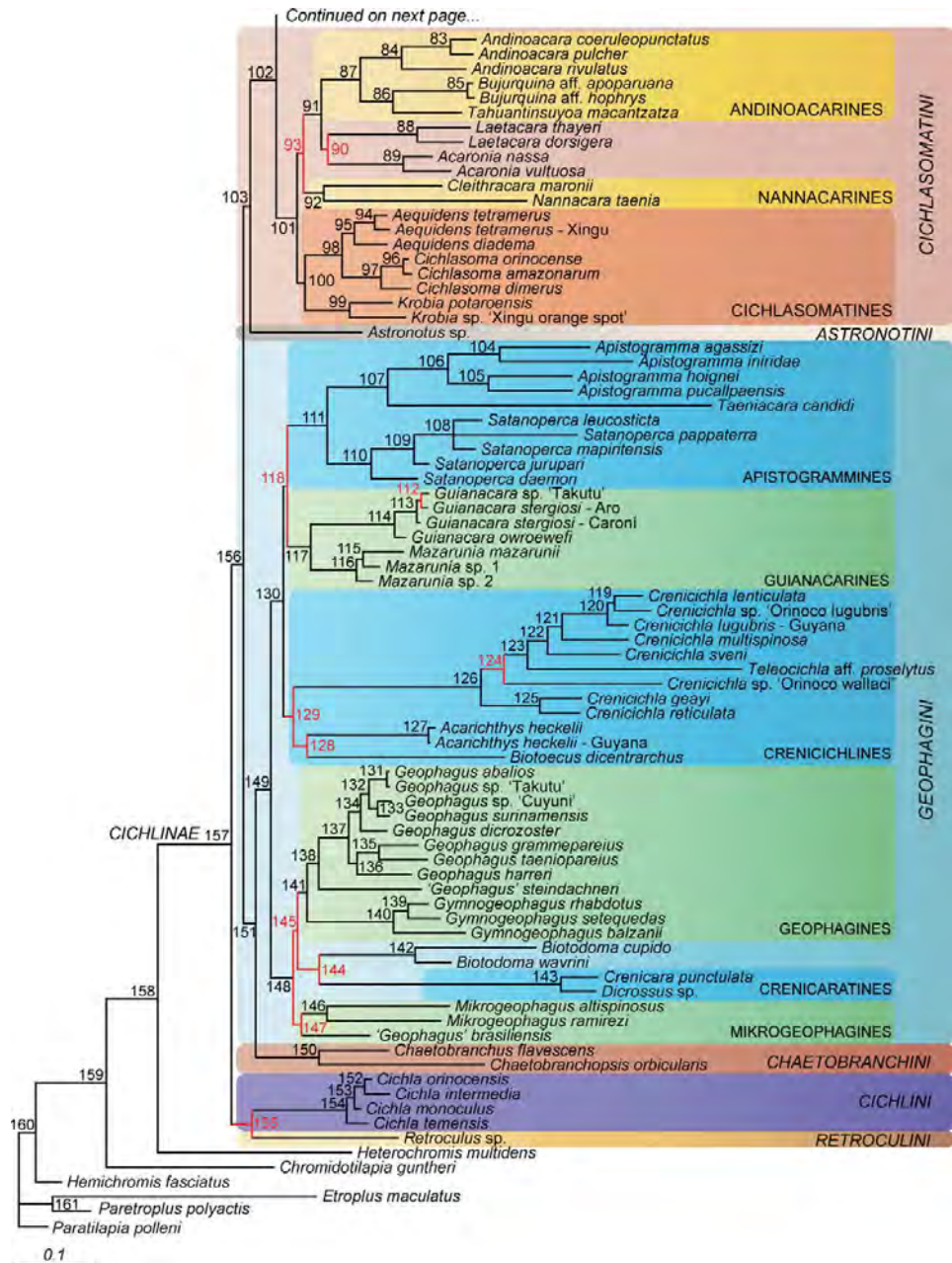


Figura 08: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de Smith *et al.*, 2008).

López-Fernández e colaboradores (2010) em sua recente proposta de relacionamento para a família, também usando dados moleculares mitocondriais e nucleares, e com ênfase nos Cichlinae, recuperam o clado formado por Retroculini + Cichlini como grupo irmão dos demais Cichlinae. Porém, *Astronotus* é considerado grupo irmão apenas do clado formado por

Cichlasomatini + Heroini. O clado formado por Chaetobranchini + Geophagini é, então, considerado grupo irmão de Astronotini e Cichlasomatini + Heroini (Figura 09).



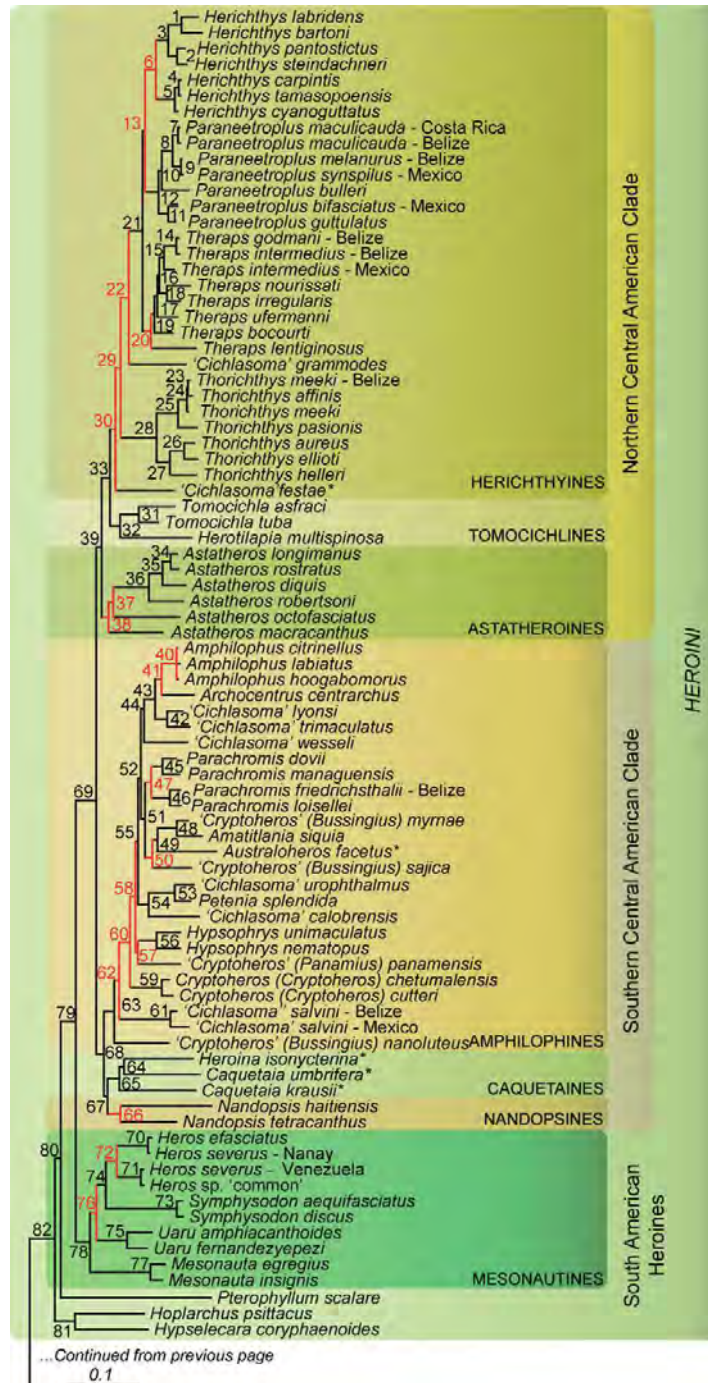


Figura 09: Cladograma expressando as relações de Cichlidae (adaptado de López-Fernández *et al.*, 2010).

Os Caracteres Reprodutivos Masculinos

Embora o conhecimento atual sobre o padrão de relacionamento entre os Cichlidae tenha sido inferido com base em caracteres morfológicos tradicionais, e mais recentemente utilizando sequências gênicas, outras características parecem ser potencialmente úteis no

estudo desta ordem. Várias das características reprodutivas das espécies podem conter sinais filogenéticos, como as características espermáticas.

A Espermio gênese e a Ultraestrutura dos Espermatozóides

Tendo por base a estrutura, organização celular e o tipo de fertilização, os gametas masculinos dos animais em geral são classificados em basal ou derivados. Entende-se por basal os espermatozóides dos animais com fertilização externa, liberados no meio aquático. Estes apresentam, numa seqüência antero-posterior: acrossoma; núcleo esférico; dois centríolos, sendo que o distal se diferencia em corpúsculo basal e dá origem ao axonema do flagelo; mitocôndrias arredondadas e pouco numerosas e flagelo contendo apenas o axonema básico do tipo 9 + 2 (Franzén, 1970). Os espermatozóides dos peixes têm sido considerados como do tipo basal. No entanto, os estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1991) mostram que a diversidade de formas apresentadas por estes espermatozóides é imensa. Além disso, os espermatozóides tidos como basais estão presentes em grupos de peixes mais derivados, enquanto grupos mais basais apresentam espermatozóides estruturalmente considerados derivados. Ambos os autores mostram também que entre os peixes, os espermatozóides do tipo basal são encontrados apenas entre os Neopterygii onde constituem forma dominante.

Segundo Jamieson (1991), os espermatozóides dos Neopterygii podem ter se desenvolvido secundariamente a partir de formas mais complexas. Além disso, neste grupo de peixes os espermatozóides não possuem acrossoma. Esta ausência vem acompanhada da presença da micrópila nos óvulos destes animais (Jamieson, 1991). A micrópila é uma abertura no envoltório do óvulo que permite a passagem do espermatozóide no momento da fertilização (Amanze & Yvengar, 1990).

Conforme Mattei (1970), nos espermatozóides dos peixes, o eixo flagelar pode posicionar-se paralela ou perpendicularmente ao núcleo. Estas posições resultam da ocorrência ou não da rotação e caracteriza dois tipos de espermio gênese tipo I e II, respectivamente. Na espermio gênese do Tipo I, a espermátide jovem apresenta núcleo central, mitocôndrias esparsas pelo citoplasma, e diplossoma próximo à membrana plasmática. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, trazendo a membrana e o segmento inicial do flagelo que se invaginam. Forma-se assim um canal entre a membrana flagelar e a espermática, o canal citoplasmático. O flagelo dispõe-se tangencialmente ao núcleo e nesta face do contorno nuclear forma-se uma depressão ou fossa. O núcleo sofre uma rotação de

90° em relação ao eixo flagelar e o diplossoma se insere na fossa nuclear. A depressão determina a base do núcleo, região para a qual migram as mitocôndrias. Variações neste tipo de espermiogênese resultam em um canal citoplasmático pequeno ou inexistente, o mesmo ocorrendo com a fosseta ou fossa nuclear. Na espermiogênese do tipo III (Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008), o desenvolvimento do flagelo é medial, o núcleo não sofre rotação e a fossa nuclear e o canal citoplasmático não se formam.

As espermiogêneses do tipo I e do tipo III resultam na formação de espermatozóides aquáticos do tipo I (Jamieson, 1991, Mattei, 1991, Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008). Em geral estes gametas possuem núcleo pequeno, de forma ovóide ou arredondada. Os centríolos, em ângulos variados, situam-se total ou parcialmente na fossa nuclear, quando esta está presente. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias, pequenas e pouco numerosas, situam-se no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo por um espaço existente entre as membranas plasmáticas e flagelar, o canal citoplasmático. O flagelo apresenta o axonema clássico formado por nove duplas periféricas de microtúbulos e um par central. A membrana flagelar pode ou não apresentar projeções laterais ou “fins”. Variações neste tipo de espermatozóides são observadas principalmente quanto à presença e dimensão da fossa nuclear, tamanho e quantidade de mitocôndrias e número de flagelos (Jamieson, 1991, Mattei, 1991, Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008).

Em espécies de uma mesma família, ou subfamília apesar da estrutura dos espermatozóides apresentar um padrão geral bastante conservado (Baccetti *et al.*, 1984, Jamieson, 1991, Mattei, 1991, Burns *et al.*, 1998, Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003a, Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008; Burns *et al.*, 2009), a forma, número e distribuição das organelas espermáticas, como por exemplo as mitocôndrias, podem variar tornando a sua caracterização bastante útil na identificação de padrões de relacionamento inter e/ou intrafamiliar.

Inicialmente, Jamieson (1991) resume o conhecimento a respeito da estrutura dos espermatozóides para os diversos grupos de peixes, assinalando as modificações estruturais que ocorreram em cada linhagem.

Na família Cichlidae as informações existentes sobre a ultraestrutura dos espermatozóides referem-se às espécies *Hemichromis fasciatus* e *Oreochromis niloticus* (Mattei, 1970), *Oreochromis niloticus* (Guha *et al.*, 1988; Lou & Takahashi, 1989; Silva & Godinho, 1991; Don & Avtalion, 1993; You & Lin, 1998) *Crenicichla saxatilis* (Matos *et al.*,

1995) *Crenicara punctulatum* (Matos *et al.*, 2002a), *Satanoperca jurupari* (Matos *et al.*, 2002b), *Cichla intermédia* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003b), *Oreochromis mossambicus* (Pieterse, 2006).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Dado a potencial aplicabilidade das informações sobre as características espermáticas para os estudos filogenéticos e, considerando-se os gêneros neotropicais em Cichlidae, atualmente alocados na subfamília Cichlinae, teve-se por objetivo:

(1) descrever a ultraestrutura dos espermatozoides de representantes de gêneros neotropicais de cada tribo, Cichlini, Retroculini, Astronotini, Geophagini, Cichlasomatini e Heroini.

(2) analisar comparativamente os dados obtidos a partir das características ultra-estruturais do núcleo, peça intermediária e flagelo dos espermatozoides com vistas à identificação de caracteres particulares e comuns a esses gêneros, com as demais subfamílias de Cichlidae.

(3) gerar uma matriz de caracteres a partir dos dados obtidos e daqueles disponíveis na literatura, analisá-los à luz da sistemática filogenética e propor uma hipótese de relacionamento dos gêneros em Cichlinae.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécies Analisadas

Foram analisadas 22 espécies, membros da família Cichlidae, distribuídas nas bacias hidrográficas da América do Sul. *Cichla kelberi* Kullander e Ferreira, 2006, *Retroculus lapidifer* (Castelnau, 1855), *Biotodoma cupido* (Heckel, 1840), *Geophagus proximus* (Castelnau, 1855) e *Aequidens tetramerus* (Heckel, 1840) no rio Araguaia, Barra do Garças-MT. *Apistogramma commbrae* (Regan, 1906) e *Mesonauta festivus* (Heckel, 1840) Coxim-MS. *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), *Gymnogeophagus rhabdotus* (Hensel, 1870) e *Cichlasoma portalegrense* (Hensel, 1870) estação agrônômica campus da UFRGS Porto Alegre-RS. *Australoheros* sp. rio Maquiné Porto Alegre-RS. *Satanoperca pappaterra* (Heckel, 1840) rio São José dos Dourados Vitória Brasil-SP. *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840, na lagoa comprida, Aquidauana-MS. *Amatitlania nigrofasciatus* (Günther, 1867), *Andinoacara rivulatus* (Günther, 1860), *Amphilophus citrinellus* (Günther, 1864), *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831), *Hypselecara temporalis* (Günther, 1862) adquiridas em loja de peixes ornamentais Botucatu – SP. Também foram adquiridas espécies da subfamília Pseudocrenilabrinae do lago Malawi *Cynotilapia afra* (Günther, 1894), *Sciaenochromis ahli* (Trewavas, 1935), *Maylandia greshakei* (Meyer & Foerster, 1984) e *Melanochromis auratus* (Boulenger, 1897) em loja de peixes ornamentais Botucatu – SP.

Métodos

Os machos sexualmente maduros, representantes da família Cichlidae, tiveram o aparelho reprodutor retirado, para análise posterior.

O aparelho reprodutor dos espécimes dissecados foi retirado inteiro, fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH 7.3. Os testículos foram seccionados longitudinal ou transversalmente, em cubos de aproximadamente 1 mm, e mantidos em fixador, por pelo menos 12 horas. Os fragmentos dos testículos de espécimes sexualmente maduros, contendo esperma, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, no escuro, lavados em água destilada, contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% e novamente lavados. Seguiu-se, então, a desidratação em série crescente de concentração de acetona e a infiltração por um período de 12 horas em solução 1:1 de mistura de acetona e Araldite. Após a infiltração, os

fragmentos de testículos foram pré-incluídos em mistura de Araldite, em frasco aberto, colocados em estufa a 37° C por 1 hora, seguindo-se a inclusão em nova mistura de Araldite, em estufa a 58-60° C por 48 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Ultratome III do LKB, equipado com navalha de diamante, coletados em telas de cobre, sem filme suporte e contrastados em acetato de uranila a partir de uma solução saturada preparada em etanol 50%, por 20 minutos, no escuro. Após lavagem por várias vezes em álcool 50%, o material sofreu nova contrastação em citrato de chumbo por 10 minutos, seguida de lavagem, por várias vezes, em água destilada. Os cortes assim preparados foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips-CM 100 e fotografados em filme 35 mm da Kodak (Eastman 5302), microscópio de transmissão Zeiss-EM 900 e fotografados em placas de 83mm X 102mm. As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico da Kodak (Kodabrome RC Print). E microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit-FEI com captura de imagem digital.

Análise filogenética

A análise filogenética consistiu em três etapas interdependentes: trabalho exploratório (seleção de táxons e caracteres), sistematização e codificação dos dados e análise computacional conforme proposto por Poe e Wiens (2000). O critério de seleção dos táxons do grupo interno examinados no presente trabalho foi a sua alocação atual na subfamília Cichlinae.

A metodologia filogenética seguiu as propostas apresentadas por Hennig (1966, 1968), e posteriormente desenvolvidas e elaboradas por vários autores (Wiley, 1981; Wiley *et al.*, 199; Forey *et al.*, 1992; Goloboff, 1993; Amorim, 2002), que reconhecem como monofilético apenas o grupo taxonômico reunido por sinapomorfias, ou seja, que compartilham de novidades evolutivas únicas herdadas de um ancestral comum.

Para testar o monofiletismo da subfamília Cichlinae baseado em características espermáticas o grupo interno é composto de 20 espécies da subfamília. O grupo externo é composto por *Cynotilapia afra*, *Sciaenochromis ahli*, *Maylandia greshakei* e *Melanochromis auratus*, espécie pertencente à subfamília Pseudocrenilabrinae, considerada grupo irmão da subfamília Cichlinae de acordo com a filogenia proposta por Stiassny (1991), Kullander (1998), Farias e colaboradores (1999), Smith e colaboradores (2008) e López-Fernández e colaboradores (2010).

Os caracteres e seus respectivos estados foram descritos de acordo com o modelo proposto por Sereno (2007) no qual, caracteres são considerados variáveis independentes (não correlacionadas) e estado de caráter são condições mutuamente exclusivas do caráter. Caracteres não aplicáveis ou não comparáveis foram codificados como “?”, símbolo este reconhecido pelo programa como “missing data”. A matriz foi construída no programa WinClada 1.00.08 (Nixon, 2002) e é composta por 23 táxons e 28 caracteres, que foram tratados como não ordenados. Os caracteres codificados para *Cichla intermedia* foram interpretados segundo artigo de Quagio-Grassiotto e colaboradores (2003).

Para investigar as relações internas da subfamília Cichlinae foi utilizado o método de parcimônia com pesagem implícita a fim de atenuar os efeitos das homoplasias (Goloboff *et al.*, 2008). A estratégia de busca heurística foi preferida em detrimento do método de busca exaustiva, devido ao tempo de processamento computacional. A reconstrução filogenética foi executada no programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) utilizando as novas tecnologias de análise afim de maximizar pontos de início (ilhas de arvoras) e reduzir o tempo gasto em cada busca. Foram utilizados os seguintes recursos “*parsimony ratchet*” Nixon (1999) que utiliza a diferença no comprimento entre árvores geradas a partir do método tradicional (árvore de Wagner e TBR); “*drift*” Goloboff (1999) método interativo semelhantes ao ratchet que, no entanto, usa um ajuste estatístico randomicamente modificado para selecionar as melhores árvores durante cada interação; “*sectorial searches*” Goloboff (1999) realiza a busca de árvores mais parcimoniosas em subgrupos de táxons da matriz de dados de forma independente; “*tree fusion*” Goloboff (1999) utiliza a permuta de ramos entre árvores criando novas combinações que vão além de uma troca.

A polaridade do caráter foi somente determinada depois de análise simultânea de análises de parcimônia global incluindo todos os táxons do grupo interno e externo, de acordo com Nixon e Carpenter (1993). Os clados foram enraizados em *Cynotilapia afra*, espécie pertencente à subfamília Pseudocrenilabrinae.

O número de passos, índices de consistência e retenção e a lista de sinapomorfias comuns foram obtidos através do TNT (Goloboff *et al.*, 2008). As medidas de suporte são expressas por suporte relativo de Bremer (1994).

RESULTADOS

RESULTADOS

Subfamília Pseudocrenilabrinae

Cynotilapia afra, *Sciaenochromis ahli*, *Maylandia greshakei* e *Melanochromis auratus*

Nos espermatozoides de *Cynotilapia afra* (Fig. 14: A-D), *Sciaenochromis ahli* (Fig. 14: E-I, E-inset), *Maylandia greshakei* (Fig. 14: J-N) e *Melanochromis auratus* (Fig. 14: O-S) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de contorno irregular ramificado e profunda. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear em *C. afra*, *M. auratus* e *S. ahli*. Em *M. greshakei* somente o centríolo proximal está inserido e o centríolo distal está fora da fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo formando um ângulo agudo em relação ao centríolo distal (Fig. 14: A, E, F, J, O, P, E-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, é média em comprimento e em largura. *S. ahli* não possui sistema vesicular. *C. afra*, *M. auratus* e *M. greshakei* possuem sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam distribuídas na região periférica da peça intermediária. As mitocôndrias, esféricas, ocupam a porção inicial da peça intermediária distribuídas em duas camadas em *Cynotilapia afra*, em três camadas em *Maylandia greshakei*, *Melanochromis auratus* e uma camada em *Sciaenochromis ahli*. Distribuídas ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo dos quais as mitocôndrias estão separadas pelo canal citoplasmático. A porção posterior da peça intermediária é formada por uma estreita projeção citoplasmática, que acompanha o canal, a bainha citoplasmática (Fig. 14: B-C, G-H, K-M, Q-S). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e não possuem projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. Presença de abundante secreção no lúmen testicular. (Fig. 14: D, I, N,S).

Tribo Retroculini

Ultraestrutura dos Espermatozoides

Retroculus lapidifer

Nos espermatozoides de *R. lapidifer* (Fig. 15: A-E, A-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos. O núcleo é excêntrico

em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, de contorno irregular e ramificado e profunda. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é lateral e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig.15: A, A-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, média em comprimento e em largura. Não possui sistema vesicular. As mitocôndrias, esféricas, ocupam a porção inicial da peça intermediária distribuídas em duas camadas, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. A porção posterior da peça intermediária é formada por uma estreita projeção citoplasmática, que acompanha o canal, a bainha citoplasmática (Fig. 15: B-D). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 15: B, E).

Tribo Cichlini

Espermiogênese

Cichla kelberi

Nas espermátides iniciais de *C. kelberi* o núcleo é esférico com cromatina descondensada. O complexo centriolar está posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem uma posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo. Acompanhando a rotação nuclear, na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. A fossa nuclear é de contorno irregular e ramificado e profunda, e passa a abrigar o centríolo proximal e parte do distal. No núcleo a compactação da cromatina ocorre de forma progressiva e com padrão de distribuição heterogêneo em flocos grossos. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo, arrastando o flagelo e a membrana plasmática, que se invagina. Assim, se forma o canal citoplasmático, um espaço entre a membrana flagelar e a membrana plasmática. A massa citoplasmática se desloca em direção ao eixo flagelar,

formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas (Fig. 12: A-C).

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Cichla kelberi

Nos espermatozóides de *C. kelberi* (Fig. 15: F-J, F-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é profunda de contorno irregular ramificado. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo formando ângulo agudo em relação ao centríolo distal (Fig.15: F, F-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, média em comprimento e em largura. Não possui sistema vesicular. As mitocôndrias, esféricas, ocupam a porção inicial da peça intermediária distribuídas em duas camadas, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. A porção posterior da peça intermediária é formada por uma estreita projeção citoplasmática, que acompanha o canal, a bainha citoplasmática (Fig. 15: G-I). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 15: J).

Tribo Geophagini

Espermio gênese

Gymnogeophagus rhabdotus*, *Biotodoma cupido*, *Geophagus brasiliensis* e *Geophagus proximus

Nas espermátides iniciais de *G. rhabdotus*, *B. cupido*, *G. brasiliensis* e *G. proximus* o núcleo é esférico com cromatina descondensada. O complexo centriolar está posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermio gênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo

centriolar e o flagelo assumem uma posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo. Acompanhando a rotação nuclear, na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. A fossa nuclear é profunda de contorno irregular e ramificado, e passa a abrigar o centríolo proximal e parte do distal. No núcleo a compactação da cromatina ocorre de forma progressiva e com padrão de distribuição heterogêneo em flocos grossos. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo, arrastando o flagelo e a membrana plasmática, que se invagina. Assim, se forma o canal citoplasmático, um espaço entre a membrana flagelar e a membrana plasmática. A massa citoplasmática se desloca em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas (Fig. 12: D-F).

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Gymnogeophagus rhabdotus*, *Biotodoma cupido*, *Geophagus brasiliensis* e *Geophagus proximus

Nos espermatozóides de *G. rhabdotus* (Fig. 16: A-F, A-inset), *B. cupido* (Fig. 16: G-J, G-inset), *G. brasiliensis* (Fig. 13: K-N, L-inset) e *G. proximus* (Fig. 16: O-T, P-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de contorno irregular e ramificado e profunda. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 16: A, G, K-L, O-P, A-inset, G-inset, L-inset, P-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica e média em largura. No comprimento a peça intermediária é média em *B. cupido*, *G. rhabdotus* e *G. brasiliensis*, já em *G. proximus* a peça é longa. Possuem sistema vesicular composto por poucas vesículas que se conectam em *G. brasiliensis* e *G. proximus*, mas não há conexão entre vesículas em *B. cupido* e *G. rhabdotus*. As vesículas estão distribuídas perifericamente na peça intermediária nas quatro espécies. As mitocôndrias, esféricas, ocupam a porção inicial da peça intermediária distribuídas em camadas, exceto em *G. proximus* que estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária. Em *B. cupido* e *G. brasiliensis* estão distribuídas em duas camadas, e em três camadas para *G. rhabdotus*. Distribuídas ao redor do centríolo distal as mitocôndrias estão separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático. A porção posterior da

peça intermediária é formada por uma estreita projeção citoplasmática, que acompanha o canal, a bainha citoplasmática (Fig. 16: B-E, H-J, M-N, Q-S). Possuem um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 16: F, J, L, T).

Espermiogênese

Apistogramma commbrae

Nas espermátides iniciais de *A. commbrae* o núcleo é esférico com cromatina descondensada e o complexo centriolar está posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem uma posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo. Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. Em *A. commbrae* a fossa nuclear é de concavidade única, contorno regular e profundidade moderada, e passa a abrigar o centríolo proximal e parte do distal. No núcleo a compactação da cromatina ocorre de forma progressiva e com padrão de distribuição heterogêneo em flocos finos. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo e o canal citoplasmático surge devido ao deslocamento da massa citoplasmática em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas (Fig. 12: G-I).

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Apistogramma commbrae

Nos espermatozóides de *A. commbrae* (Fig. 17: K-P) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos finos. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de concavidade única, de contorno regular e de profundidade moderada. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 17: K). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, média em comprimento e em largura. Possui sistema vesicular

composto por poucas vesículas que não se conectam e estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária. As mitocôndrias, alongadas, estão distribuídas em duas camadas na peça intermediária, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. Não possui bainha citoplasmática (Fig. 17: L-P). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 17: P).

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Satanoperca pappaterra

Nos espermatozóides de *S. pappaterra* (Fig. 18: A-E, A-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina homogêneo. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de contorno irregular e ramificado e profunda. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 18: A, A-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, média em comprimento e larga. Possui sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam e estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária. As mitocôndrias, esféricas, estão distribuídas aleatoriamente pela peça intermediária, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. Não possui bainha citoplasmática (Fig. 18: B-E). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 18: E).

Espermio gênese

Crenicichla lepidota

Nas espermátides iniciais de *C. lepidota* o núcleo é esférico com cromatina descondensada e o complexo centriolar, com o centríolo proximal anterior e perpendicular ao distal, está posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre

lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem uma posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo. Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. Em *C. lepidota* a fossa nuclear é profunda, de contorno irregular e ramificado, e passa a abrigar o centríolo proximal e parte do distal. No núcleo a compactação da cromatina ocorre de forma progressiva e homogênea. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo e o canal citoplasmático surge devido ao deslocamento da massa citoplasmática em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas.

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Crenicichla lepidota

Nos espermatozóides de *C. lepidota* (Fig. 18: F-J, F-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina homogêneo. O núcleo é excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de contorno irregular ramificado e profunda. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 18: F-G, F-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é assimétrica, média em comprimento e em largura. Possui sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam e estão localizadas na região periférica da peça intermediária. As mitocôndrias, alongadas, estão distribuídas aleatoriamente pela peça intermediária, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. Não possui bainha citoplasmática (Fig. 18: H-J). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 18: J).

Tribo Heroini

Espermiogênese

***Australoheros* sp.**

Nas espermatídes iniciais de *Australoheros* sp. o núcleo é esférico com cromatina descondensada. O complexo centriolar está posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem uma posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo. Acompanhando a rotação nuclear, na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. A fossa nuclear é profunda e de contorno irregular e ramificado, e passa a abrigar o centríolo proximal e parte do distal. No núcleo a condensação da cromatina ocorre de forma progressiva e com padrão de distribuição heterogêneo em flocos grossos. O canal citoplasmático se forma. A massa citoplasmática se desloca em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas.

Ultraestrutura dos Espermatozóides

***Australoheros* sp.**

Nos espermatozóides de *Australoheros* sp. (Fig. 17: A-E, A-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos finos. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de contorno irregular ramificado e profunda. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 17: A-C, A-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, é média em comprimento e em largura. Possui sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam e estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária. As mitocôndrias, esféricas, ocupam a porção inicial da peça intermediária distribuídas em duas camadas, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. A porção posterior da peça intermediária é formada por uma estreita projeção citoplasmática, que acompanha o canal, a bainha citoplasmática (Fig. 17: D-E). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2

microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 17: E)

Espermiogênese

Mesonauta festivus

Nas espermatídes iniciais de *M. festivus* o núcleo é esférico com cromatina descondensada e o complexo centriolar está posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo sofre uma rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem uma posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo. Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. Em *M. festivus* a fossa nuclear é de concavidade única, de contorno regular e profundidade moderada, e passa a abrigar o centríolo proximal e parte do distal. No núcleo a condensação da cromatina ocorre de forma progressiva e com padrão de distribuição heterogêneo em flocos finos. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo e o canal citoplasmático surge devido ao deslocamento da massa citoplasmática em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas.

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Mesonauta festivus

Nos espermatozóides de *M. festivus* (Fig. 17: F-J) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos finos. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de concavidade única, de contorno regular e profundidade moderada. O centríolo proximal está totalmente inserido e parte do centríolo distal, também está inserida na fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 17: F). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, média em comprimento e em largura. Possui sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam e estão distribuídas na região periférica da peça intermediária. As mitocôndrias, alongadas, estão distribuídas aleatoriamente na peça

intermediária, ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. Não possui bainha citoplasmática (Fig. 17: G-I). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático. Em lados opostos do flagelo (Fig. 17: J).

Espermiogênese

Amphilophus citrinellus*, *Hypselecara temporalis* e *Amatitlania nigrofasciatus

Nas espermátides iniciais de *H. temporalis*, *A. nigrofasciatus* e *A. citrinellus* e o núcleo é esférico com cromatina descondensada e com o complexo centriolar posicionado lateralmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo sofre rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem a posição medial em relação ao núcleo. A massa citoplasmática se desloca em direção ao complexo centriolar. Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. A fossa nuclear é de concavidade única, contorno regular, rasa e abriga apenas a parte anterior do centríolo proximal. No núcleo a compactação da cromatina ocorre de forma progressiva e homogênea. A massa citoplasmática se desloca em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária e o canal citoplasmático não se forma. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas (Fig. 13: A-C).

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Amphilophus citrinellus*, *Hypselecara temporalis* e *Amatitlania nigrofasciatus

Nos espermatozóides de *A. citrinellus* (Fig. 19: A-G), *H. temporalis* (Fig. 19: H-L, H-inset) e *A. nigrofasciatus* (Fig. 19: S-Z) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina homogêneo. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de concavidade única, de contorno regular e rasa em *H. temporalis* e *A. citrinellus*, e em *A. nigrofasciatus* a fossa é de profundidade moderada. Apenas parte do centríolo proximal está inserida e o centríolo distal está totalmente fora da fossa nuclear em *H. temporalis* e *A. citrinellus*, e em *A. nigrofasciatus* somente o centríolo proximal está inserido. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 19: A-B, H, S-T, H-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por

fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, curta e média em largura. Possui sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam e estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária. As mitocôndrias, esféricas, estão distribuídas em uma camada na peça intermediária, ao redor do centríolo distal. Não possuem canal citoplasmático e nem bainha citoplasmática (Fig. 19: C-F, I-K, U-X). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária. Em lados opostos do flagelo (Fig. 19: G, L, Z).

Tribo Astronotini

Espermiogênese

Astronotus ocellatus

Nas espermátides iniciais de *A. ocellatus* o núcleo é esférico com cromatina descondensada e com o complexo centriolar posicionado medialmente ao núcleo. O desenvolvimento do flagelo ocorre medialmente ao núcleo a partir do centríolo distal, que se diferencia em corpúsculo basal. Ao longo da espermiogênese o núcleo não sofre rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo continuam na posição medial em relação ao núcleo. A massa citoplasmática e o núcleo deslizam em direção ao complexo centriolar. Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. Em *A. ocellatus* a fossa nuclear é de concavidade única, de contorno regular, rasa e abriga apenas a parte anterior do centríolo proximal. No núcleo a condensação da cromatina ocorre de forma progressiva e homogênea. Embora, a massa citoplasmática se desloque em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária, o canal citoplasmático não se forma. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas (Fig. 13: G-I).

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Astronotus ocellatus

Nos espermatozóides de *A. ocellatus* (Fig. 19: M-R, M-inset, N-inset) o núcleo é esférico, com padrão de compactação da cromatina homogêneo. O núcleo é ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de concavidade única, de contorno regular e rasa. Apenas parte do centríolo proximal está inserida e o centríolo distal está totalmente fora da fossa nuclear. No complexo centriolar, o centríolo proximal é

anterior e oblíquo em ângulo obtuso em relação ao centríolo distal (Fig. 19: M-N, M-inset, N-inset). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados entre si, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, curta e média em largura. Possui sistema vesicular composto por poucas vesículas que não se conectam e estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária. As mitocôndrias, esféricas, estão distribuídas em uma camada na peça intermediária, ao redor do centríolo distal. Não possui canal citoplasmático e nem bainha citoplasmática (Fig. 19: O-Q). Possui um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar. Sistema multivesicular pode ser observado nas alhetas. As alhetas flagelares tem o início de sua formação abaixo da peça intermediária. Em lados opostos do flagelo (Fig. 19: R).

Tribo Cichlasomatini

Espermiogênese

Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma portalegrense* e *Aequidens tetramerus

Nas espermatídes iniciais de *A. rivulatus*, *C. portalegrense* e *A. tetramerus* o núcleo é esférico com cromatina descondensada e o complexo centriolar, com o centríolo proximal lateral e paralelo ao distal, está posicionado medialmente ao núcleo. Os dois centríolos se diferenciam em corpúsculo basal, dando origem a dois flagelos. Ao longo da espermiogênese o núcleo não sofre rotação em relação ao eixo flagelar, conseqüentemente o complexo centriolar e o flagelo assumem uma posição medial em relação ao núcleo. Na região do núcleo voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão, a fossa nuclear. Em *A. tetramerus*, *A. rivulatus* e *C. portalegrense* a fossa nuclear é rasa, de contorno regular e de concavidade dupla. No núcleo a condensação da cromatina ocorre de forma progressiva e homogênea. Em *A. tetramerus* e *C. portalegrense* o núcleo se alonga e em *A. rivulatus* o núcleo se mantém esférico. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo e o canal citoplasmático surge devido ao deslocamento da massa citoplasmática em direção ao eixo flagelar, formando a peça intermediária. Na peça intermediária estão as mitocôndrias e vesículas.

Ultraestrutura dos Espermatozóides

Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma portalegrense* e *Aequidens tetramerus

Nos espermatozóides de *C. portalegrense* (Fig. 20: F-J) e *A. tetramerus* (Fig. 20: K-O), o núcleo é alongado, e em *A. rivulatus* (Fig. 20: A-E) o núcleo é esférico. O padrão de

compactação da cromatina é homogêneo. O núcleo é medial em relação ao eixo flagelar. Uma estreita faixa de citoplasma, desprovido de organelas, envolve o núcleo. A depressão no núcleo, a fossa nuclear, é de contorno regular, de concavidade dupla e rasa. A fossa abriga apenas a parte anterior de cada um dos centríolos, dispostos paralelamente um em relação ao outro em *A. tetramerus* e em *A. rivulatus*. Em *C. portalegrense*, embora a fossa regular de concavidade dupla se forme os centríolos, também dispostos paralelamente, não estão inseridos nela (Fig. 20: A-D, F-G, K). Material elétron denso envolve os centríolos que estão conectados ao envoltório nuclear e à membrana plasmática por fibrilas de ancoragem. A peça intermediária é simétrica, média em comprimento e média em largura (menor que a largura do núcleo) em *A. tetramerus* e *C. portalegrense* e curta e larga (maior que o diâmetro do núcleo) em *A. rivulatus*. Não possuem sistema vesicular. As mitocôndrias, alongadas, estão distribuídas aleatoriamente na peça intermediária em *A. tetramerus* e *C. portalegrense*. Distribuídas ao redor dos centríolos paralelos e da região inicial do flagelo do qual estão separadas pelo canal citoplasmático em *A. tetramerus* e *C. portalegrense*. Em *A. rivulatus* as mitocôndrias estão distribuídas em uma camada, apenas ao redor dos centríolos paralelos, uma vez que não possui o canal citoplasmático. Não possuem bainha citoplasmática (Fig. 20: E, H-I, L-N). Possuem dois flagelos, com axonemas de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais ou alhetas na membrana flagelar de cada um. As alhetas flagelares tem o início de sua formação no interior da peça intermediária, no canal citoplasmático em *A. tetramerus* e *C. portalegrense* e em *A. rivulatus* abaixo da peça intermediária. Em lados opostos dos flagelos (Fig. 20: E, J, O).

Tabela 1: Matriz de caracteres utilizada na análise filogenética.

Espécies	Caracteres																											
	Testículo	Espermiogênese			Espermatozóide																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
<i>Cynotilapia afra</i>	0	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	-	
<i>Melanochromis auratus</i>	0	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	1	1	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1	-	
<i>Maylandia greshakei</i>	0	-	0	0	0	1	1	1	-	2	3	1	1	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	1	-		
<i>Sciaenochromis ahli</i>	0	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	-	-	-	0	0	1	-		
<i>Cichla intermedia</i>	1	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	1	1	0	1	0	0	2	1	-	-	-	0	0	0	1		
<i>Cichla kelberi</i>	1	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	-	-	-	0	0	0	1		
<i>Retroculus lapidifer</i>	1	-	0	0	0	1	2	1	-	2	0	1	0	1	0	0	1	1	1	-	-	-	0	0	0	1		
<i>Crenicichla lepidota</i>	1	-	0	0	0	1	-	2	-	2	0	0	2	0	0	1	1	-	0	1	1	1	0	0	0	1		
<i>Biotodoma cupido</i>	1	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1		
<i>Gymnogeophagus rhabdotus</i>	1	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	0	1	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1		
<i>Geophagus brasiliensis</i>	1	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1		
<i>Geophagus proximus</i>	1	-	0	0	0	1	1	1	-	2	0	0	1	0	1	0	1	-	0	0	1	1	0	0	0	1		
<i>Satanoperca pappaterra</i>	1	-	0	0	0	1	-	1	-	2	0	0	1	0	0	0	1	-	0	1	0	1	0	0	0	1		
<i>Apistogramma commbrae</i>	1	-	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1		
<i>Astronotus ocellatus</i>	1	0	1	0	1	0	-	1	0	0	1	2	1	-	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Aequidens tetramerus</i>	1	0	0	1	0	1	-	0	0	1	4	3	0	0	0	1	1	-	1	-	-	-	1	0	0	0		
<i>Cichlasoma portalegrense</i>	1	0	0	1	0	1	-	0	0	1	2	3	0	0	0	1	1	-	1	-	-	-	1	0	0	0		
<i>Andinoacara rivulatus</i>	1	0	0	1	0	0	-	0	0	1	4	3	0	1	0	1	0	0	1	-	-	-	1	0	0	1		
<i>Hypselecara temporalis</i>	1	1	-	1	0	0	-	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1		
<i>Mesonauta festivus</i>	1	1	-	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	-	0	1	1	1	0	0	0	1		
<i>Australoheros sp.</i>	1	1	-	0	0	0	2	1	-	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1		
<i>Amatitlania nigrofasciatus</i>	1	1	-	0	0	1	-	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1		
<i>Amphilophus citrinellus</i>	1	1	-	0	0	1	-	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1		

Lista de caracteres utilizados na análise filogenética

Um total de 27 caracteres foi utilizado na análise filogenética. A matriz de caracteres está representada na tabela 1.

TESTÍCULO

Caráter 0- Compartimento luminal, preenchimento por secreção de provável origem protéica produzida pela célula de Sertoli

(0) Presente

(1) Ausente

ESPERMIOGÊNESE

Caráter 1- Complexo centriolar, posição inicial em relação ao núcleo

(0) Medial

(1) Lateral

Caráter 2- Complexo centriolar inicialmente medial, migração do complexo centriolar em direção ao núcleo

(0) Presente

(1) Ausente

Caráter 3 - Canal citoplasmático

(0) Presente

(1) Ausente

ESPERMATOZÓIDE

Núcleo

Caráter 4- Núcleo, forma

(0) Esférico

(1) Alongado (comprimento equivale a aproximadamente 1,5 vezes da largura)

Caráter 5- Núcleo, cromatina, padrão de distribuição

(0) Heterogênea (distribuída em intervalos irregulares que se apresentam como áreas elétronicamente lúcidas em microscopia eletrônica de transmissão)

(1) Homogênea (igualmente distribuída por todo o núcleo de forma que não é possível detectar a presença de áreas elétronicamente lúcidas)

Caráter 6- Núcleo, cromatina, distribuição heterogênea, aspecto

(0) Flocos finos (pequenos grânulos de cromatina, muito próximos uns aos outros assumindo um padrão ligeiramente heterogêneo)

(1) Flocos grossos (grânulos maiores de cromatina, distribuídos em intervalos maiores assumindo um padrão fortemente heterogêneo)

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 5.

Caráter 7- Núcleo, posição em relação ao eixo flagelar

(0) Medial

(1) Ligeiramente excêntrico

(2) Excêntrico

Caráter 8- Núcleo, fossa nuclear, contorno do envoltório nuclear

(0) Regular

(1) Irregular ramificada

Caráter 9- Núcleo, fossa nuclear, contorno do envoltório nuclear regular, concavidade

(0) Única

(1) Dupla

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 8.

Caráter 10- Núcleo, fossa nuclear, profundidade

(0) Rasa (profundidade equivale a aproximadamente 1/6 da largura do núcleo)

(1) Moderada (profundidade equivale a aproximadamente 1/3 da largura do núcleo)

(2) Profunda (profundidade equivale a aproximadamente 1/2 da largura do núcleo)

Complexo centriolar

Caráter 11- Complexo centriolar, posição em relação à fossa nuclear

(0) Centríolo proximal totalmente inserido e apenas parte do centríolo distal inserido na fossa nuclear

(1) Apenas parte do centríolo proximal inserido e o centríolo distal fora da fossa nuclear

(2) Nenhum dos centríolos inseridos na fossa nuclear

(3) Somente o centríolo proximal totalmente inserido na fossa e distal fora da fossa nuclear

(4) Apenas a parte anterior de cada um dos centríolos paralelos inserido na fossa nuclear

Caráter 12- Complexo centriolar, posição relativa

- (0) Centríolo proximal anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal
- (1) Centríolo proximal anterior e oblíquo em ângulo agudo em relação ao centríolo distal
- (2) Centríolo proximal anterior e oblíquo em ângulo obtuso em relação ao centríolo distal
- (3) Centríolo proximal lateral e paralelo em relação ao centríolo distal
- (4) Centríolo proximal lateral e perpendicular em relação ao distal

Peça intermediária

Caráter 13- Peça intermediária, simetria da região terminal no sentido do comprimento

- (0) Simétrica
- (1) Ligeiramente assimétrica
- (2) Assimétrica

Caráter 14- Peça intermediária, canal citoplasmático presente na espermiogênese

- (0) Presente
- (1) Ausente (neste caso a ausência é decorrente da perda no final do processo)

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 3.

Caráter 15- Peça intermediária, bainha citoplasmática

- (0) Ausente
- (1) Presente

Caráter 16- Mitocôndria, forma

- (0) Esférica
- (1) Alongada (comprimento duas vezes maior que a largura)

Caráter 17- Mitocôndria, distribuição em relação à peça intermediária, corte longitudinal

- (0) Camadas
- (1) Aleatória

Caráter 18- Mitocôndria, número de camadas

- (0) Uma
- (1) Duas
- (2) Três
- (3) Cinco

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 17.

Caráter 19- Sistema vesicular

(0) Presente

(1) Ausente

Caráter 20- Sistema vesicular, conexão entre vesículas

(0) Presente

(1) Ausente

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 19.

Caráter 21- Sistema vesicular, localização em relação à peça intermediária, corte transversal

(0) Aleatória

(1) Periférica

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 19.

Caráter 22- Sistema vesicular, quantidade, corte transversal

(0) Muitas (acima de dez)

(1) Poucas (dificilmente encontradas)

Flagelo

Caráter 23- Flagelo, quantidade

(0) Um

(1) Dois

Caráter 24- Flagelo, sistema multivesicular

(0) Ausente

(1) Presente

Caráter 25- Flagelo, membrana flagelar, alhetas

(0) Presente

(1) Ausente

Caráter 26- Flagelo, membrana flagelar, alhetas, início

(0) No interior da peça intermediária (no canal citoplasmático)

(1) Abaixo da peça intermediária

Assinalado como não informado para táxons com estado 1 no caráter 25.

Lista de Sinapomorfias Comuns para 12 árvores (Número dos Nós se Referem aos Nós do Consenso Estrito de Nelsen)

Cynotilapia afra:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Melanochromis auratus:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Maylandia greshakei:

Todas as árvores:

Char. 11 Complexo centriolar, posição em relação à fossa nuclear: (0 > 3).

Sciaenochromis ahli:

Algumas árvores:

Char. 19. Sistema vesicular: (0 > 1).

Cichla intermedia:

Algumas árvores:

Char. 18. Mitocôndria, número de camadas: (1 > 2).

Cichla kelberi:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Retroculus lapidifer:

Todas as árvores:

Char. 7. Núcleo, posição em relação ao eixo flagelar: (1 > 2).

Algumas árvores:

Char. 12. Complexo centriolar, posição relativa: (1 > 4).

Crenicichla lepidota:

Todas as árvores:

Char. 7. Núcleo, posição em relação ao eixo flagelar: (1 > 2).

Char. 13. Peça intermediária, simetria da região terminal no sentido do comprimento: (1 > 2).

Char. 16. Mitocôndria, forma: (0 > 1).

Char. 21. Sistema vesicular, localização em relação à peça intermediária, corte transversal:
(0 > 1).

Biotodoma cupido:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Gymnogeophagus rhabdotus:

Algumas árvores:

Char. 18. Mitocôndria, número de camadas: (1 > 2).

Geophagus brasiliensis:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Geophagus proximus:

Todas as árvores:

Char. 17. Mitocôndria, distribuição em relação à peça intermediária, corte longitudinal:
(0 > 1).

Satanoperca pappaterra:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Apistogramma commbrae:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Astronotus ocellatus:

Todas as árvores:

Char. 24. Flagelo, sistema multivesicular: (0 > 1).

Algumas árvores:

Char. 1. Complexo centriolar, posição inicial em relação ao núcleo: (1 > 0).

Char. 3. Canal citoplasmático: (0 > 1).

Char. 12. Complexo centriolar, posição relativa: (0 > 2).

Aequidens tetramerus:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Cichlasoma portalegrense:

Todas as árvores:

Char. 11. Complexo centriolar, posição em relação à fossa nuclear: (4 > 2).

Andinoacara rivulatus:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Hypselecara temporalis:

Algumas árvores:

Char. 3. Canal citoplasmático: (0 > 1).

Mesonauta festivus:

Todas as árvores:

Char. 17. Mitocôndria, distribuição em relação à peça intermediária, corte longitudinal:
(0 > 1).

Char. 21. Sistema vesicular, localização em relação à peça intermediária, corte transversal:
(0 > 1).

***Australoheros* sp.:**

Todas as árvores:

Char. 7. Núcleo, posição em relação ao eixo flagelar: (1 > 2).

***Amatitlania nigrofasciatus*:**

Algumas árvores:

Char. 10. Núcleo, fossa nuclear, profundidade: (0 > 1).

Char. 13. Peça intermediária, simetria da região terminal no sentido do comprimento: (1 > 0).

***Amphilophus citrinellus*:**

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Nó 24:

Todas as árvores:

Sem autapomorfias:

Nó 25:

Todas as árvores:

Char. 0. Compartimento luminal, preenchimento por secreção de provável origem protéica produzida pela célula de Sertoli: (0 > 1).

Char. 25. Flagelo, membrana flagelar, alhetas: (1 > 0).

Nó 26:

Todas as árvores:

Char. 17. Mitocôndria, distribuição em relação à peça intermediária, corte longitudinal: (0 > 1).

Nó 27:

Todas as árvores:

Char. 15. Peça intermediária, bainha citoplasmática: 1 > 0).

Nó 28:

Todas as árvores:

Char. 6. Núcleo, cromatina, distribuição heterogênea, aspecto: (1 > 0).

Char. 21. Sistema vesicular, localização em relação à peça intermediária, corte transversal: (1 > 0).

Nó 29:

Todas as árvores:

Char. 12. Complexo centriolar, posição relativa: (1 > 0).

Char. 19. Sistema vesicular: (1 > 0).

Nó 30:

Todas as árvores:

Char. 20. Sistema vesicular, conexão entre vesículas: (1 > 0).

Nó 31:

Todas as árvores:

Char. 16. Mitocôndria, forma: (0 > 1).

Algumas árvores:

Char. 10. Núcleo, fossa nuclear, profundidade: (2 > 1).

Nó 32:

Todas as árvores:

Char. 14. Peça intermediária, canal citoplasmático presente na espermiogênese: (0 > 1).

Algumas árvores:

Char. 10. Núcleo, fossa nuclear, profundidade: (2 > 0).

Char. 11. Complexo centriolar, posição em relação à fossa nuclear: (0 > 1).

Char. 18. Mitocôndria, número de camadas: (1 > 0).

Nó 33:

Todas as árvores:

Char. 4. Núcleo, forma: (0 > 1).

Char. 14. Peça intermediária, canal citoplasmático presente na espermiogênese: (1 > 0).

Char. 17. Mitocôndria, distribuição em relação à peça intermediária, corte longitudinal: (0 > 1).

Char. 26. Flagelo, membrana flagelar, alhetas, início: (1 > 0).

Nó 34:

Todas as árvores:

Char. 7. Núcleo, posição em relação ao eixo flagelar: (1 > 0).

Char. 9. Núcleo, fossa nuclear, contorno do envoltório nuclear regular, concavidade: (0 > 1).

Char. 16. Mitocôndria, forma: (0 > 1).

Char. 19. Sistema vesicular: (0 > 1).

Char. 23. Flagelo, quantidade: (0 > 1).

Algumas árvores:

Char. 1. Complexo centriolar, posição inicial em relação ao núcleo: (1 > 0).

Char. 11. Complexo centriolar, posição em relação à fossa nuclear: (1 > 4).

Char. 12. Complexo centriolar, posição relativa: (0 > 3).

Char. 13. Peça intermediária, simetria da região terminal no sentido do comprimento: (1 > 0).

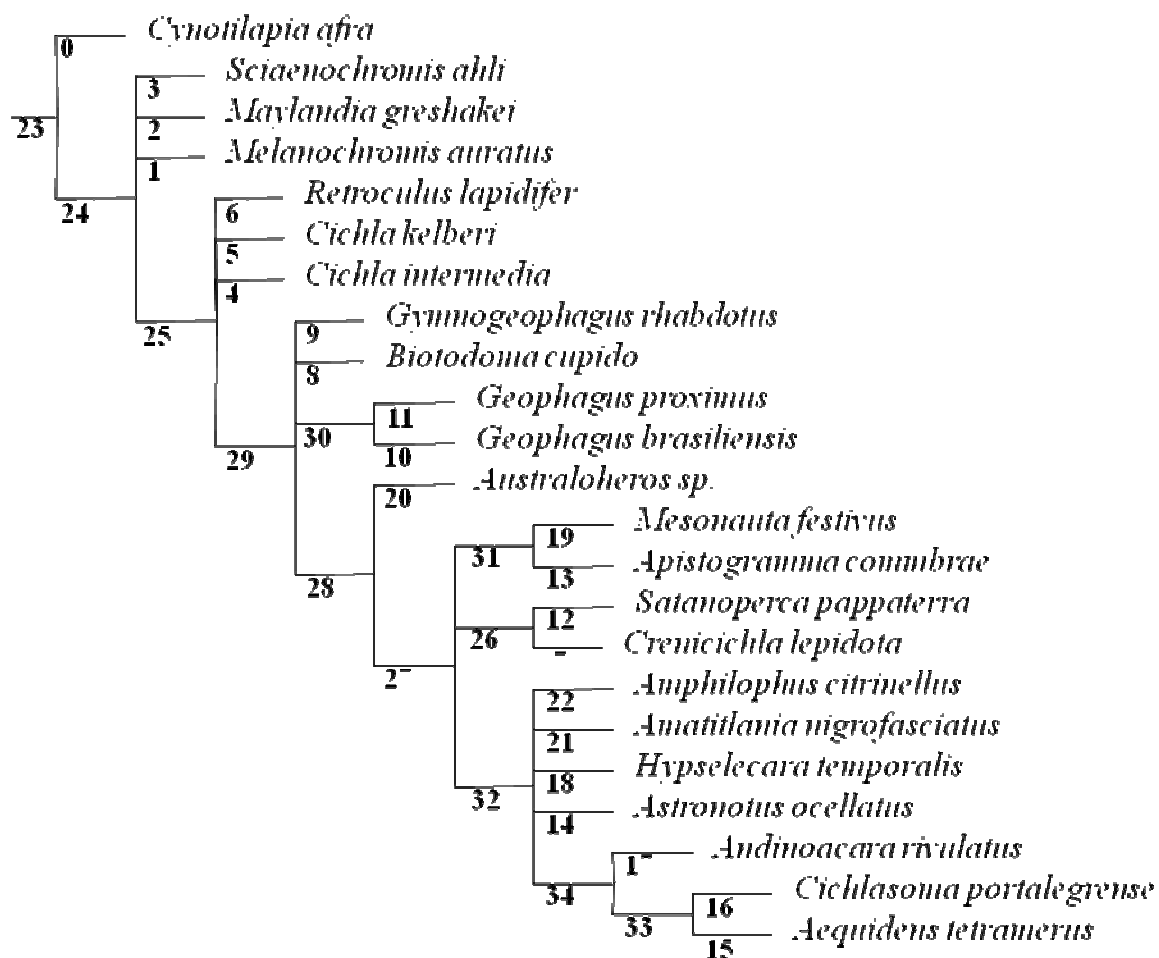


Figura 10: Árvore de Consenso Estrito obtido através de análise filogenética com valor de ajuste 3.75000.

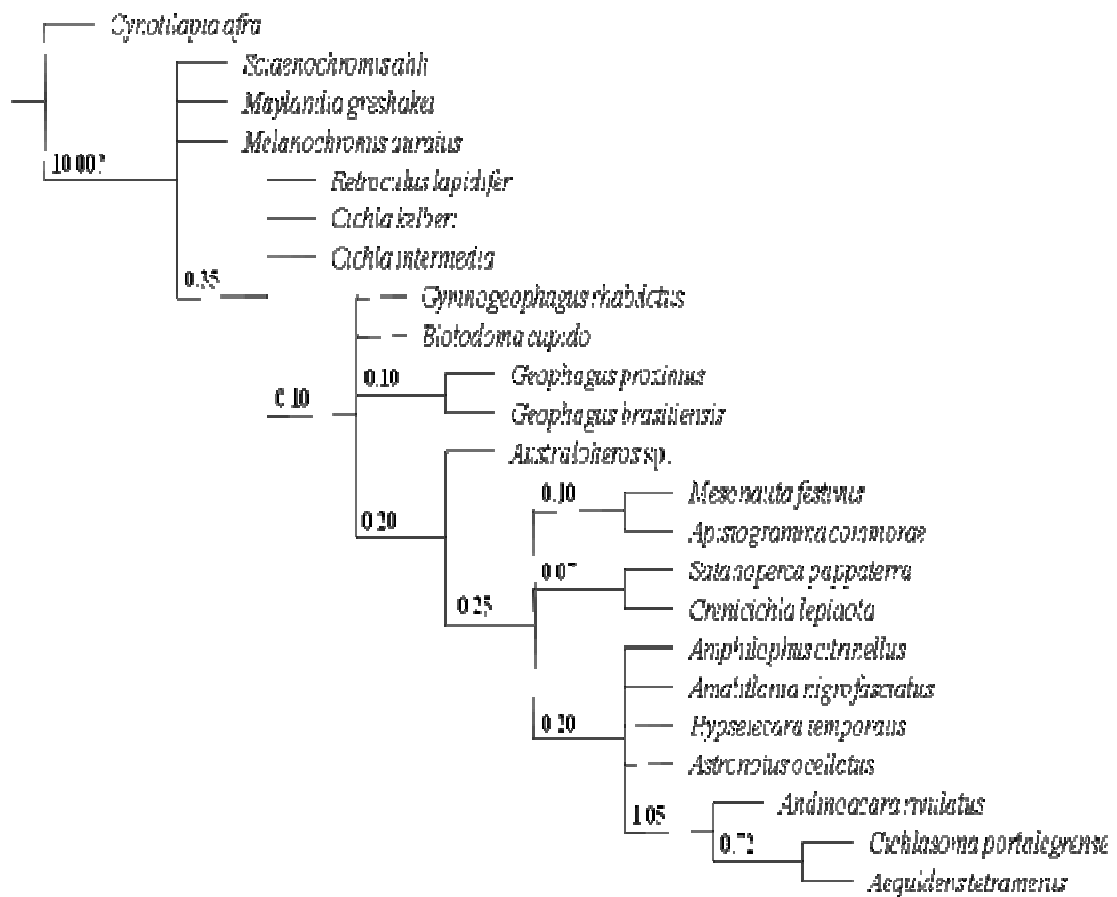


Figura 11: Árvore com índice de suporte de Bremer obtido através de análise filogenética.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

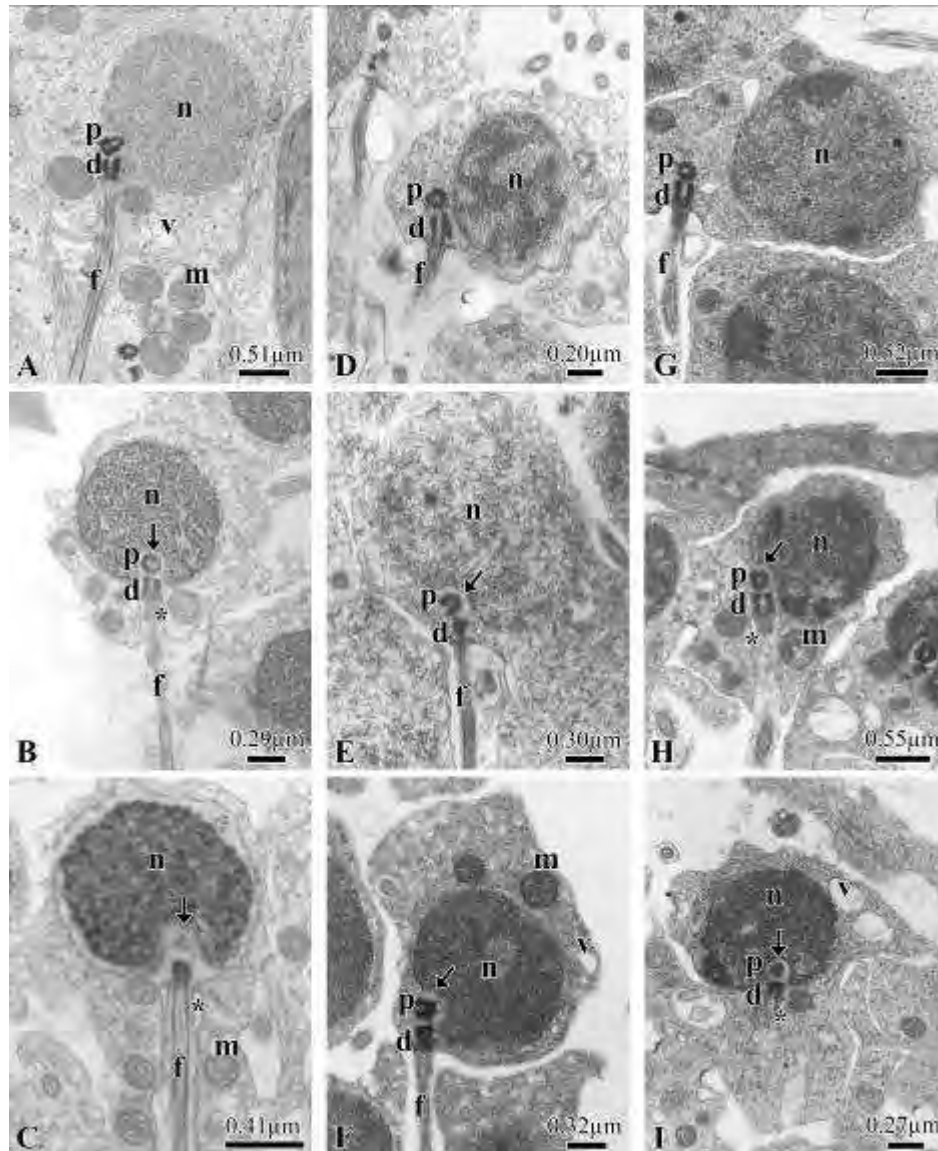


Figura 12 – Espermiogênese de (A–C) *Cichla kelberi*, (D–F) *Gymnogeophagus rhabdotus* e (G–I) *Apistogramma commbrae*. Seções longitudinais de espermatídes iniciais a finais. Notar a compactação progressiva da cromatina heterogênea em flocos grossos (*C. kelberi* e *G. brasiliensis*) e finos (*A. commbrae*), a posição lateral do núcleo (n) em relação ao complexo centriolar nas espermatídes iniciais, a rotação do núcleo em relação ao eixo flagelar e o consequente posicionamento dos centríolos proximal (p) e distal (d) e do flagelo (f) em posição ligeiramente excêntrica em relação ao núcleo ao longo da espermiogênese, a formação do canal citoplasmático (*) e da fossa nuclear (seta), as mitocôndrias (m) e as vesículas (v).

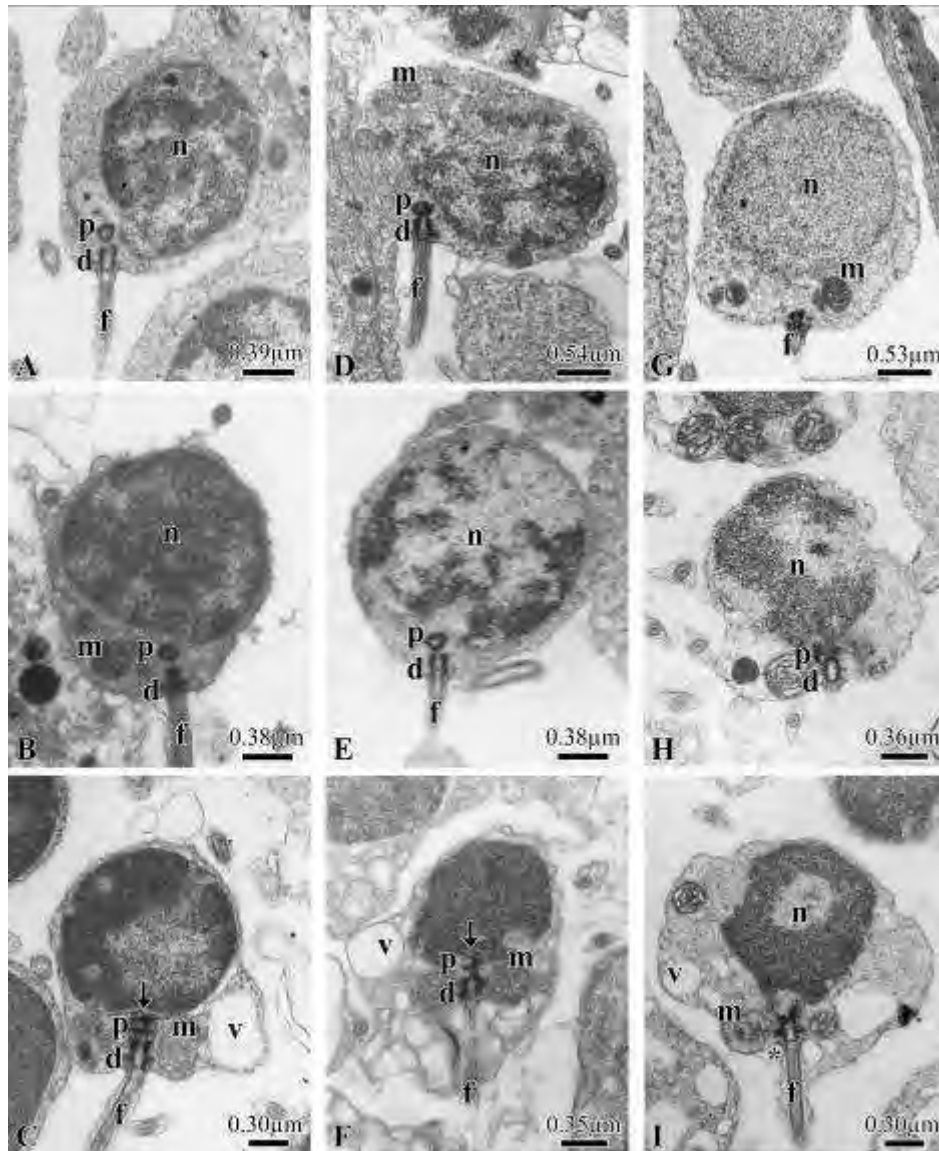


Figura 13 – Espermiogênese de (A–C) *Amphilophus citrinellus*, (D–F) *Hypselecara temporalis* e (G–I) *Astronotus ocellatus*. Seções longitudinais de espermatídes iniciais a finais. Notar a compactação progressiva da cromatina homogênea, a posição lateral do núcleo (n) em relação ao complexo centriolar nas espermatídes iniciais (*A. citrinellus* e *H. temporalis*), a rotação do núcleo em relação ao eixo flagelar e o consequente posicionamento dos centríolos proximal (p) e distal (d) e do flagelo (f) em posição medial em relação ao núcleo ao longo da espermiogênese, a não ocorrência de rotação em *A. ocellatus* e a manutenção do complexo centriolar em posição medial em relação ao núcleo, a formação da fossa nuclear (seta), a formação do canal citoplasmático em *A. citrinellus*, as mitocôndrias (m) e as vesículas (v).

Figura 14

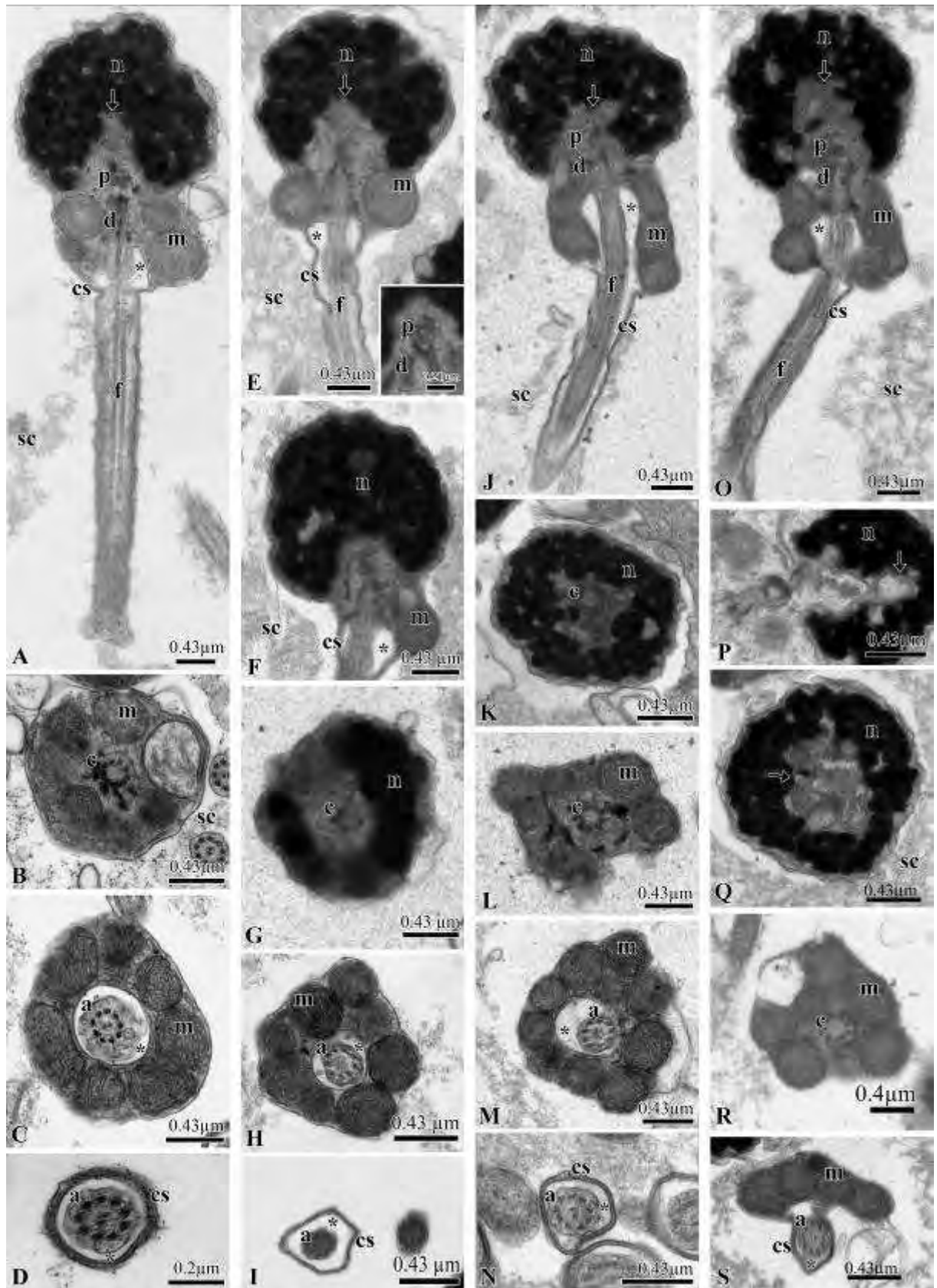


Figura 14 – Espermatozoides de (A–D) *Cynotilapia afra*, (E–I, E-inset) *Sciaenochomis ahli*, (J–N) *Maylandia greshakei* e (O–S) *Melanochromis auratus*. — A, E, F, J, O, P, E-inset. Secções longitudinais de espermatozoides. Notar o padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos; a posição ligeiramente excêntrica do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar; a fossa nuclear (seta) de contorno irregular ramificado e profunda; o centríolo proximal (p) e parte do centríolo distal (d) inseridos na fossa nuclear (*C. afra*, *M. auratus* e *S. ahli*) e somente o centríolo proximal inserido na fossa nuclear (*M. greshakei*), a disposição do centríolo proximal anterior e oblíquo formando um ângulo agudo em relação ao centríolo distal, as mitocôndrias (m) dispostas em camadas na porção inicial da peça intermediária, o canal citoplasmático (*), a bainha citoplasmática (cs), o flagelo (f), a secreção (sc). — B-C, G-H, K-M, Q-S. Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição ligeiramente excêntrica do centríolo (c), o formato esférico das mitocôndrias (m), o canal citoplasmático (*), o axonema (a). — D, I, N. Notar o flagelo com um clássico axonema (a), o canal citoplasmático (*) e a bainha citoplasmática (cs).

Figura 15

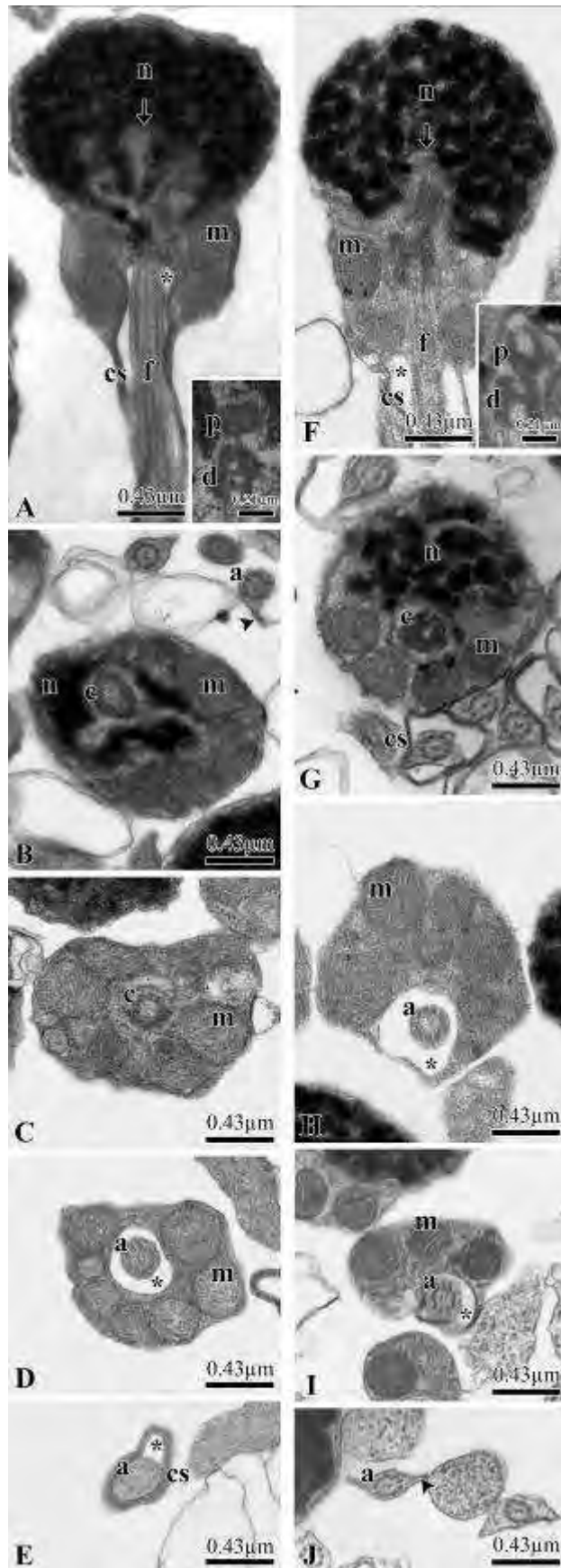


Figura 15 – Espermatozóides de **(A–E, A-inset) *Retroculus lapidifer*** e **(F–J, F-inset) *Cichla kelberi***. — **A, F, A-inset, F-inset.** Secções longitudinais de espermatozóides. Notar o padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos; a posição excêntrica do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar em *R. lapidifer* e ligeiramente excêntrica em *C. kelberi*; a fossa nuclear (seta) de contorno irregular ramificado e profunda; o centríolo proximal (p) e parte do centríolo distal (d) inseridos na fossa nuclear, a disposição do centríolo proximal lateral e perpendicular em relação ao centríolo distal em *R. lapidifer* e do centríolo proximal anterior e oblíquo formando ângulo agudo em relação ao distal em *C. kelberi*, as mitocôndrias (m) dispostas em camadas na porção inicial da peça intermediária, o canal citoplasmático (*), a bainha citoplasmática (cs), o flagelo (f). — **B–D, G–I.** Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição excêntrica do centríolo (c) em *R. lapidifer* e ligeiramente excêntrica em *C. kelberi*, o formato esférico das mitocôndrias (m), o canal citoplasmático (*), o axonema (a). — **B, E, J.** Notar o flagelo com um clássico axonema (a), as alhetas flagelares (cabeça de seta), o canal citoplasmático (*) e a bainha citoplasmática (cs).

Figura 16

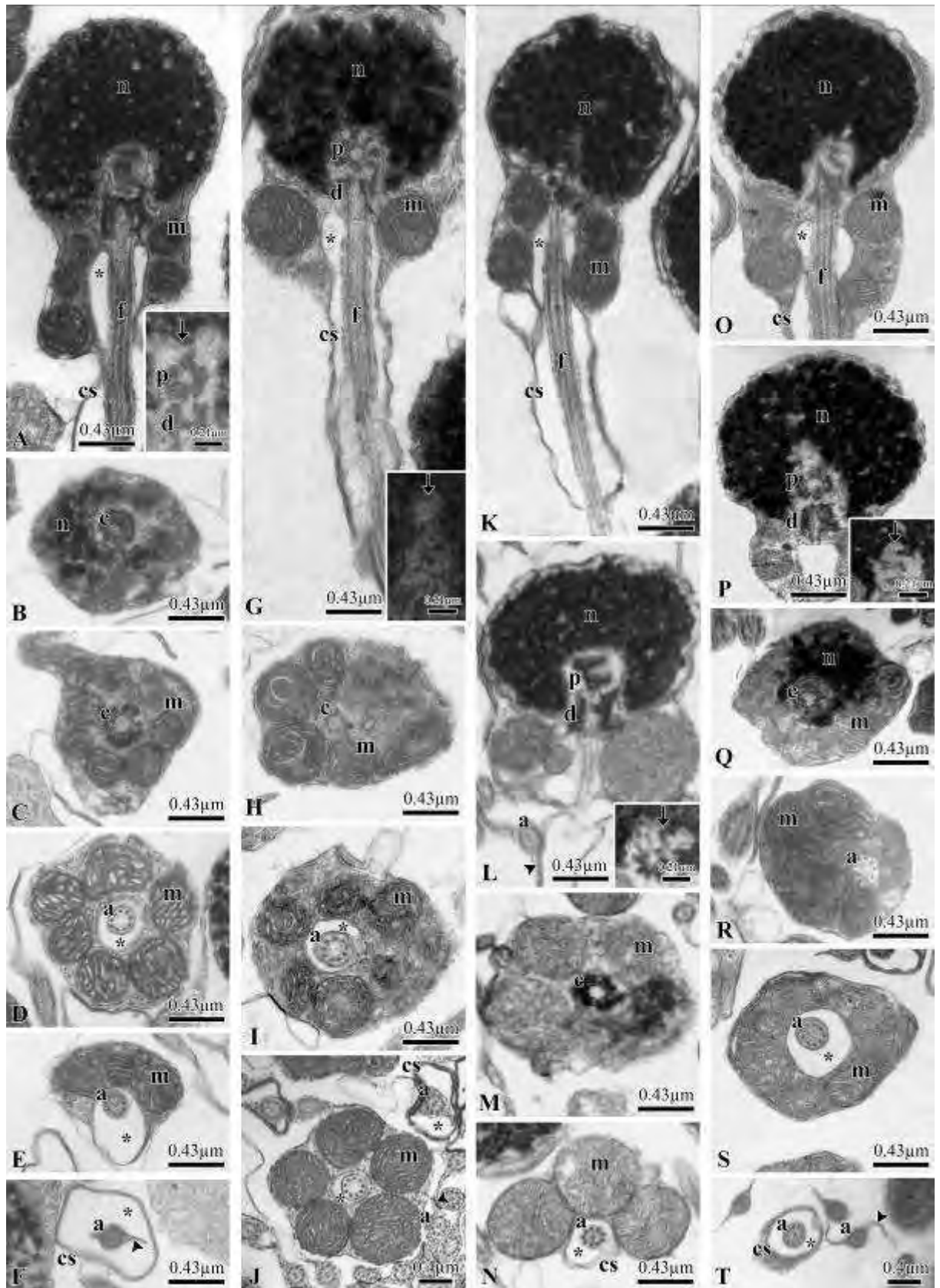


Figura 16 – Espermatozoides de (A–F, A-inset) *Gymnogeophagus rhabdotus*, (G–J, G-inset) *Biotodoma cupido*, (K–N, L-inset) *Geophagus brasiliensis* e (O–T, P-inset) *Geophagus proximus*. — A, G, K-L, O-P, A-inset, G-inset, L-inset, P-inset. Secções longitudinais de espermatozoides. Notar o padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos grossos; a posição ligeiramente excêntrica do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar; a fossa nuclear (seta) de contorno irregular ramificado e profunda; o centríolo proximal (p) e parte do centríolo distal (d) inseridos na fossa nuclear, a disposição do centríolo proximal anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal, as mitocôndrias (m) dispostas em camadas na porção inicial da peça intermediária (*G. rhabdotus*, *B. cupido* e *G. brasiliensis*) e aleatoriamente (*G. proximus*), o canal citoplasmático (*), a bainha citoplasmática (cs), o flagelo (f). — B-E, H-J, M-N, Q-S. Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição ligeiramente excêntrica do centríolo (c), o formato esférico das mitocôndrias (m), o canal citoplasmático (*), o axonema (a). — F, J, L, T. Notar o flagelo com um clássico axonema (a), as alhetas flagelares (cabeça de seta), o canal citoplasmático (*) e a bainha citoplasmática (cs).

Figura 17

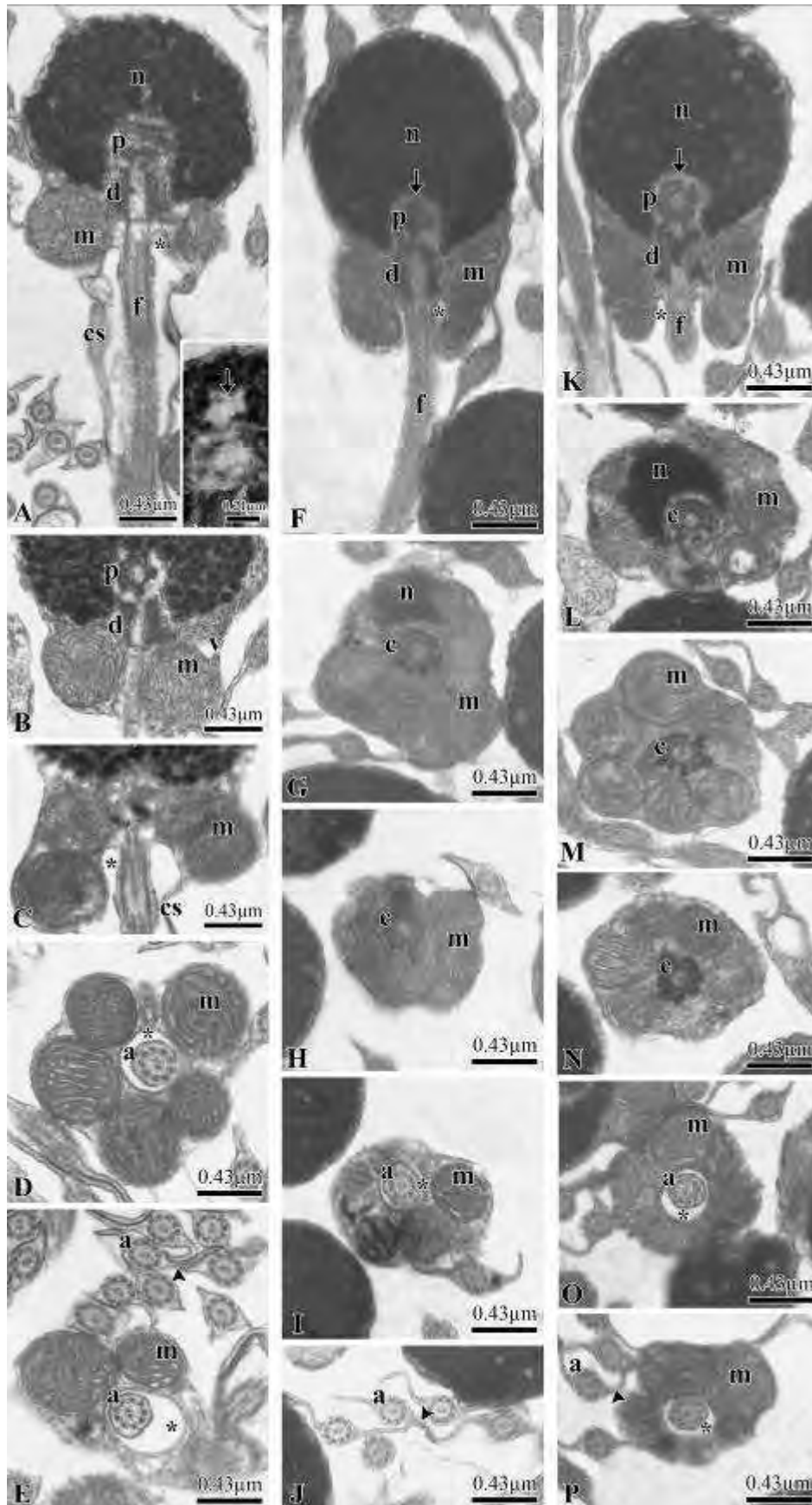


Figura 17 – Espermatozoides de (A–E, A-inset) *Australoheros* sp., (F–J) *Mesonauta festivus* e (K–P) *Apistogramma commbrae*. — A-C, F, K, A-inset. Secções longitudinais de espermatozoides. Notar o padrão de compactação da cromatina heterogêneo em flocos finos; a posição ligeiramente excêntrica do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar; a fossa nuclear (seta) de contorno irregular ramificado e profunda (*Australoheros* sp.) e de contorno regular e profundidade moderada (*M. festivus* e *A. commbrae*); o centríolo proximal (p) e parte do centríolo distal (d) inseridos na fossa nuclear, a disposição do centríolo proximal anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal, as mitocôndrias (m) dispostas em camadas (*Australoheros* sp. e *A. commbrae*) e aleatoriamente (*M. festivus*) na peça intermediária, o canal citoplasmático (*), a bainha citoplasmática (cs) em *Australoheros* sp., o flagelo (f). — D-E, G-I, L-P. Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição ligeiramente excêntrica do centríolo (c), o formato esférico (*Australoheros* sp.) e alongado (*M. festivus* e *A. commbrae*) das mitocôndrias (m), o canal citoplasmático (*), o axonema (a). — E, J, P. Notar o flagelo com um clássico axonema (a) e as alhetas flagelares (cabeça de seta).

Figura 18

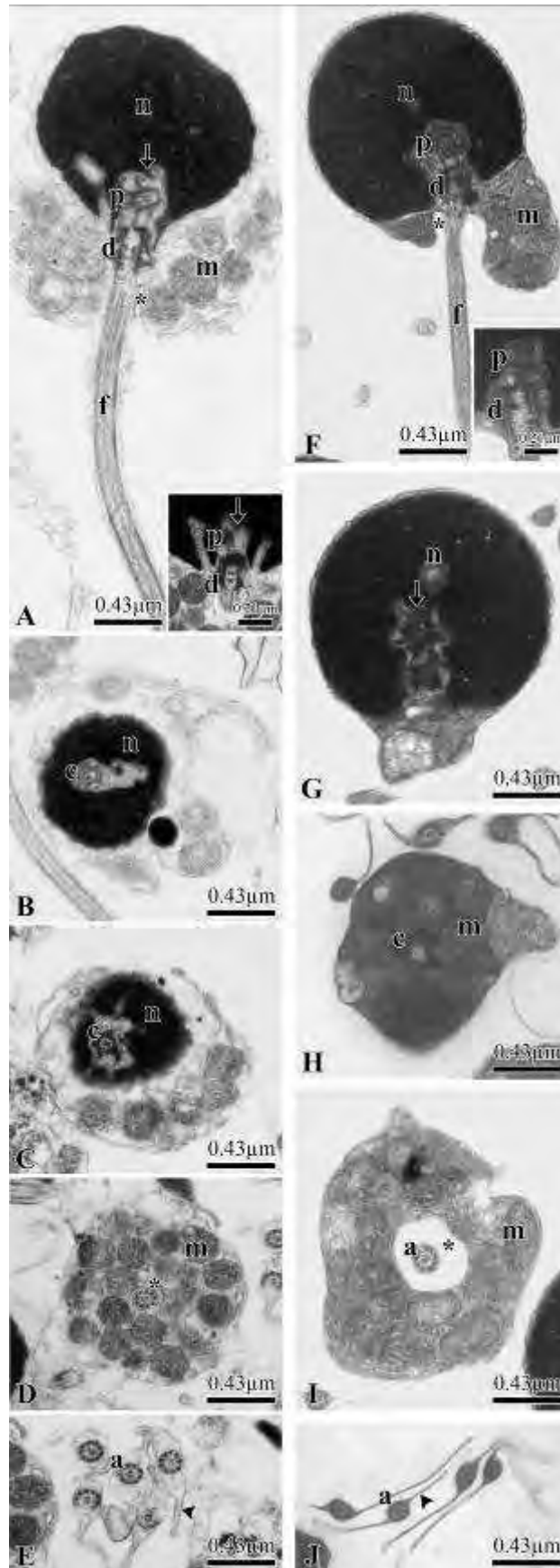


Figura 18 – Espermatozoides de (A–E, A-inset) *Satanoperca pappaterra* e (F–J, F-inset) *Crenicichla lepidota*. — A, F-G, A-inset, F-inset. Secções longitudinais de espermatozoides. Notar o padrão de compactação da cromatina homogêneo; a posição ligeiramente excêntrica do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar em *S. pappaterra* e excêntrica em *C. lepidota*; a fossa nuclear (seta) de contorno irregular ramificado e profunda; o centríolo proximal (p) e parte do centríolo distal (d) inseridos na fossa nuclear, a disposição do centríolo proximal anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal, as mitocôndrias (m) dispostas aleatoriamente na peça intermediária, o canal citoplasmático (*), o flagelo (f). — B-D, H-I. Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição ligeiramente excêntrica (*S. pappaterra*) e excêntrica (*C. lepidota*) do centríolo (c), o formato esférico (*S. pappaterra*) e alongado (*C. lepidota*) das mitocôndrias (m), o canal citoplasmático (*), o axonema (a). — E, J. Notar o flagelo com um clássico axonema (a) e as alhetas flagelares (cabeça de seta).

Figura 19

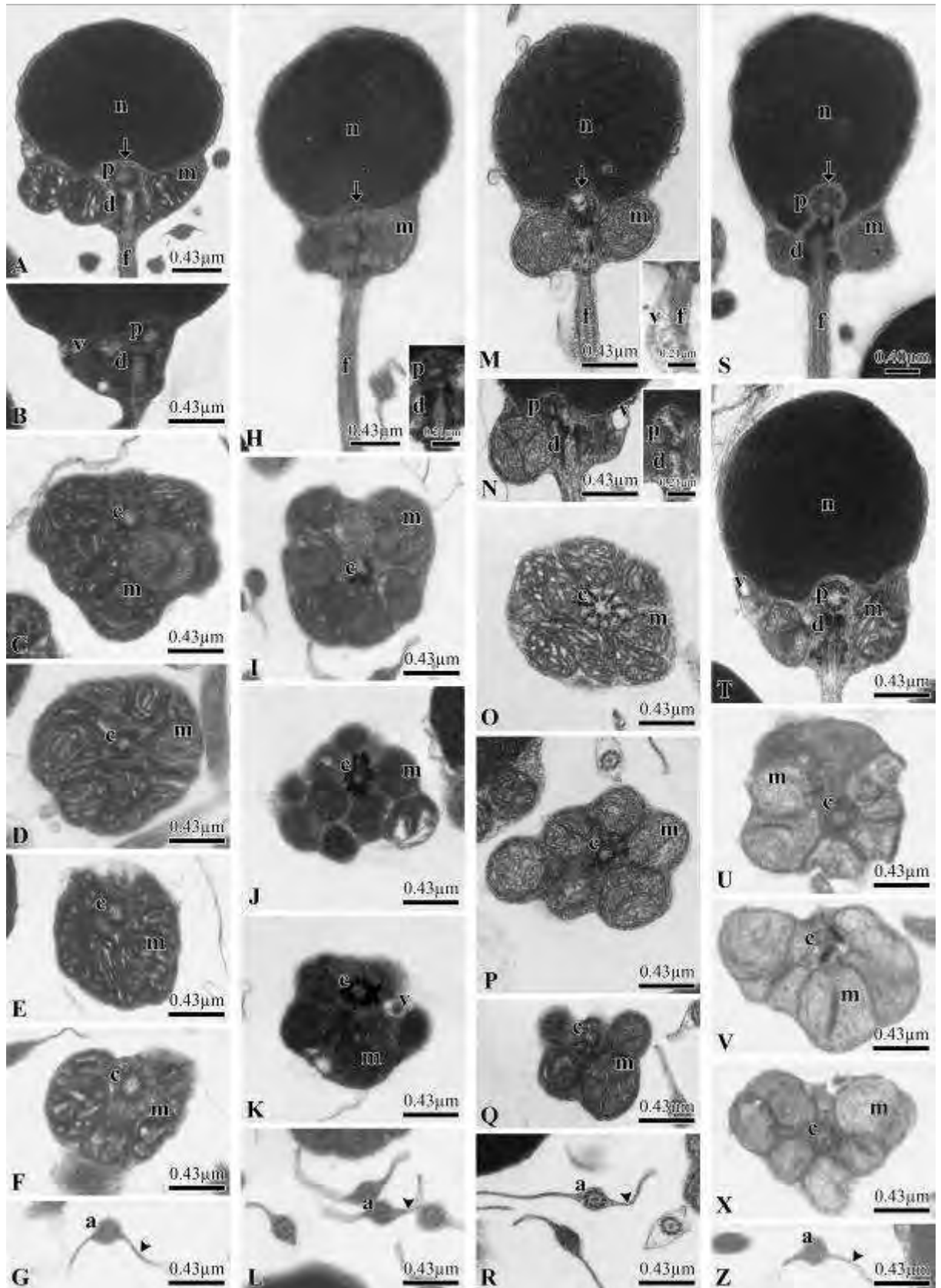


Figura 19– Espermatozoides de (A–G) *Amphilophus citrinellus*, (H–L, H-inset) *Hypselecara temporalis*, (M–R, M-inset, N-inset) *Astronotus ocellatus* e (S–Z) *Amatitlania nigrofasciatus*. — A-B, H, M-N, S-T, H-inset, M-inset, N-inset. Secções longitudinais de espermatozoides. Notar o padrão de compactação da cromatina homogêneo, a posição ligeiramente excêntrica do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar, a fossa nuclear (seta) de contorno regular e rasa (*A. citrinellus*, *H. temporalis* e *A. ocellatus*) e de contorno regular e profundidade moderada (*A. nigrofasciatus*), apenas parte do centríolo proximal (p) inserido na fossa nuclear e o centríolo distal (d) fora (*A. citrinellus*, *H. temporalis* e *A. ocellatus*) e somente o centríolo proximal totalmente inserido na fossa nuclear (*A. nigrofasciatus*), a disposição do centríolo proximal anterior e perpendicular em relação ao centríolo distal (*A. citrinellus*, *H. temporalis* e *A. nigrofasciatus*) e do centríolo proximal anterior e oblíquo em ângulo obtuso em relação ao centríolo distal (*A. ocellatus*), as vesículas (v), as mitocôndrias (m) dispostas em camadas na peça intermediária, o flagelo (f). — C-F, I-K, O-Q, U-X. Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição ligeiramente excêntrica do centríolo (c), o formato esférico das mitocôndrias (m), o axonema (a). — G, L, R, Z. Notar o flagelo com um clássico axonema (a) e as alhetas flagelares (cabeça de seta).

Figura 20

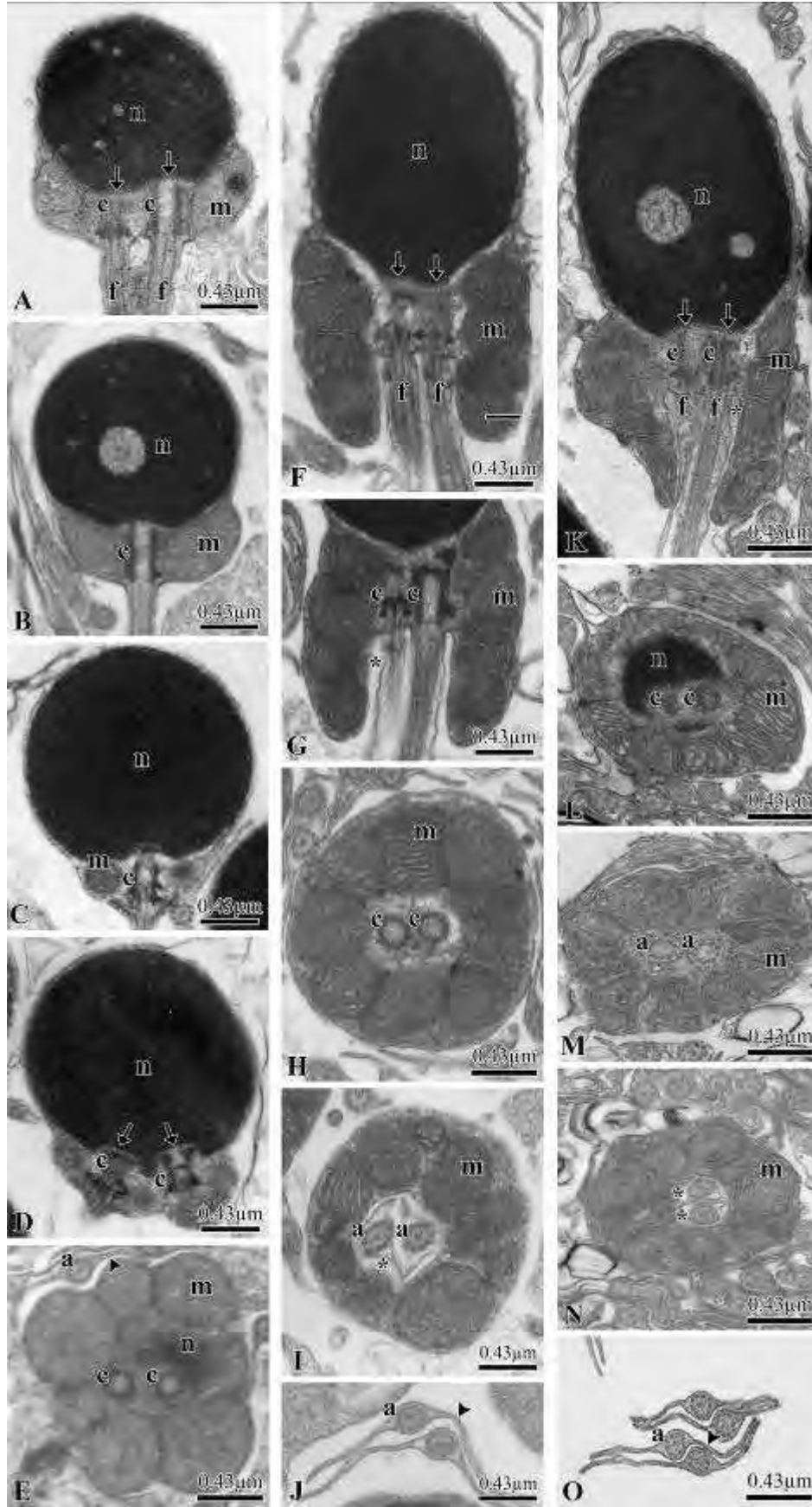


Figura 20 – Espermatozoides de (A–E) *Andinoacara rivulatus*, (F–J) *Cichlasoma portalegrense* e (K–O) *Aequidens tetramerus*. — A-D, F-G, K. Secções longitudinais de espermatozoides. Notar o núcleo alongado em *A. tetramerus* e *C. portalegrense* e esférico em *A. rivulatus*, o padrão de compactação da cromatina homogêneo, a posição medial do núcleo (n) em relação ao eixo flagelar, a fossa nuclear (seta) de contorno regular e concavidade dupla e rasa, a parte anterior de cada um dos centríolos inserida na fossa nuclear (*A. tetramerus* e *A. rivulatus*) e os centríolos não inseridos na fossa nuclear (*C. portalegrense*), a disposição paralela dos centríolos, as mitocôndrias (m) dispostas em camadas (*A. rivulatus*) ou aleatoriamente (*A. tetramerus* e *C. portalegrense*) na peça intermediária, o canal citoplasmático (*), o flagelo duplo (f). — E, H-I, L-N. Secções transversais da base do núcleo e em diferentes níveis da peça intermediária. Notar a posição medial dos centríolos (c), o formato alongado das mitocôndrias (m), o canal citoplasmático (*), o axonema (a). — E, J, O. Notar o flagelo com um clássico axonema (a) e as alhetas flagelares (cabeça de seta).

DISCUSSÃO

Espermiogênese e Morfologia dos Espermatozóides

Estudos recentes têm mostrado que o processo de espermiogênese em peixes apesar de conservado o é em diferentes níveis dependendo da história evolutiva do grupo considerado. Conforme Baicere-Silva e colaboradores (2011), seu conhecimento é crucial para o entendimento da estrutura do espermatozóide e consequentes homologias. Os dados disponíveis em Labroidei (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003) mostram que a espermiogênese nesse grupo de peixes é em sua maioria do tipo I (*sensu* Mattei, 1970). Nas espécies da família Cichlidae aqui analisadas o processo de diferenciação das espermátides apresenta uma ampla gama de variações em relação aos padrões descritos e até então utilizados como referencia nos estudos que envolvem a morfologia dos espermatozóides dos peixes teleósteos. Estas variações resultam principalmente da alteração dos movimentos de algumas das organelas espermáticas ao longo da diferenciação seja da espermiogênese do tipo I (*sensu* Mattei, 1970) ou do tipo III (*sensu* Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008). Conforme Santana e colaboradores (*in press*) a espermiogênese do tipo I e III diferem basicamente quanto à posição inicial dos centríolos, lateral versus medial ao núcleo; presença versus ausência da migração dos centríolos em direção ao núcleo; presença versus ausência da rotação nuclear em relação ao eixo flagelar; e a formação versus a não formação da fossa nuclear e do canal citoplasmático, respectivamente. As caracterizações dos tipos de espermiogênese representam situações extremas e como visto entre os Cichlidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003b; este estudo) e em outros grupos de peixes (Baicere-Silva *et al.*, 2011; Santana *et al.*, *in press*) as variações existentes resultam em espermatozóides com características distintas. Não considerado dentre as características sejam da espermiogênese do tipo I ou III, conforme originalmente descritos, estão os padrões de compactação da cromatina. Os diferentes tipos de compactação dependem do tipo de proteínas associadas ao DNA (Saperas *et al.*, 1993) e se refletem na forma final dos espermatozóides.

Dentre as espécies de Cichlinae, aqui analisadas, *Cichla kelberi*, *Biotodoma cupido*, *Geophagus brasiliensis*, *Geophagus proximus* e *Gymnogeophagus rhabdotus*, e também em *Cichla intermedia* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003) a espermiogênese corresponde à espermiogênese do tipo I conforme descrita por Mattei (1970). Em *Amatitlania nigrofasciatus*, *Apistogramma commbrae* e *Mesonauta festivus*, com uma espermiogênese também do tipo I, a migração dos centríolos não ocorre e o canal citoplasmático se forma em decorrência do deslizamento da massa citoplasmática em direção ao eixo flagelar. Estas

espécies também compartilham o mesmo padrão morfológico geral no que diz respeito aos espermatozoides. Nessas a cromatina mais ou menos compactada tem aspecto flocular; a fossa nuclear é única e abriga o centríolo proximal e parte do distal, as mitocôndrias são esféricas e distribuem-se em uma ou mais camadas, a peça intermediária possui uma longa bainha citoplasmática e alhetas mais ou menos longas estão presentes no flagelo. Esse mesmo padrão de espermatozoide é encontrado em *Retroculus lapidifer*, o que pode também ser verdadeiro em relação ao tipo de espermiogênese.

Nas espécies africanas aqui analisadas, *Cynotilapia afra*, *Sciaenochromis ahli*, *Maylandia greshakei* e *Melanochromis auratus*, os espermatozoides além de serem muito semelhantes entre si, assemelham-se também aos anteriormente descritos. As semelhanças compartilhadas sugerem também um mesmo processo de ontogênese. Porém, distinguem-se de todos demais pela ausência das alhetas flagelares e pela presença de abundante secreção no lúmen testicular.

Ainda que não documentada, as semelhanças entre os espermatozoides em *Satanoperca pappaterra* e *Crenicichla lepidota* indicam que a espermiogênese nessas espécies deve também ser do tipo I ou uma variante deste como documentado *Geophagus*. Os espermatozoides de *S. pappaterra* e *C. lepidota* diferem dos anteriores, principalmente por apresentarem um padrão homogêneo de compactação da cromatina, peça intermediária larga e mitocôndrias distribuídas de forma aleatória.

Os espermatozoides de *Amphilophus citrinellus* e *Hypselecara temporalis* compartilham do mesmo processo de espermiogênese que os anteriores, isto é a variante da espermiogênese do tipo I, em que os centríolos estão posicionados lateralmente, não migram e rotação nuclear ocorre. São muito semelhantes entre si, no entanto diferem bastante dos espermatozoides comentados até aqui. Comparados aos imediatamente anteriores diferem destes por apresentarem uma fossa nuclear rasa e de contorno regular, peça intermediária curta e canal citoplasmático ausente. Também em *Amatitlania nigrofasciatus* e *Astronotus ocellatus* os espermatozoides são bastante semelhantes entre si, no entanto diferem quanto à ontogênese, pois apresentam espermiogênese do tipo I e III, respectivamente. Os espermatozoides de *A. nigrofasciatus* e *A. ocellatus* apesar de compartilharem com *A. citrinellus* e *H. temporalis* o mesmo formato da peça intermediária, diferentemente dos destes tem núcleo oval e fossa nuclear suficientemente profunda para abrigar pelo menos o centríolo proximal.

Entre as demais espécies aqui analisadas chama a atenção *Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma portalegrense* e *Aequidens tetramerus*, cujos espermatozóides apresentam dois flagelos. Além de apresentarem dois flagelos estas espécies compartilham outras características. Nelas a cromatina apresenta um padrão homogêneo de compactação; a fossa nuclear é dupla e rasa e cada uma das depressões que a formam relaciona-se com um dos centríolos; ambos os centríolos diferenciam-se em corpúsculos basais e formam axonemas; as peças intermediárias não possuem bainha citoplasmática e apresentam alhetas flagelares. Diferem entre si na forma do núcleo que varia de esférico (em *A. rivulatus* a ligeiramente alongado em *C. portalegrense* e *A. tetramerus*); e quanto a peça intermediária curta e sem canal citoplasmático em *A. rivulatus*. Apesar do tipo de espermiogênese dessas espécies não se encontrar aqui documentado, a única imagem existente (*C. portalegrense*) indica tratar-se de uma espermiogênese do tipo III. A ocorrência da espermiogênese do tipo III, nas formas de espermatozóides com dois flagelos encontra-se bem documentada entre os Siluriformes (ver Burns *et al.*, 2009- para revisão). O alongamento nuclear tradicionalmente associado à inseminação, não encontra suporte entre os Cichlidae, pois núcleos mais alongados do que os aqui documentados estão presentes entre os ciclídeos africanos riverinos (informações pessoais).

Análise filogenética

As propostas mais recentes de relacionamento apresentadas para a família Cichlidae reconhecem os Pseudocrenilabrinae, assim como os Cichlinae, como monofiléticos, ou seja, um agrupamento taxonômico cujos componentes compartilham a mesma ancestralidade. (Stiassny, 1991; Kullander, 1998; Farias *et al.*, 1999; Sparks, 2004; Sparks & Smith, 2004; Smith *et al.*, 2008; López-Fernández *et al.*, 2010). Os Pseudocrenilabrinae são reconhecidos como grupo-irmão dos Cichlinae que quando comparados àqueles africanos ocupam uma posição mais derivada dentro da família (Stiassny, 1991; Kullander, 1998; Farias *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008; López-Fernández *et al.*, 2010). Na proposta aqui apresentada os ciclídeos africanos representados por *Cynotilapia afra*, *Sciaenochromis ahli*, *Maylandia greshakei* e *Melanochromis auratus* aparecem numa politomia junto com os ciclídeos neotropicais. Os Pseudocrenilabrinae possuem como caracteres exclusivos a presença de uma secreção de provável origem protéica no compartimento luminal bem como alheta flagelar ausente. Desta forma é possível assumir que a perda da secreção no compartimento luminal e a presença de alheta flagelar são condições sinapomórficas para os ciclídeos neotropicais. Aqui a subfamília

Cichlinae pode ser reconhecida como uma unidade monofilética (nó 25) sendo estes resultados congruentes com as hipóteses supracitadas.

Nó 25

Dentre os ciclídeos neotropicais as tribos *Retroculini* e *Cichlini* (*sensu* López-Fernández *et al.*, 2010) são consideradas mais relacionadas entre si do que com os demais membros da subfamília Cichlinae (Smith *et al.*, 2008; López-Fernández *et al.*, 2010). Esta relação não foi recuperada nesta análise uma vez que *Retroculus lapidifer*, *Cichla kelberi* e *Cichla intermedia* saíram numa politomia não resolvida junto aos demais ciclídeos. Apesar disso, *R. lapidifer*, *C. kelberi* e *C. intermedia* encontram-se separados dos representantes das tribos Geophagini, Astronotini, Cichlasomatini e Heroini (*sensu* López-Fernández *et al.*, 2010) fornecendo indícios de que esta hipótese pode estar em consonância com as hipóteses de Kullander (1998), Smith e colaboradores (2008) e López-Fernández e colaboradores (2010) para as quais os gêneros *Retroculus* e *Cichla* são mais relacionados entre si do que com os demais Cichlinae.

Nó 29

Na maioria das hipóteses existentes para os ciclídeos neotropicais a Tribo Geophagini é reconhecida como grupo-irmão dos Cichlasomatini + Heroini (Stiassny, 1991; Kullander, 1998; Farias *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008). López-Fernández e colaboradores (2010) apontam Geophagini como grupo-irmão de Astronotini e Cichlasomatini+Heroini. O referido autor subdivide a tribo Geophagini em seis subgrupos: mikrogeophagineos, crenicaratíneos, geophagineos, crenicichlíneos, guianacarineos e apistogramíneos. No presente estudo *Gymnogeophagus rhabdotus*, *Biotodoma cupido* e *Geophagus proximus* + *Geophagus brasiliensis* aparecem numa politomia junto com outro clado formado por outros Geophagini (crenicichlíneos e apistogramíneos), Cichlasomatini e Heroini. Smith e colaboradores (2008) e López-Fernández e colaboradores (2010) reconhecem que os gêneros *Biotodoma*, *Gymnogeophagus* e *Geophagus* são mais relacionados entre si do que com os demais Geophagini (crenicichlíneos e apistogramíneos). A alocação de *Gymnogeophagus rhabdotus*, *Biotodoma cupido* e *Geophagus proximus* + *Geophagus brasiliensis* separado dos demais Geophagini é em parte consistente com as hipóteses de Smith e colaboradores (2008) e López-Fernández e colaboradores (2010) para as quais *Biotodoma*+ geophagineos (*sensu*

Lopez-Fernandez *et al.*, 2010) são considerados mais relacionados entre si do que com Crenicichlines + Apistogramines.

Nós 26-31

Um dos maiores desafios taxonômicos e filogenéticos com relação aos ciclídeos neotropicais consiste na elucidação dos padrões evolutivos das tribos Heroini e Cichlasomatini, cujos limites ainda não estão bem definidos. Na presente análise o Heroini *Australoheros* sp. aparece como grupo irmão de uma clado formado por parte dos Geophagini (crenicichlineos e apistogramineos), demais Heroini, Astronotini e Cichlasomatini. No nó 26 *Satanoperca papaterra* está numa dicotomia junto a *Crenicichla lepidota*. As duas espécies são representantes da tribo Geophagini. Outro representante da Tribo presente na análise é *Apistogramma commbrae* que, no entanto, aparece junto a *Mesonauta festivus* um membro da tribo Heroini. Segundo López-Fernández e colaboradores (2010) *Apistogramma* é grupo irmão de *Satanoperca*. Esta relação não foi corroborada pela presente hipótese. Tais resultados devem-se muito possivelmente a quantidade de táxons utilizados na análise. Para que os padrões espermáticos dos Heroini sejam melhor elucidados faz-se necessária uma análise exaustiva não apenas nos táxons desta tribo como também nos das tribos Cichlasomatini e Geophagini.

Nó 32

Segundo Kullander (1998) a subfamília Astronotinae representada por *Astronotus* e *Chaetobranchius*, é grupo-irmão de Geophaginae (Acarichthyini + Crenicaratini e Geophagini) + Cichlasomatinae (Acaroniini e Heroini + Cichlasomatini). Smith e colaboradores (2008) tornam a subfamília Cichlinae um grupo mais inclusivo que reúne todos os ciclídeos neotropicais e o gênero *Astronotus* passa ao status de tribo agora denominada Astronotini. Para o referido autor a tribo Astronotini, de posição basal dentro da subfamília, é grupo-irmão de Chaetobranchini, Geophagini, Cichlasomatini e Heroini.

Na hipótese apresentada por López-Fernández e colaboradores (2010) a tribo Astronotini aparece numa posição mais derivada e como grupo-irmão de Cichlasomatini + Heroini. Aqui o representante da tribo Astronotini, *Astronotus ocellatus* encontra-se numa politomia não resolvida junto com *Amphilophus citrinellus*, *Amatitlania nigrofasciatus*, *Hypselecara temporalis* (Heroini) e os Cichlasomatini (*Andinoacara rivulatus* e *Cichlasoma portalegreense* + *Aequidens tetramerus*). Desta forma, a presente análise é consistente com a

hipótese de López-Fernández e colaboradores (2010) no que tange a relação de Astronotini com os Heroini e Cichlasomatini.

Nó 34

Segundo López-Fernández e colaboradores (2010) a tribo Cichlasomatini constitui uma unidade monofilética e é composta pelos cichlasomatíneos (*Krobia* + *Cichlasoma* + *Aequidens*), nannacaríneos (*Cleithracara* + *Nannacara*) e andinoacaríneos (*Andinoacara* + *Bujurquina* + *Tahuantinsuyoa*), sendo subgrupo dos cichlasomatíneos considerados como grupo-irmão de nannacaríneos + andinoacaríneos. No presente trabalho estas relações são recuperadas. *Cichlasoma portalegrense* + *Aequidens tetramerus* (Cichlasomatíneos) aparecem como grupo-irmão de *Andinoacara rivulatus* (Andinoacaríneos). Este clado é suportado por cinco sinapomorfias, sendo elas: núcleo ligeiramente excêntrico com relação ao eixo flagelar, contorno do envoltório nuclear com dupla concavidade, mitocôndria alongada, sistema vesicular ausente e dois flagelos. Mais do que uma sinapomorfia, a biflagelaridade é uma condição exclusiva dos Cichlasomatini neste universo de análise. Além disso, *Cichlasoma portalegrense* e *Aequidens tetramerus* aparecem como mais relacionados entre si do que com os demais Cichlinae corroborando as hipóteses de íntima relação entre estes táxons (Sparks, 2004; Smith *et al.*, 2008; López-Fernández *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A despeito do número de espécies analisadas no presente trabalho ser pouco representativo diante da diversidade morfológica e taxonômica encontrada na subfamília Cichlinae, a análise isolada dos dados espermáticos é pelo menos em parte consistente com as propostas atuais para a subfamília em questão, especialmente com relação à proposta de López-Fernández e colaboradores (2010). Desta forma, a espermiogênese bem como a ultraestrutura dos espermatozóides constituem uma rica fonte de informação nas análises cladísticas, desde que as hipóteses de homologias estejam bem cerceadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amanze, D. & Iyvengar, A., (1990). The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. *Development* 109: p.495-500, 1990.
- Amorim, D. S., (2002). *Fundamentos de Sistemática Filogenética*. Holos, Editora Ltda-ME. Ribeirão Preto.
- Baccetti, B., Burrini, A.G., Callaini, G., Gilbertini, G., Mazzini, M. & Zerunian, S., (1984). Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research* 10: 373-396.
- Baicere-Silva, C. M., Ferreira, K. M., Malabarba, L. R., Benine, R. C. & Quagio-Grassiotto I., (2011). Spermatic characteristics and sperm evolution on the subfamily Stevardiinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 9 (2): 377-392.
- Barlow, G. W., (1991). Mating systems in among cichlid fishes. Pp. 173–190 in Keenleyside, M. H. A. (ed.), *Cichlid fishes: Behaviour, ecology and evolution*. Chapman and Hall, London.
- Burns, J. R., Quagio-Grassiotto, I. & Jamieson, B. G. M., (2009). Ultrastructure of spermatozoa: Ostariophysi. Chapter 11. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Fish (Agnatha and Osteichthyes)*. Science Publishers, Enfield, NH, USA
- Burns, J. R., Weitzman, S. H., Lange, K. R. & Malabarba, L. R., (1998). Sperm ultrastructure in characid fishes (Teleostei, Ostariophysi). Pp. 235-244. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S. e Lucena, C. A. S., eds.). Porto Alegre: Edipucrs.
- Bremer, K., (1994). Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Cichocki, F. P., (1976). Cladistic history of cichlid fishes and reproductive strategies of the American genera *Acarichthys*, *Biotodoma* and *Geophagus*. Vol. I. Unpublished Ph.D. Dissertation, The University of Michigan. Ann Arbor.
- Don, J. & Avtalion, R. R., (1993). Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: electron microscopic analysis. *Journal of Fish Biology* 42, 1–14.
- Eccles, D. H. & Trewavas, E., (1989). Malawian cichlid fishes: The classification of some haplochromine genera. Lake Fish Movies, Herten, Germany.
- Estabrook, G. F., (1976). A mathematical foundation for the analysis of cladistic character compatibility. *Mathematical Biosciences* 29: 181-187.

- Farias, I. P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H. & Meyer, A., (1999). Mitochondrial DNA phylogeny of the family cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution* 48:703–711.
- Fishelson, L., (2003). Comparison of Testes Structure, Spermatogenesis, and Spermatocytogenesis in Young, Aging, and Hybrid. *Journal of Morphology* 256:285–300.
- Forey, P. L., Humphries, C. J., Kitching, I. L., Scotland, R. W., Siebert, D. J. & Willians, D. M., (1992). *Cladistics – a Practical Course in Systematics*. Oxford University Press, New York.
- Franzèn, Å., (1970). Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. Pp. 29-45, in: *Comparative Spermatology*, Baccetti, B. (ed.), Academic Press, New York.
- Galis, F. & Metz, J. A. J., (1998). Why are there so many cichlid species? *Trends in Ecology and Evolution* 13: 1-2.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S. & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- Goloboff, P. A., (1999). Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415-428.
- Goloboff, P. A., (1993). Estimating character weights during tree search. *Cladistics* 9: 83-91.
- Grier, H. J., Fishelson, L., (1995). Colloidal sperm packaging in mouthbrooding tilapine fishes. *Copeia* 4:966–970.
- Guha, T., Siddiqui, A. Q. & Prentis, P. F., (1988). Ultrastructure of testicular spermatozoon of the fish *Oreochromis niloticus*. In G. W. Bailey (ed.), *Proceedings of the 46th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America*. San Francisco Press, San Francisco.
- Hennig, W., (1966). *Phylogenetics systematics*. Urbana, University of Illinois Press, 263 pp.
- Hennig, W., (1968). *Elementos de una Sistemática Filogenética*. Eudeba Editorial Universitaria de Buenos Aires.
- Jamieson, B. G. M., (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Keenleyside, M. H. A., (1991). Parental care. Pp. 191–208 in Keenleyside, M. H. A. (ed), *Cichlid fishes: Behavior, ecology and evolution*, Chapman and Hall, London.
- Kocher, T. D., (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics* 5: 288-298.

- Kornfield, I. & Smith, P., 2000. African cichlid fishes: model systems for evolutionary biology. *Annual Review Ecology and Systematics* 31: 163–196.
- Kornfield, I. & Parker, A., (1997). *Molecular Systematics of a Rapidly Evolving Species Flock: The mbuna of Lake Malawi and the Search for Phylogenetic Signal*. Pp. 25-37 in Kocher, T. D. and Stepien, C. A. (eds), *Molecular Systematics of Fishes*, Academic Press, San Diego.
- Kullander, S. O., (1998). *A phylogeny and classification of the South American Cichlidae*. Pp. 461-498 in Malabarba, L., et al. (eds), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Porto Alegre.
- Kullander, S. O., (1989). *Biotoecus* Eigenmann and Kennedy: description of a new species from the Orinoco basin and revised generic diagnosis. *Journal of Natural History* 23: 225-260.
- Kullander, S. O., (1988). *Teleocichla*, a new genus of South American rheophilic cichlid fishes with six new species. *Copeia* 1: 196-230.
- Kullander, S. O., (1986). Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 431p.
- Kullander, S. O., (1983). A revision of the South American cichlid genus *Cichlasoma*. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 296p.
- Kuwamura, T., (1986). Parental care and mating systems of cichlid fishes in Lake Tanganyika: A preliminary field survey. *Journal of Ethology* 4:129–146.
- López-Fernández, H., Winemiller, K. O. & Honeycutt, R. L., (2010). Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1070–1086.
- López-Fernández, H., Honeycutt, R.L. & Winemiller, K.O., (2005a). Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 227–244.
- López-Fernández, H., Honeycutt, R.L., Stiassny, M.L.J. & Winemiller, K.O., (2005b). Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine cichlids (Perciformes: Cichlidae). *Zoologica Scripta* 34: 627– 651.
- Lou, Y-H, & Takahashi, H., (1989). The blood-testis barrier and its breakdown following immunization to testis material in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Cell Tissue Research* 258: 491-498.

- Matos, E., Batista, C. P. M. & Azevedo, C., (2002a). Ultrastructure of the spermatozoon of *Crenicara punctulatum* (Teleostei, Cichlidae) from the amazon Basin of Brazil. *Revista de Ciências Agrárias*, Belém 38: 151-160 (In Portuguese).
- Matos, E., Santos, M. N. S. & Azevedo, C., (2002b). Biflagellate spermatozoon structure of the Hermaphrodite fish *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840) (Teleostei, Cichlidae) from the Amazon River. *Brazilian Journal of Biology* 62: 847-852.
- Matos, E., Matos, P., Corral, L. & Azevedo, C., (1995). Ultrastructural study of the spermatozoon of *Crenicichla saxatilis* Linnaeus, 1758 (Pisces, Teleostei) from the Amazon region. *Brazilian Journal of Morphological Science* 12: 109-114.
- Mattei, X., (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 69: 3038-3055.
- Mattei, X., (1970). Spermiogenése des poisson. Pp. 57-72 in: *Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.). New York, Academic Press.
- McAndrew, B.J. & Majumdar, K.C., (1984). Evolutionary relationships within three tilapiine genera (Pisces: Cichlidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 8: 421-435.
- Meyer, A., 1993. Phylogenetic relationships and evolutionary processes in East African cichlid fishes. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 279-284.
- Nelson, J. S., (2006). *Fishes of the World*. New York, 4th edition, John Wiley and Sons, Incorporation, Hoboken, New Jersey.
- Nixon, K. C., (1999). The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- Nixon, K. C. & Carpenter, J.M., (1993). On Outgroups. *Cladistics*, 9:413-426.
- Oliver, M. K., (1984). Systematics of African cichlid fishes: determination of the most primitive taxon, and studies on the haplochromines of Lake Malawi. Unpublished Ph.D. dissertation, Yale University.
- Pieterse, G. M., (2006). *Histopathological changes in the testis of Oreochromis mossambicus (Cichlidae) as a biomarker of heavy metal pollution*. Philosophiae Doctor in Aquatic Health thesis, Rand Afrikaans University.
- Poe, S. & Wiens, J. J., (2000). Character selection and the methodology of morphological phylogenetics. Pp. 20-36 In: *Phylogenetic analysis of morphological data* (J. J. Wiens, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.

- Quagio-Grassiotto, I., Gameiro, M. C., Schneider, T. Malabarba, L. R. & Oliveira, C., (2003a). Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. *Neotropical Ichthyology* 1:35-45.
- Quagio-Grassiotto, I., Antoneli, F. N. & Oliveira, C., (2003b). Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Cichla intermedia* with some considerations about Labroides spermatozoa (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). *Tissue & Cell* 35: 441–446.
- Quagio-Grassiotto, I. & Oliveira, C., (2008). A new type of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Pimelodidae with a comparative review on spermatozoa ultrastructure of the Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoologischer Anzeiger* 247: 55-66.
- Reis, R., Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (Eds.) (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Santana, J. C., Baicer-Silva, C. M., Gusmão-Pompiani, P., Benine, R. C. & Quagio-Grassiotto, I., (*in press*). An assessment approach for application of spermiatic data in phylogenetic analyses: within the genus *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae). *Acta Zoologica*.
- Saperas, N., Ribes, E., Buesa, C., García-Hegart, Chiva, M., (1993). Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. *Journal of Experimental Zoology* 265: 185–194.
- Sereno, P. C., (2007). Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23 565–587.
- Silva, M. & Godinho, H. P., (1991). O espermatozóide de *Oreochromis niloticus* (Peixe, Teleosteo). *Revista Brasileira de Biologia* 51: 311-329.
- Smith W. L., Chakrabarty P. & Sparks J. S., (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24: 625–641.
- Sparks, J. S. & Smith, W. L., (2004). Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics* 20: 501-517.
- Sparks, J. S., (2004). Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 599–614.
- Stiassny, M. L. J., (1991). Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview. Pp. 1-35 in: Keenleyside, M. H. A. (ed.), *Cichlid fishes. Behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall, London.

- Stiassny, M. L. J., (1990). *Tylochromis*, relationships and the phylogenetic status of the African Cichlidae. *American Museum Novitates* 2993: 1-14.
- Stiassny, M. L. J., (1987). Cichlid familial intrarelationships and the placement of the neotropical genus *Cichla*. *Journal of Natural History*, 21: 1311-1331.
- Stiassny, M. L. J., (1982). The relationships of the neotropical genus *Cichla*: a phyletic analysis include some functional considerations. *Journal of Zoology*, London, 197: 427-453.
- Streelman, J., Danley, P.D., 2003. The stages of vertebrate evolutionary radiation. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 126–131.
- Streelman, J., Danley, P.D., (2003). The stages of vertebrate evolutionary radiation. *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 126–131.
- Wiley, E. O., Siegel-Causey, D. R., Brooks, D. R. & Funk, V. A., (1991). *The Compleat Cladist - a Primer of Phylogenetic Procedures*. The University of Kansas, Museum of Natural History, Special Publication n. 19.
- Wiley, E. O., (1981). *Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematic*. J. Wiley & Sons, New York.
- You, Y. I. and Lin, D. J., (1998). The release of veicles from the nucleus of *Tilapia nilotica* spermatid during spermiogenesis. *Acta Zoologica Sinica* 44: 257-263.
- Zihler, F., (1982) Gross morphology and configuration of digestive tracts of Cichlidae: phylogenetic and functional significance. *Netherland Journal of Zoology* 32: 544-571.