

**ESTRUTURA TESTICULAR, ESPERMIOGÊNESE E ULTRAESTRUTURA DOS
ESPERMATOZÓIDES DE REPRESENTANTES DE GÊNEROS INCERTAE SEDIS
EM CHARACIDAE (TELEOSTEI: CHARACIFORMES) E SUAS IMPLICAÇÕES
FILOGENÉTICAS**

CLARIANNA MARTINS BAICERE SILVA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista – Câmpus de Botucatu, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre junto ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de Concentração: Biologia Molecular,
Estrutural e Funcional.**

ORIENTADORA: IRANI QUAGIO GRASSIOTTO

BOTUCATU-SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTRUTURA TESTICULAR, ESPERMIOGÊNESE E ULTRAESTRUTURA DOS
ESPERMATOZÓIDES DE REPRESENTANTES DE GÊNEROS INCERTAE SEDIS
EM CHARACIDAE (TELEOSTEI: CHARACIFORMES) E SUAS IMPLICAÇÕES
FILOGENÉTICAS**

CLARIANNA MARTINS BAICERE SILVA

ORIENTADORA: IRANI QUAGIO GRASSIOTTO

CO-ORIENTADOR: RICARDO CARDOSO BENINE

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista – Câmpus de Botucatu, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre junto ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de Concentração: Biologia Molecular,
Estrutural e Funcional.**

BOTUCATU-SP

2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó que me educou, me amou e me ensinou não só com palavras, mas acima de tudo com o exemplo. A meus pais que me apoiaram de todas as formas possíveis para que eu pudesse realizar os meus sonhos.



AGRADECIMENTOS

A Deus por me abrir janelas quando as portas se fecharam e me preparar os melhores caminhos.

A minha orientadora Irani Quagio Grassiotto pela confiança, carinho, apoio, e por me ensinar tantas coisas. Depois de dois anos de convivência eu posso afirmar que eu sou sua fã! Muiiiiiiiiiito obrigado por tudo o que fez por mim!

Ao meu co-orientador Ricardo Cardoso Benine por me ensinar a gostar de peixes e pela paciência e amizade.

Aos professores Carlos Alberto Vicentini e Ricardo Macedo Corrêa e Castro pela honra de tê-los em minha banca examinadora.

Ao Professor Claudio Oliveira por permitir meu acesso a coleção.

Ao meu AMIGO Rinaldo José Ortiz pelos ensinamentos, coletas e acima de tudo por sua amizade. Obrigado do fundo do coração!

A minha família, especialmente aos meus pais Jonas e Ana pelo apoio incondicional durante toda minha vida e especialmente nesta etapa.

A meu noivo Danilo Henrique Aguiar por todo amor e força que sempre me dedicou. Aos técnicos e amigos do Centro de Microscopia Eletrônica Maria Helena, Claudete e Nivalde por me ajudarem tanto com as minhas amostras e pelas agradáveis conversas.

Ao amigão e técnico do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais de Água Doce Vicente Salvador por me ensinar tantas coisas e me aprovar no estágio viabilizando o aceite de orientação da Irani.

Aos colegas de laboratório Angélica, André, Felipe Gustavo, João Paulo, Júlio, Rafael, Renata, Rose e Talita.

Aos técnicos Renato e Ricardo pelas coletas, pelos peixes e acima de tudo pela amizade.

Ao casal mais fashion do departamento, meus cunhados e compadres, Andreo e Rachel por todo apoio, amizade e ajuda.

A Dona Tera pelos mimos, carinho e amor que oferece a todas as pessoas, além de me manter atualizada sobre as novelas que eu não podia assistir nesta fase.

A minha amiga Ludimila pelas prosas, companhia e amizade.

Aos amigos do Departamento Aline, Fernanda Carani, Sueli, Igor, Eleno, Ana Paula, Jaciara e Adriana.

A Secretária do Departamento Luciane por toda ajuda e presteza.

Aos Tardivo Barretto por me aceitar no seio da família. Muito obrigado do fundo do meu coração!

A minha amiga Jeane por toda amizade, paciência e carinho. Jamais esquecerei das coisas que fez por mim.

A todos que me ajudaram de alguma forma para que eu pudesse concluir este trabalho

RESUMO

A família Characidae apresenta doze subfamílias e um conjunto de 88 gêneros não assinalados a nenhuma subfamília e, portanto, considerados *incertae sedis* na família. Neste grupo são inúmeros os problemas taxonômicos/filogenéticos. A maior parte destes gêneros até recentemente encontrava-se alocada na subfamília Tetragonopterinae, mas dada à falta de evidências de que Tetragonopterinae constitui um grupamento monofilético, hoje, mantém-se na subfamília apenas o gênero *Tetragonopterus*. O conhecimento das relações de parentesco entre os Characidae e conseqüentemente entre os antigos Tetragonopterinae tem por base principalmente características osteológicas e de partes moles. Sabe-se que as características reprodutivas podem conter sinais filogenéticos. Aqui, estudou-se a estrutura testicular, a espermatogênese, a espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozóides de *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni*, *Astyanax fasciatus*, *Deuterodon singularis*, *Hyphessobrycon anisitsi*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon columbianus*, *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*, *Hyphessobrycon* sp., *Inpaichthys kerri*, *Oligosarcus paranensis*, *Pristella maxillaris*, *Bryconella pallidifrons*, *Paracheiroduon axelrodi*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Gymnocorymbus* sp.n., *Moenkhausia oligolepis*, *Moenkhausia bonita*, *Moenkhausia dichroua*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Creagrutus* sp. e *Piabina Anhembi*. A partir deste estudo gerou-se uma lista de caracteres a fim de padronizar as descrições numa análise sistematizada. A ultraestrutura dos espermatozóides das espécies analisadas é muito diversificada e reflete a complexidade do grupo conforme já apontado por diferentes autores. O espermatozóide de *Tetragonopterus argenteus*, com exceção de *Gymnocorymbus ternetzi*, *Gymnocorymbus* sp.n. e *Bryconamericus exodon*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Creagrutus* sp. e *Piabina Anhembi*, assemelha-se, em linhas gerais, aos espermatozóides de todos os demais táxons analisados. Os táxons relacionados à *T. argenteus* podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com as características da peça intermediária. O primeiro grupo, mais homogêneo e o segundo, mais heterogêneo, na dependência do tipo, quantidade e distribuição das vesículas presentes na peça intermediária. O segundo grupo como um todo parece estar mais relacionado com *Tetragonopterus argenteus* do que as espécies contidas no primeiro grupo. Os espermatozóides de *B. stramineus*, *B. exodon*, *Boehlkea fredcochui*, *Creagrutus* sp., *Piabina anhembi* e *Markiana nigripinnis* são muito semelhantes indicando que estes táxons podem constituir um grupo mais relacionado entre si do que com os demais gêneros *incertae sedis* em Characidae. A ultraestrutura dos espermatozóides constitui-se indiscutivelmente numa nova ferramenta auxiliar na compreensão das relações entre gêneros pertencentes a uma mesma

família e a compreensão da ontogênese é imprescindível para o correto entendimento da estrutura final das células espermáticas.

ABSTRACT

The family Characidae comprehends twelve subfamilies and a set of 88 genera not included in any subfamily and, thus, considered as *incertae sedis* in the family. Within this group are many taxonomic/phylogenetic problems. Most of these genera, until recently, belonged to the subfamily Tetragonopterinae, but given the lack of evidences supporting its monophyly, only *Tetragonopterus*, its type genus, is currently assigned to this subfamily. The knowledge of the phylogenetic relationships between Characidae and former Tetragonopterinae genera are based mainly on osteological features and soft parts. It is known that the reproductive traits may contain phylogenetic information. This study describes the structure, spermatogenesis, the espermiogênese and ultraestrutura the sperm of *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni*, *Astyanax fasciatus*, *Deuterodon singularis*, *Hyphessobrycon anisitsi*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon columbianus*, *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*, *Hyphessobrycon* sp., *Inpaichthys kerri*, *Oligosarcus paranensis*, *Pristella maxillaris*, *Bryconella pallidifrons*, *Paracheirodon axelrodi*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Gymnocorymbus* sp.n., *Moenkhausia oligolepis*, *Moenkhausia bonita*, *Moenkhausia dichroua*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Creagrutus* sp. and *Piabina anhemi*. With the raised data, a list of characters was provided in order to standardize the descriptions in a systematic analysis. The sperm ultrastructure of the examined species is very diverse and reflects the complexity of the group, as already pointed out by different authors. The sperm of *Tetragonopterus argenteus* resembles, in general, to the sperm of all other examined taxa, except for *Gymnocorymbus ternetzi*, *Gymnocorymbus* sp.n. and *Bryconamericus exodon*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Creagrutus* sp. and *Piabina anhemi*. The taxa putatively related to *T. argenteus* can be divided into two subgroups according to the characteristics of the intermediate piece. The first group is more homogeneous and the second one is more heterogeneous, depending on the type, quantity and distribution of vesicles in the intermediate piece. The second group as a whole appears to be more related to *Tetragonopterus argenteus* than the species contained in the first group. The sperm of *B. stramineus*, *B. exodon*, *Boehlkea fredcochui*, *Creagrutus* sp., *Piabina anhemi* and *Markiana nigripinnis* are very similar indicating that these taxa may be more related to each other than with other genera *incertae sedis* in Characidae. The sperm ultrastructure undoubtedly constitutes a new tool to assist in the understanding of phylogenetic relationships among genera belonging to the same family and understanding of the ontogeny is essential for the correct understanding of the final structure of sperm cells.

SUMÁRIO

Introdução	1
Os peixes neotropicais de água doce	2
A Ordem Characiformes	2
A família Characidae	3
A Subfamília Tetragonopterinae	4
Gêneros <i>Incertae Sedis</i> em Characidae	4
Gênero <i>Hyphessobrycon</i>	5
Gênero <i>Astyanax</i>	6
Gênero <i>Moenkhausia</i>	6
Gênero <i>Oligosarcus</i>	8
Gênero <i>Bryconamericus</i>	9
Gênero <i>Gymnocorymbus</i>	9
Gênero <i>Piabina</i>	10
Gênero <i>Markiana</i>	10
Gêneros <i>Boehlkea</i> , <i>Bryconella</i> e <i>Inpaichthys</i>	11
Os caracteres reprodutivos masculinos	11
O aparelho reprodutor masculino	14
A espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozoides nas espécies de fertilização externa.....	16
O conhecimento sobre os espermatozoides dos Characiformes	20
A ultraestrutura dos espermatozoides nos gêneros <i>incertae sedis</i> em Characidae	21
Objetivos	23
Materiais e métodos	25
Resultados	32
Estrutura testicular e espermatogênese	33
Espermiogênese	34
Espermatozoides.....	35
Documentação fotográfica	
Discussão	92
Conclusões	104
Referências Bibliográficas	108

Introdução



Os peixes neotropicais de água doce

Conforme Reis *et al.* (2003), a ictiofauna de águas continentais centro e sul-americanas, com 4.475 espécies válidas, é dominada, tanto em termos de diversidade taxonômica quanto em biomassa, por peixes da superordem Ostariophysi, série Otophysi, divididas entre as ordens Siluriformes (15 famílias), Characiformes (14 famílias) e Gymnotiformes (cinco famílias); as espécies restantes dividem-se entre as ordens Perciformes - família Cichlidae e Cyprinodontiformes, ambas da superordem Acanthopterygii, e ainda todo um conjunto formado por vários grupos taxonômicos (Potamotrygonidae, Lepidosirenidae, Osteoglossidae, Engraulidae, Clupeidae, Synbranchidae, Sciaenidae, Gobiidae, Nandidae, Belonidae, Tetraodontidae, etc.).

Os estudos sistemáticos dos peixes neotropicais com base em dados morfológicos têm se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em MALABARBA *et al.*, 1998), principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados. Entre estas técnicas está o uso da metodologia de análise filogenética, proposta inicialmente por Hennig (1966) e implementado por diversos autores. Apesar dos notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a filogenia dos diversos grupos, devido à imensa magnitude da biodiversidade neotropical.

A Ordem Characiformes

A Ordem Characiformes, com 14 famílias e aproximadamente 33% das 4.475 espécies de peixes descritas da Região Neotropical, divide a dominância da ictiofauna de águas continentais centro e sul-americanas com representantes da ordem Siluriformes. São conhecidos popularmente em nosso país como traíras, pirapucus, peixes-borboleta, cruzeiros-do-sul, saúnas, canivetes, curimatás, jaraquis, branquinhas, saguirus, piavas, aracus, dourados, lambaris, piabas, pacus, tambaquis, piranhas, etc; e seu porte varia desde pequeno, com até 15 cm de comprimento, até de médio a grande, entre 20 e 100 cm de comprimento (CASTRO, R. M. C., *comunicação pessoal*). Apesar das famílias Distichodontidae, Citharinidae, Alestidae e Hepsetidae ocorrerem na Região Etiópica (maior parte da África e sul da Península Arábica), é na Região Neotropical que os Characiformes possuem maior importância ecológica e econômica (ver NELSON, 2006). Em termos de diversidade taxonômica, de acordo com Reis *et al.* (2003), existem ainda 515 espécies de Characiformes já conhecidas, porém ainda não descritas.

A Ordem Characiformes foi proposta por Günther em 1864 e reúne peixes que se caracterizam por apresentar dentes geralmente bem desenvolvidos (são na maioria carnívoros); nadadeira adiposa frequentemente presente; nadadeira pélvica presente (5-12 raios); nadadeira

anal curta a moderadamente longa (menos que 45 raios); corpo quase sempre com escamas (exceto por *Gymnocharacinus bergii*, que possui escamas praticamente ausentes nos adultos e não apresenta nadadeiras adiposas); escamas ctenóides ou similares a esta em alguns; linha lateral geralmente curvada, algumas vezes incompleta; maxila superior freqüentemente não verdadeiramente protrátil; dentes faríngeanos freqüentemente presente, mas geralmente não especializado como nos Cypriniformes (os anostomídeos possuem dente faríngeano altamente modificado); barbilhões ausentes; 3-5 raios branquiostégios; freqüentemente três pós-cleitros; primeiro hipural separado do centro por uma fenda nos adultos (NELSON, 2006).

Dentro de Characiformes, os maiores problemas taxonômicos/filogenéticos ocorrem em grupos de porte pequeno, com menos de 15 cm de comprimento padrão e primariamente pertencentes à família Characidae, grupo dominante na ordem em termos de diversidade taxonômica (CASTRO, R. M. C., *comunicação pessoal*). Embora exista um esforço contínuo dos pesquisadores para tentar resolver tais problemas, as relações entre os táxons parece estar longe de ser resolvida (ver MIRANDE, 2007; BENINE, 2004; CALCAGNOTTO, 2004; LUCENA, 1993; MOREIRA, 2002, 2007; ZANATA, 2000;).

A família Characidae

A composição da família Characidae tem variado significativamente ao longo do estudo dos Characiformes (VARI, 1998) e seus limites filogenéticos estão longe de estarem estabelecidos. O conceito de Characidae contido em Reis (2003) reflete a deficiência do estado atual de entendimento taxonômico/filogenético da família. De acordo com tal conceito, os Characidae - conhecidos popularmente em nosso país como dourados, lambaris, piabas, peixes-cachorro, sardinhas, matrinhãs, piraputangas, pacus, tambaquis, piranhas, entre outros, compõem a maior parte da diversidade taxonômica de Characiformes e uma parte significativa da ictiofauna neotropical. Com 12 subfamílias, 167 gêneros e 980 espécies válidas reconhecidas, a família Characidae equivale a, pelo menos, 65% das 1.460 espécies válidas da ordem Characiformes e aproximadamente 21% das espécies efetivamente descritas da ictiofauna neotropical (CASTRO, R. M. C. *comunicação pessoal*). Dessas espécies, aproximadamente 96% foram agrupadas pelos autores em gêneros *Incertae Sedis* em Characidae.

Com base em Reis *et al.* (2003), aproximadamente 86% das espécies válidas de Characidae são de porte pequeno, com menos de 15 cm de comprimento padrão quando adultas. O entendimento das inter-relações filogenéticas dos táxons atualmente reconhecidos como válidos em Characidae (*sensu* REIS *et al.*, 2003) constitui um dos maiores desafios taxonômico/filogenéticos atuais da ictiologia neotropical.

A Subfamília Tetragonopterinae

A maior parte dos gêneros, atualmente listados como *incertae sedis*, pertenciam a Subfamília Tetragonopterinae. Considerada por Nelson (1994) como um grupo particularmente diversificado atualmente esta subfamília é constituída exclusivamente pelo gênero *Tetragonopterus* com apenas duas espécies: *T. argenteus* e *T. chalceus* (REIS, 2003). Os demais gêneros foram listados por Lima *et al.* (2003) como *incertae sedis* devido à falta de evidências que comprovassem a monofilia do grupo (NELSON, 2006) e para enfatizar que suas relações de parentesco são pouco conhecidas (REIS, 2003).

Gêneros *Incertae Sedis* em Characidae

Os gêneros *incertae sedis* em Characidae constituem um imenso e heterogêneo conjunto de peixes, predominantemente pequenos, abundantes nos rios e em outros habitats aquáticos da região neotropical (NELSON, 2006). Este grupo abriga 620 espécies, distribuídas em 88 gêneros, no qual 64% das espécies estão alocadas em gêneros especiosos e possivelmente não monofiléticos como *Hyphessobrycon* (97 espécies), *Astyanax* (86 espécies), *Moenkhausia* (58 espécies), *Bryconamericus* (51 espécies), *Creagrutus* (64 espécies) ou *Hemigrammus* (43 espécies). Em contrapartida, 53% dos gêneros são monotípicos (*e.g.* *Engraulissoma*, *Exodon*, *Gymnocharacinus*, *Lignobrycon*) e 26% contém duas ou três espécies, *Gymnocorymbus* (3 espécies), *Paracheirodon* (3 espécies), *Rachoviscus* (2 espécies), *Salminus* (2 espécies), dentre outros (LIMA *et al.* 2003). No entanto, um grande número de novas espécies tem sido descrito atualmente. Este número tende a aumentar ainda mais à medida que novos estudos, sobre a complexidade e descrições da diversidade do grupo, vêm sendo realizados.

Os peixes deste grupo são muito apreciados pelos aquaristas por exibirem um padrão de colorido geralmente exuberante e porte pequeno como *Gymnocorymbus*, *Hyphessobrycon*, *Paracheirodon*, *Thayeria*, entre outros. Com o domínio das técnicas de reprodução em cativeiro, o aquarismo se tornou uma atividade consolidada (GÉRY, 1961) economicamente importante e que tem contribuído significativamente para o avanço do conhecimento científico dessas espécies. No entanto, o mercado clandestino e coletas ilegais podem influenciar negativamente esse cenário, reduzindo os estoques e principalmente a diversidade desses peixes.

Gênero *Hyphessobrycon*

O gênero *Hyphessobrycon* é o mais especioso em Characidae, com mais de 100 espécies descritas. Segundo Géry (1977), o grupo estaria relacionado com *Hemigrammus*, possui uma natureza complexa e, provavelmente, não é monofilético. O gênero *Hyphessobrycon* caracteriza-se, essencialmente, pela presença de 2 fileiras de dentes no pré-maxilar com cinco dentes na

fileira interna, linha lateral incompleta, nadadeira caudal sem escamas e nadadeira adiposa presente. Géry (1977) subdividiu o gênero em seis grupos artificiais: espécies sem marcas negras no corpo (*H. panamensis*); espécies com uma ou duas manchas umerais (*H. flammeus*); espécies com manchas na nadadeira caudal (*H. minimus*); espécies com mancha umeral e caudal (*H. tropis*); espécies com manchas negras na nadadeira dorsal (*H. callistus* – tetras verdadeiros) e espécies com contorno longitudinal (banda), frequentemente unindo a mancha umeral à caudal. Este último grupo se subdivide em “grupo-agulha”, com uma banda não muito escura e muito larga, e “grupo-heterorhabdus” no qual a banda é intensa e relativamente estreita.

Neste gênero, um grupo de grande interesse para aquaristas por apresentarem coloração rósea exuberante e nadadeiras anal e dorsal alongadas é o chamado “rosy-tetras”. A maioria destas espécies fazia parte do “grupo-callistus” (*sensu* GÉRY, 1977). Weitzman e Palmer (1997) restringiram os “rosy tetras” a um grupo com 26 espécies de *Hyphessobrycon* e 1 espécie de *Cheirodon* – *Cheirodon troemneri*. No mesmo estudo os autores sugerem que *Hemigrammus unilinetus*, *Pristella maxillaris*, *Hyphessobrycon hasemani*, *Hy. pulchripinnis*, *Hy. amandae*, *Moenkhausia pittieri* e *M. hemigramoides* estão relacionados aos “rosy tetras”, como grupo-externo ou integrando o grupo. Para Benine e Lopes (2007), *Hemigrammus taphorni* pode estar relacionado com o grupo. Trabalhos de revisão sobre o gênero *Hyphessobrycon* e os demais gêneros *incertae sedis* em Characidae são escassos e fundamentais visto que natureza dos gêneros é problemática.

Gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* é um dos mais especiosos da ordem Characiformes, com 86 espécies descritas (NELSON, 2006). Atualmente o gênero é composto por 101 espécies (VARI E CASTRO, 2007) e este número tende a aumentar. Sabe-se, por exemplo, que *A. scabripinnis* não se restringe a uma espécie e à medida que este táxon é revisado, novas espécies são descritas. Recentemente Abilhoa e Duboc (2007) descreveram *A. varzeae*, mais uma espécie que faz parte do complexo *A. scabripinnis*.

O gênero *Astyanax* segundo Eigenmann (1921, 1927), é caracterizado por possuir duas fileiras de dentes multicuspidados na pré-maxila, com a fileira pré-maxilar interna consistindo de cinco dentes, uma linha lateral completa e nadadeira caudal não coberta por escamas. A remoção de várias espécies para outros gêneros que entraram ou entrariam na classificação tradicional de *Astyanax* exemplifica bem a natureza problemática do gênero (VARI E CASTRO, 2007).

O reconhecimento das espécies deste gênero vem sofrendo várias alterações (REIS ET AL., 2003). Por exemplo, *A. jordani* do México (originalmente descrito em *Anoptichthys*), e

freqüentemente tratado como um sinônimo de *A. mexicanus*, agora é reconhecido como válido. Há algum tempo acreditava-se que *A. fasciatus*, descrito no Brasil, pudesse ocorrer até o norte do México, mas sua distribuição foi redefinida e a espécie que ocorre no México foi reconhecida como *A. aeneus* (NELSON, 2006).

Novos estudos podem no futuro alterar ainda mais o conhecimento das espécies do gênero e sua distribuição (NELSON, 2006).

Gênero *Moenkhausia*

O gênero *Moenkhausia* é composto, atualmente, por 64 espécies amplamente distribuídas nas bacias hidrográficas da América do Sul, especialmente na Amazônia e Guiana (GÉRY, 1977; LIMA *et al.*, 2003 E LUCINDA *et al.* 2007). Este grupo caracteriza-se pela presença de cinco dentes multicuspidados na série interna da pré-maxila, pequenas escamas recobrando a base das nadadeiras anal e caudal e uma sutil curvatura ventral da linha lateral (EIGENMANN, 1903). Géry (1977) divide o gênero em três sub-grupos artificiais de acordo com a forma do corpo e escamação acima e abaixo da linha lateral: complexo *M. lepidura*, complexo *M. chrysargyrea*, e complexo *M. grandisquamis*. O complexo *M. lepidura* agrupa espécies de pequeno porte com altura do corpo geralmente superior a 2,75 cm como *M. dichroua* e *M. intermédia*. O complexo *M. chrysargyrea* abriga espécies com sete ou mais escamas acima da linha lateral e cinco ou mais escamas abaixo, geralmente maiores e com corpo alto como *M. pittieri* e *M. chrysargyrea*. O complexo *M. grandisquamis* abriga espécies de porte algo maior e corpo alto como *M. oligolepis*, *M. sanctafilomenae* e *M. grandisquamis*. Numa análise filogenética do gênero em questão, Benine (2004) verificou que *Moenkhausia* é um grupo não monofilético e os três sub-grupos propostos por Géry (1977) parecem não constituir unidades naturais. Segundo Benine (2004), *Moenkhausia levidorsa* está mais relacionada a outros gêneros (*Ctenobrycon*, *Gymnocorymbus*, *Poptella*, *Sthiconodon* e *Tetragonopterus*) do que com a espécie tipo *M. xinguensis* (fig. 01). Neste trabalho o autor salienta que nem todas as espécies nominais de *Moenkhausia* puderam ser incluídas na análise. Conseqüentemente, decisões que alterem o status dos táxons devem ser consideradas com muita cautela, até que um número maior de espécies seja investigado com o propósito de estabelecer com maior segurança a situação taxonômica das espécies.

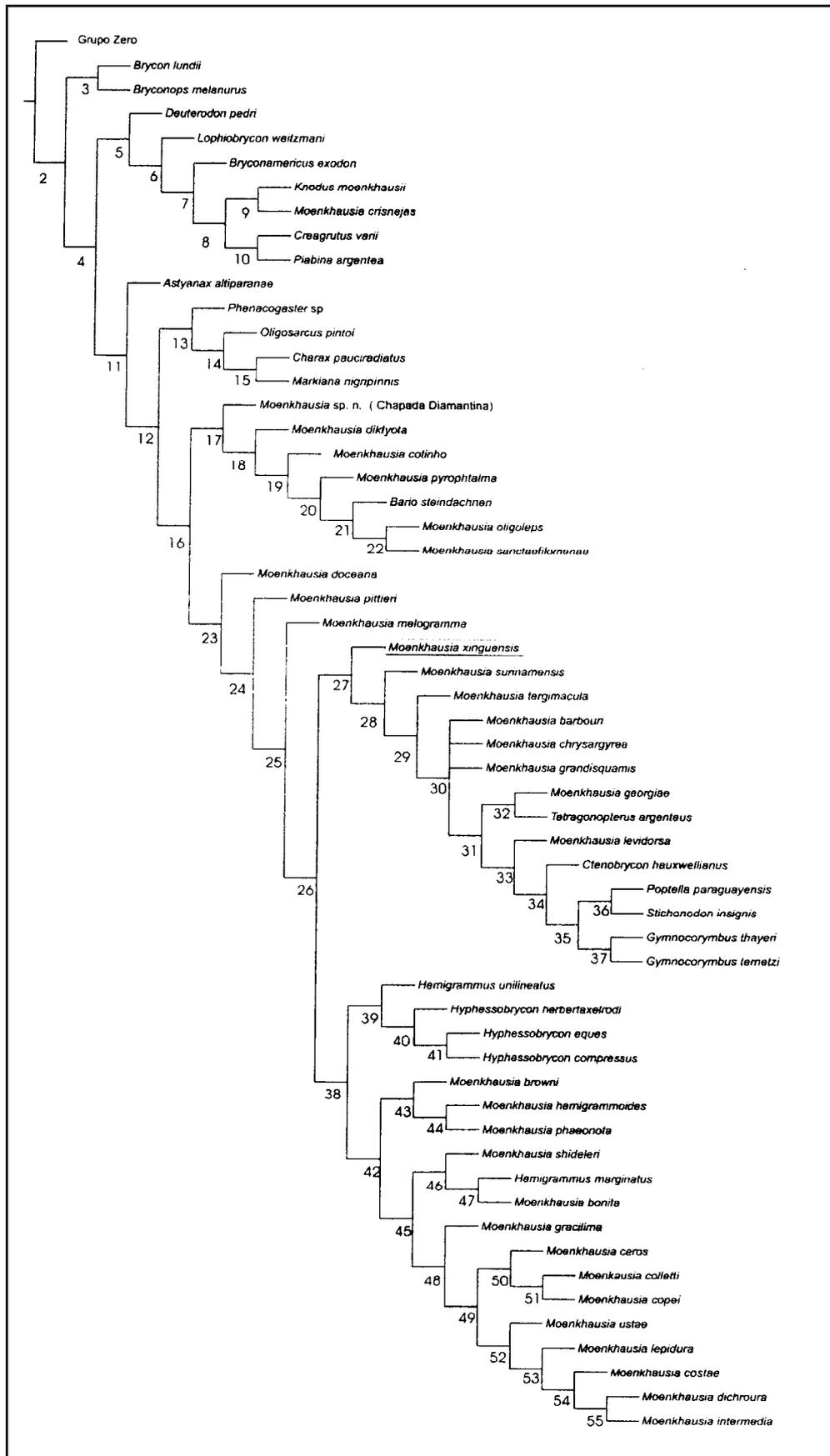


Figura 01-Cladograma expressando as relações entre *Moenkhausia* e representantes de alguns gêneros *incertae sedis* em Characidae, segundo Benine (2004).

Gênero *Oligosarcus*

O gênero *Oligosarcus* abriga atualmente 15 espécies, distribuídas do centro ao sudeste da América do Sul (LIMA *et. al.*, 2003). Segundo Menezes (1988) este gênero caracteriza-se principalmente por possuir dentes tricúspides ou levemente tricúspides no osso ectopterigóide. O gênero *Oligosarcus* constitui uma unidade monofilética e está relacionado com outros Tetragonopteríneos (*sensu* GÉRY) como *Tetragonopterus*, *Astyanax* e *Bryconops* (RIBEIRO, 2007).

Gênero *Bryconamericus*

O gênero *Bryconamericus* é composto, até o momento, por pelo menos 51 espécies amplamente distribuídas na América Central e do Sul (LIMA *et al.*, 2003). Segundo Eigenmann (1927) o gênero caracteriza-se por apresentar linha lateral completa; nadadeira caudal nua; segundo sub-orbital expandido e em contato com a borda inferior do pré-opérculo, não deixando o triângulo descoberto abaixo da sutura entre o primeiro e o segundo sub-orbital; duas fileiras de dentes no pré-maxilar, nenhum a seis dentes na maxila e uma fileira na mandíbula. Segundo Géry (1977) este gênero pode ser dividido em dois grupos artificiais de acordo com a relação entre comprimento da nadadeira anal e número de escamas transversas. O grupo *B. diaphanus* possui um total de 15-25 raios na nadadeira anal e 4-6 escamas transversas acima da linha lateral. O grupo *B. peruanus* possui um número maior de raios na nadadeira anal (frequentemente 25-43) e 6-9 escamas transversas acima da linha lateral. Segundo Serra e Langeani (2006) *Bryconamericus* apresenta uma série de caracteres amplamente distribuídos em Characidae, o que leva à inexistência de uma definição clara para o gênero e contribui para o agrupamento de um grande número de espécies para as quais não existe nenhuma hipótese de monofiletismo. No mesmo estudo os autores discutem o compartilhamento de alguns caracteres que corroboram a hipótese de relacionamento filogenético do gênero dentro de Characidae, bem como sugerem um subgrupo de *Bryconamericus* potencialmente monofilético representado por *B. exodon*, *B. stramineus* e *B. turiuba*.

Gênero *Gymnocorymbus*

O gênero *Gymnocorymbus* compreende três espécies distribuídas na Bacia Amazônica e do Paraguai e conhecidas popularmente como “black tetras” ou tetra negro (LIMA *et al.*, 2003). Segundo Géry (1977), é um dos grupos mais conhecidos pelos aquaristas e representaria uma adaptação de alguma espécie de *Moenkhausia* de corpo baixo para um corpo alto e discóide, acompanhada pela ausência de escamas na linha pré-dorsal. Benine (2004) verificou que *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus thayeri* são mais relacionados entre si e poderiam

estar relacionados com *Stichonodon*, *Poptella*, algumas *Moenkhausia* (*M. levidorsa*) e *Tetragonopterus*.

Gênero *Piabina*

O gênero *Piabina* é representado apenas por *P. argentea* e *P. anhembi* e caracteriza-se por possuir três fileiras de dentes na maxila superior, focinho obtuso, maxila pequena e mandíbula incluída (GÉRY, 1977). Segundo Vari e Harold (2001) *Piabina* estaria estreitamente relacionada com *Creagrutus*, aparecendo como grupo-irmão de todos os táxons no clado A (fig. 02).

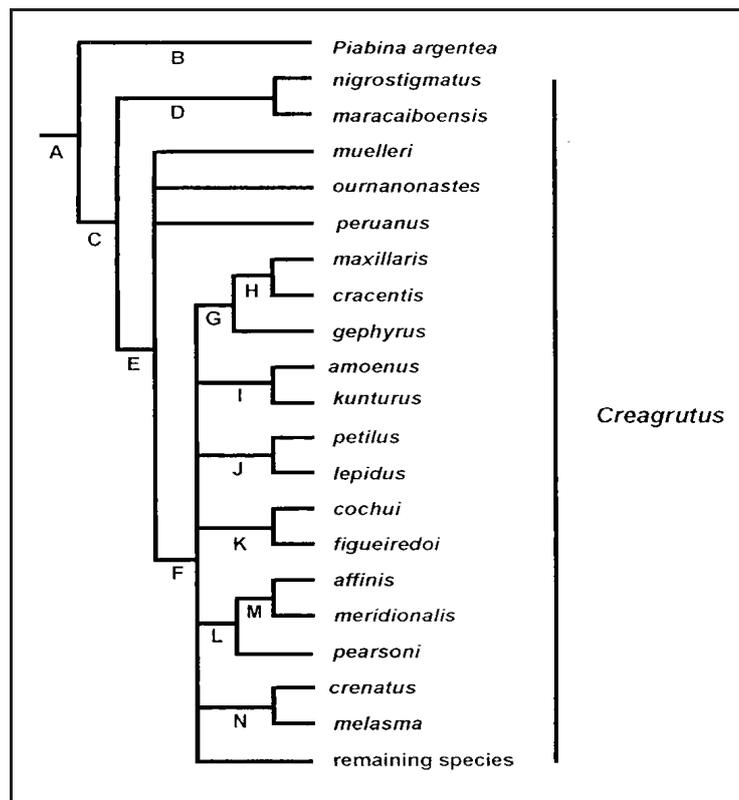


Figura 02-Cladograma expressando as relações entre *Piabina* e *Creagrutus*, segundo Vari e Harold (2001).

Gênero *Markiana*

O gênero *Markiana* é constituído por duas espécies *M. geayi* e *M. nigripinnis*. Segundo Géry (1977), *Markiana* parece estar relacionada com *Moenkhausia*, hipótese não confirmada por Benine (2004). Para este último autor *Markiana nigripinnis* parece estar mais relacionada com *Charax pauciradiatus*, *Oligosarcus pintoii* e *Astyanax altiparanae*. Embora o estudo de Benine (2004) não tenha utilizado todas as espécies nominiais de *Moenkhausia* para análise, considerou muitos caracteres de diversas espécies, especialmente de *M. xinguensis*.

Gêneros *Boehlkea*, *Bryconella* e *Inpaichthys*

Estes gêneros abrigam poucas espécies e suas relações de parentesco com os demais characídeos ainda não estão bem estabelecidas. Géry e Junk (1977) sugerem que *Inpaichthys kerri* compartilha algumas características com os demais characídeos listados como *incertae sedis*, como *Hemigrammus*, *Bryconella palidifrons* e *Hyphessobrycon melanopleurus*, porém a combinação das suas características morfológicas a torna única, daí sua alocação um gênero monotípico. O mesmo acontece com *Boehlkea fredcochui* e *Bryconella pallidifrons* (GÉRY, 1977).

Dada à complexidade do grupo, Malabarba e colaboradores (1998) enfatizam a necessidade de se utilizar novos caracteres, além dos caracteres tradicionais, nas análises filogenéticas. Características como padrão de colorido, análise molecular, mecanismos de natação, presença de características derivadas do mecanismo especial de alimentação e associadas com a miniaturização e o sistema sexual, podem auxiliar no entendimento das inter-relações em Characidae.

Os caracteres reprodutivos masculinos

Embora o conhecimento atual sobre o padrão de relacionamento entre os Characiformes tenha sido inferido com base em caracteres morfológicos, outros dados parecem ser potencialmente úteis no estudo do grupo. Várias das características reprodutivas das espécies podem conter traços filogenéticos. Características sexuais secundárias como ganchos nos raios das nadadeiras anal, dorsal e pélvica (MALABARBA E WEITZMAN, 2003), estrutura glandular na nadadeira anal (WEITZMAN *et. al*, 2005) e glândulas branquiais em characídeos (AZEVEDO, 2004; OLIVEIRA, 2007), parecem estar surgindo como novas ferramentas nas análises filogenéticas. Atualmente algumas hipóteses de relacionamento em Characiformes são sustentadas por estas características. Os ganchos nos raios das nadadeiras anal, dorsal e pélvica, bem como outras características, sustentam a hipótese de Malabarba e Weitzman, (2003). Os autores restringiram suas análises as famílias Gasteropelecidae e Characidae e a Subfamília Roestinae. Neste estudo os gêneros *incertae sedis* em Characidae foram divididos em dois grupos. O clado A constituído pela subfamília Glandulocaudinae, pelos gêneros *Monotocheiroduon*, *Odontostoechus* e *Othonocheiroduus* e parte dos gêneros *incertae sedis*, como *Bryconamericus*, *Boehlkea*, *Bryconacidnus*, *Creagrutus*, *Piabina*, dentre outros. Os demais gêneros permaneceram juntos a subfamília Tetragonopterinae constituindo o segundo grupo (fig. 03).

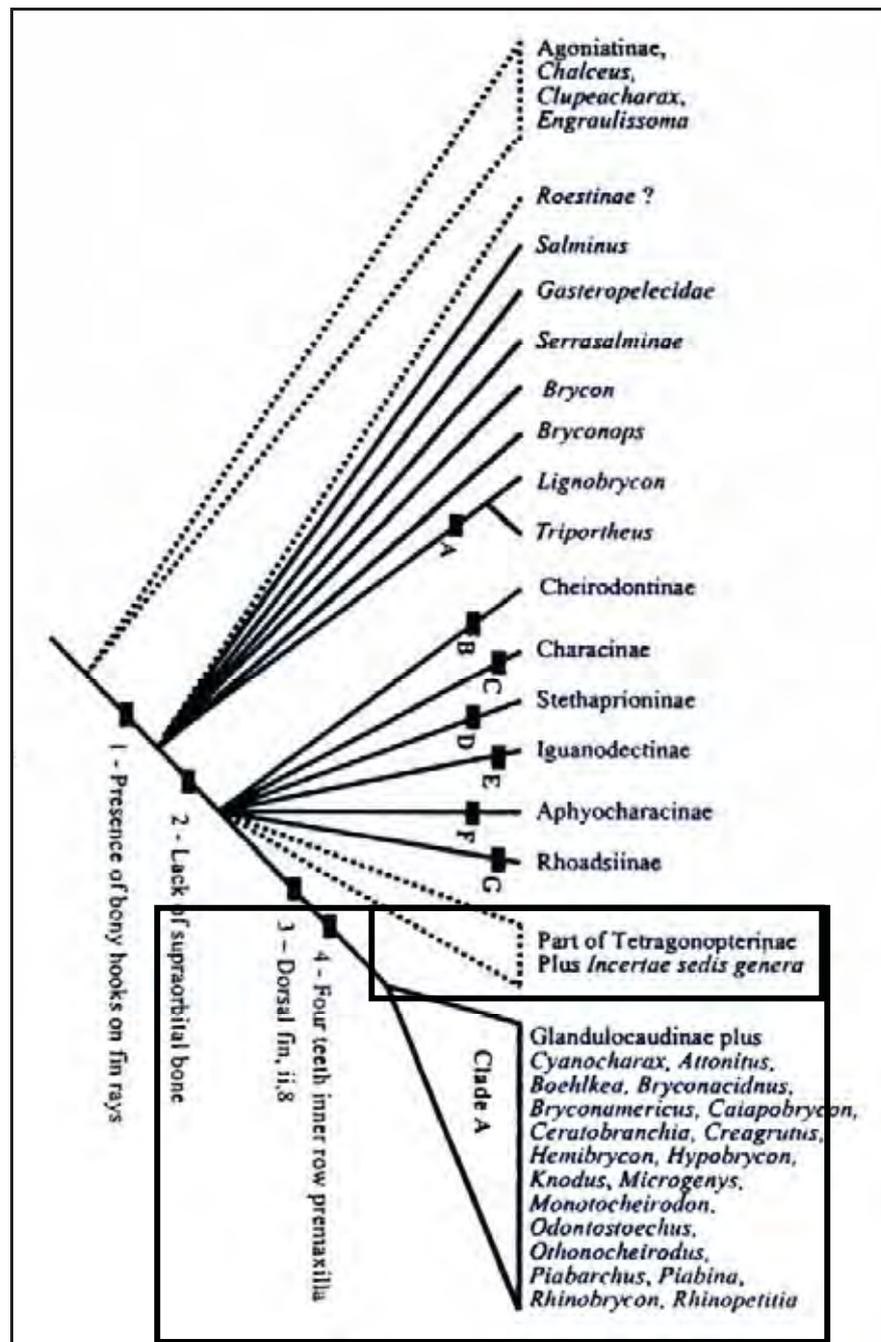


Figura 03-Cladograma expressando as relações entre as famílias Gasteropelecidae e Characidae e a subfamília Roestinae – família Cynodontidae, segundo Malabarba e Weitzman, (2003).

A presença de uma estrutura glandular na nadadeira anal é uma das características que sustentam a hipótese de Weitzman *et. al* (2005). Neste estudo os autores limitaram a subfamília Glandulocaudinae apenas a Tribo Glandulocaudini e as Tribos Corynopomini e Diapomini, anteriormente alocadas em Glandulocadinae, passaram a integrar a Subfamília Stevardiinae (fig. 04).

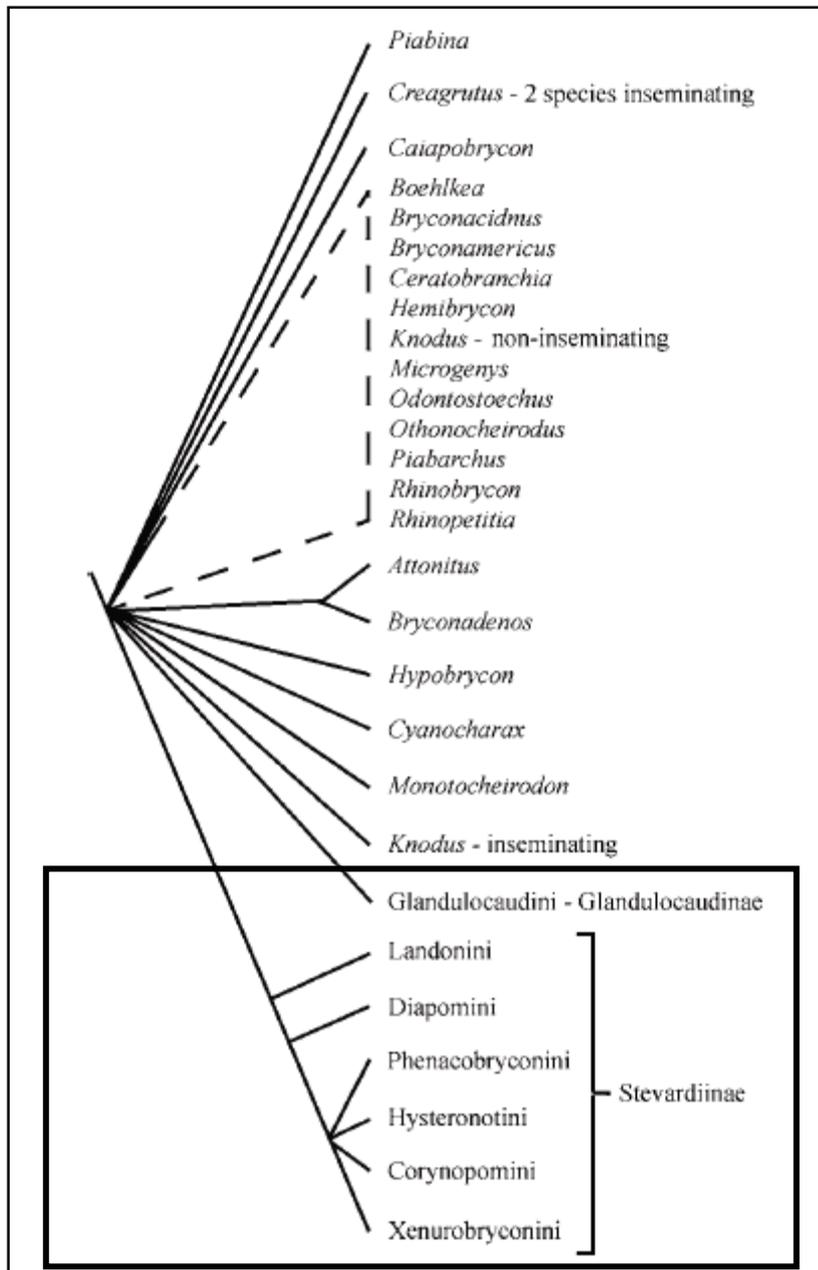


Figura 04 -Cladograma expressando as relações entre as subfamílias Glandulocaudinae e Stewardiinae, segundo Weitzman *et. al.*, (2005).

A estrutura gonadal dos Teleostei, por exemplo, mostra diferenças marcantes entre os grupos mais basais e os grupos mais derivados, os Neoteleostei (PARENTI E GRIER, 2004). A espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozóides revela uma característica altamente conservada nas famílias (GUSMÃO-POMPIANI, 2003; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA 2007) e subfamílias, cujas relações entre seus membros estejam bem estabelecidas (GUSMÃO-POMPIANI, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA 2007).

O aparelho reprodutor masculino

Nos Teleostei, a organização do compartimento germinativo no interior dos testículos - em lóbulos ou em túbulos - também encerra informações de caráter filogenético (PARENTI E GRIER, 2004). Os conceitos morfológicos contidos nos termos “lóbulo” e “túbulo” têm por base o formato e a maneira como o compartimento germinativo termina na periferia do testículo (GRIER, 1993).

Nos testículos lobulares, o compartimento germinativo termina em fundo cego e com formato de dedos voltados para baixo. Pode sofrer anastomoses, porém apenas na região do ducto principal. Esse tipo de organização testicular é encontrado nos Teleostei mais derivados, Percomorpha e Atherinomorpha. Nos testículos tubulares, o compartimento germinativo termina em forma de alças na periferia do testículo. Nos Teleostei mais basais, os túbulos sofrem anastomoses em diferentes alturas do órgão, principalmente na região do ducto espermático. Esse último tipo de organização testicular é denominado de tubular anastomosado (GRIER, 1993) (fig. 05).

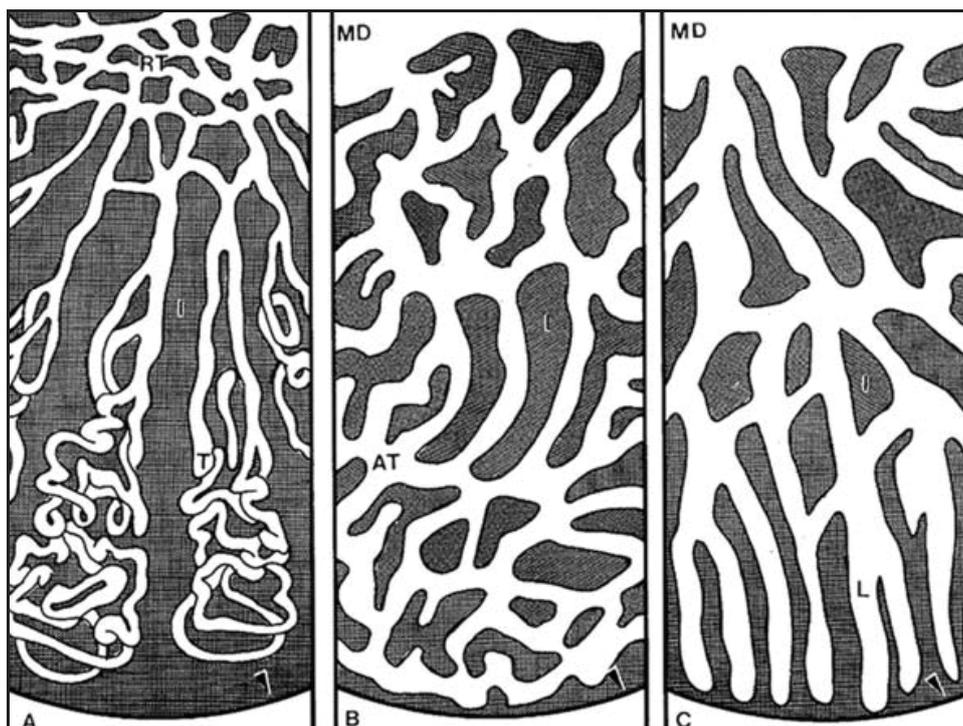


Figura 05- Representação esquemática da estrutura testicular de acordo com a organização do compartimento germinativo na periferia do testículo, segundo Grier (1993). **A:** Tubular **B:** Tubular anastomosado **C:** Lobular

Já a classificação dos testículos conforme a distribuição das espermatogônias é válida somente para os testículos lobulares (GRIER, 1981; 1992). Esses podem conter espermatogônias confinadas apenas na porção distal dos lóbulos, e serem restritos, ou

apresentarem as espermatogônias distribuídas ao longo de todo o lóbulo, e serem irrestritos (GRIER, 1992). Os testículos lobulares restritos são típicos dos Atherinomorpha, enquanto que os irrestritos são encontrados nos Percomorpha (GRIER, 1993).

Parenti e Grier (2004) num levantamento recentemente concluído sobre a estrutura testicular nos Teleostei, contabilizando 136 descrições, confirmam esses dados. Nesse banco, surpreendentemente, os Ostariophysii (superordem à qual pertencem os Characiformes) com 75% das espécies de peixes de água doce do mundo (FINK E FINK, 1981), representam apenas 5,8% das 136 descrições existentes.

A espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozóides nas espécies de fertilização externa.

A espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozóides têm sido estudadas em vários grupos de peixes (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1970; 1988; 1991) e a utilidade deste tipo de dado na identificação do padrão de relacionamento, particularmente entre famílias, tem sido amplamente reconhecido.

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 nuclear em relação ao flagelo que caracteriza dois tipos de espermiogênese, tipo I e II, respectivamente. Na espermiogênese do Tipo I (fig. 06), a espermatíde jovem apresenta núcleo central, mitocôndrias esparsas pelo citoplasma, e os centríolos em posição lateral, ancorado à membrana plasmática. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar (constituído pelos centríolos proximal e distal) migra em direção ao núcleo, e no movimento traz consigo a membrana e o segmento inicial do flagelo que se invaginam. Forma-se assim um canal delimitado pela membrana plasmática, o canal citoplasmático, no interior do qual aloja-se o segmento inicial do flagelo. Os centríolos posicionam-se lateralmente 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 fazendo com que o complexo centriolar insira-se na fossa nuclear. A posição da fossa determina o pólo posterior do núcleo, região para a qual se desloca o citoplasma com as organelas espermáticas, dando origem à peça intermediária do futuro espermatozóide. Entre as variações mais comumente detectadas neste tipo de espermiogênese estão rotação nuclear incompleta, a não formação da fossa nuclear, a não inserção ou a inserção parcial dos centríolos na fossa nuclear e o fechamento do canal citoplasmático.

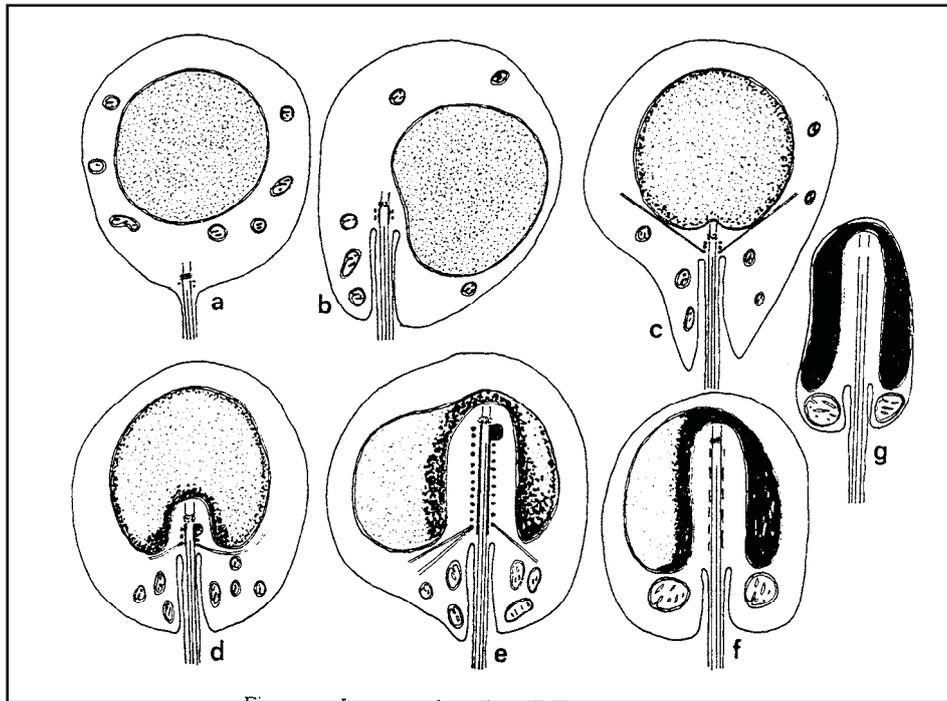


Figura 06-Representação esquemática da espermiogênese do tipo I, segundo Mattei (1970).

Na espermiogênese do tipo II (fig. 07) como a rotação nuclear não ocorre, o flagelo coloca-se paralelamente ao núcleo. Embora a fossa nuclear se forme, os centríolos permanecem fora dela. Este tipo de espermiogênese é tido como característico dos teleósteos mais derivados caso dos Perciformes (MATTEI, 1970). Apesar da sua predominância entre os Perciformes, a espermiogênese do tipo II com algumas poucas variações ocorre também entre os Characiformes (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007), Gymnotyformes (FRANÇA *et al.*, 2007) e os Siluriformes (SPADELLA, 2007). Entre as variações mais comumente detectadas neste tipo de espermiogênese estão a não formação da fossa nuclear, a inserção parcial dos centríolos na fossa nuclear, a não formação de uma peça intermediária bem definida e a ausência do canal citoplasmático (SPADELLA, 2007; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007). A espermiogênese do tipo II resulta na formação de espermatozoides aquáticos do tipo II. Estes espermatozoides diferem daqueles do tipo I, principalmente, quanto à posição do flagelo, lateral e paralelo ao núcleo, e complexo centriolar situado fora da fossa nuclear (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1970; 1991).

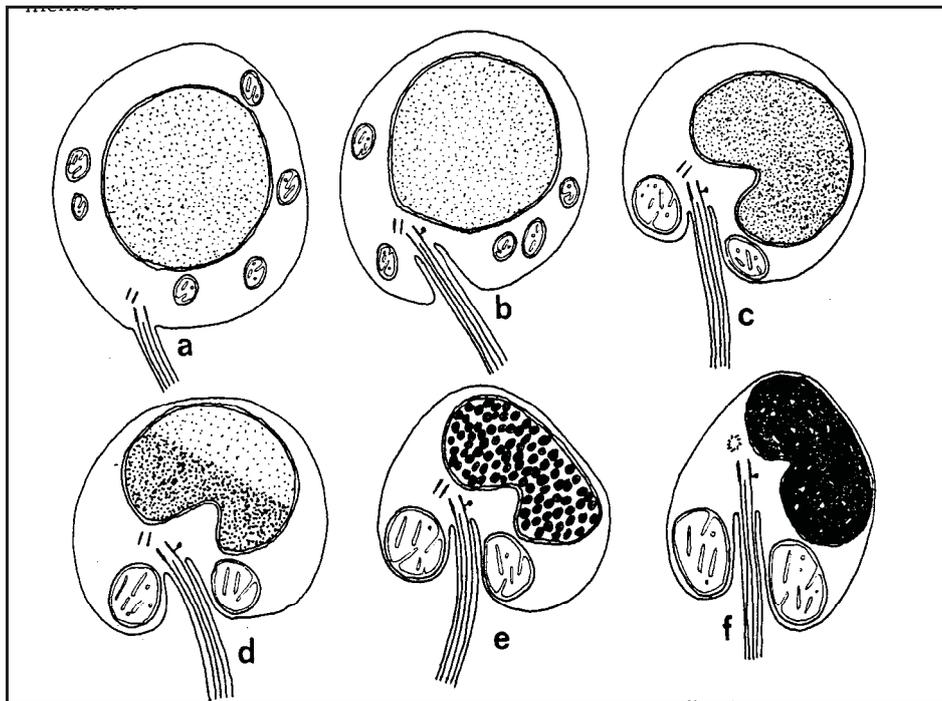


Figura 07-Representação esquemática da espermiogênese do tipo II, segundo Mattei (1970).

Na espermiogênese do tipo III (fig. 08), descrita recentemente (QUAGIO-GRASSIOTTO E OLIVEIRA, 2008), o complexo centriolar situa-se junto e centralizado em relação ao núcleo, o desenvolvimento do flagelo ocorre em posição central, o núcleo não sofre rotação e a fossa nuclear e o canal citoplasmático não se formam. Entre as variações mais comumente detectadas neste tipo de espermiogênese estão a formação da fossa nuclear e a formação do canal citoplasmático decorrente do deslocamento do citoplasma da peça intermediária e organelas em direção ao segmento inicial do flagelo (ORTIZ, 2008; SPADELLA *et al.*, 2006B). Com algumas poucas variações parece ainda ser a forma de espermiogênese dos Siluriformes que possuem espermatozoides biflagelados (ORTIZ, 2008; SPADELLA *et al.*, 2006A; SHAHIN, 2006A).

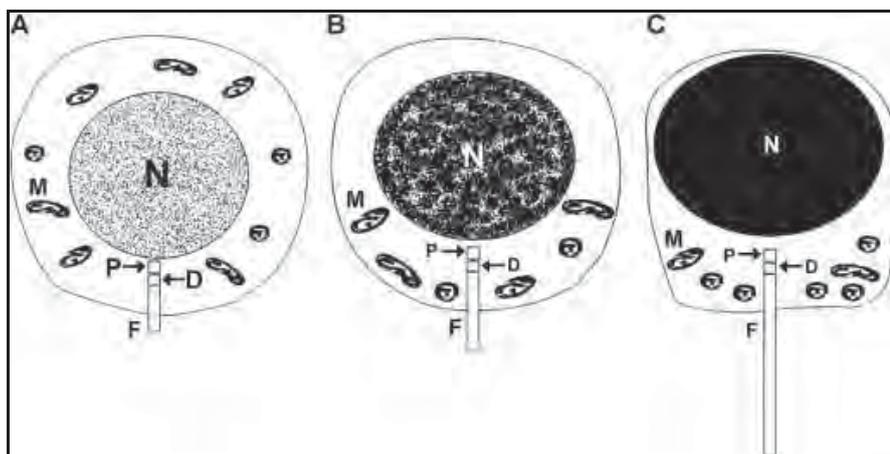


Figura 08- Representação esquemática da espermiogênese do tipo III, segundo Quagio Grassiotto e Oliveira (2008).

As espermiogêneses do tipo I e do tipo III resultam na formação de espermatozoides aquáticos do tipo I (JAMIESON, 1991, MATTEI, 1991; QUAGIO-GRASSIOTTO E OLIVEIRA, 2008). Em geral estes gametas possuem núcleo pequeno, de forma ovóide ou arredondada. Os centríolos, em ângulos variados, situam-se total ou parcialmente inseridos 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 de microtúbulos periféricos e um par central. A membrana flagelar pode ou não apresentar projeções laterais ou “fins”. Variações neste tipo de espermatozoide são observadas principalmente quanto à presença e dimensão da fossa nuclear; ausência de canal citoplasmático; tamanho e quantidade de mitocôndrias; presença, dimensão e organização de sistemas túbulo-vesiculares, número de flagelos e diferenciações da membrana flagelar (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; QUAGIO-GRASSIOTTO E OLIVEIRA, 2008; SPADELLA, 2007; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007). Nas espécies de Characiformes com inseminação o núcleo apresenta-se forte ou moderadamente alongado no sentido posterior ou anterior (BURNS *et al.*, 1998; 2000; PECIO E RAFINSKI, 1999; AZEVEDO, 2004; BURNS E WEITZMAN, 2005; PECIO *et al.*, 2005; WEITZMAN *et al.*, 2005; JAVONILLO *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2007). Nos Siluriformes com inseminação os núcleos são alongados no sentido anterior (BURNS *et al.*, 2002; SPADELLA *et al.*, 2007).

Em geral, nas espécies de uma mesma família, a estrutura dos espermatozoides é bastante similar (BACCETTI *et al.*, 1984; JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; BURNS *et al.*, 1998; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003), tornando sua caracterização bastante útil na identificação dos padrões de relacionamento interfamiliar. 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. Para este autor, vários grupos são suportados com base na estrutura de seus espermatozóides. Caso da monofilia da superordem Elopomorpha que é corroborada por cinco sinapomorfias derivadas da estrutura dos espermatozóides (JAMIESON, 1991).

O conhecimento sobre os espermatozóides dos Characiformes

Informações mais ou menos detalhadas sobre os espermatozóides dos Characiformes, excluída a família Characidae, encontravam-se até então disponíveis apenas para as famílias etiópicas Citharinidae (MATTEI *et al.*, 1995) e Alestidae (SHAHIN, 2006B), além de algumas das famílias de ocorrência neotropical como Acestrorhynchidae (MATOS *et al.*, 2000), Anostomidae (MATOS *et al.* 1999A; AMARAL, 2003; PECIO, 2003), Chilodontidae (PECIO, 2005), Curimatidae (MATOS *et al.*, 1998; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2003), Erythrinidae (MATOS *et al.*, 1999B; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2001) e Prochilodontidae (VICENTINI, 2002). Com a conclusão do trabalho de Veríssimo-Silveira (2007), hoje estão disponíveis informações detalhadas sobre pelo menos um representante de cada uma das catorze famílias de ocorrência neotropical. São elas: Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae e Lebiasinidae. Além das famílias Ctenoluciidae e Hepsetidae, hoje a ausência total de informações sobre a ultraestrutura dos espermatozóides ainda persiste para a também família africana Distichodontidae.

Na família Characidae as informações existentes sobre a ultra-estrutura dos espermatozóides das espécies de fertilização externa referem-se às subfamílias Bryconinae (ROMAGOSA *et al.*, 1999; AIRES *et al.*, 2000; ZAIDEN, 2000; VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.*, 2006), Serrasalminae (MATOS *et al.*, 1993; CRUZ-LANDIM *et al.*, 2003), Cheirodontinae (BURNS *et al.*, 1998; OLIVEIRA, 2007) e Characinae (MAGALHÃES *et al.*, 1998) Gusmão-Pompiani (2003) ampliou consideravelmente este painel de conhecimento com novas e acuradas descrições dos espermatozóides das subfamílias Serrasalminae, Bryconinae, Tetragonopterinae, Stethaprioninae, Aphyocharacinae e Characinae, além de alguns gêneros *incertae sedis*, como *Triportheus*, *Bryconops*, *Hyphessobrycon*, *Moenkhausia* e *Bryconamericus*. Informações cuidadosas e detalhadas são também encontradas sobre os espermatozóides das espécies com inseminação pertencentes às subfamílias Cheirodontinae (BURNS *et al.* 1998; BURNS E WEITZMAN 2005; OLIVEIRA 2007) e Glandulocaudinae (BURNS *et al.*, 1998; PECIO E RAFINSKI, 1999). Além destas, outras primorosas descrições de espermatozóides de espécies

com inseminação, até então pertencentes à subfamília Glandulocaudinae, e recentemente alocadas na subfamília Stervadiinae (BURNS *et al.* 1998; WEITZMAN *et al.* 2005; PECIO *et al.*, 2005), vêm continuamente melhorando este banco de dados.

A ultraestrutura dos espermatozóides nos gêneros *incertae sedis* em Characidae

Nos gêneros *incertae sedis* em Characidae as informações existentes sobre a ultraestrutura dos espermatozóides restringem-se a: *Hyphessobrycon* (JAMIESON, 1991 e MOJICA 2007, *Bryconops* (ANDRADE *et al.*, 2001; GUSMÃO-POMPIANI, 2003), *Moenkhausia* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003), *Gymnocorymbus* (MOJICA, 2007), *Bryconamericus* (Gusmão-Pompiani, 2003), *Astyanax* (Vicentini, 2002), *Salminus* (VERÍSSIMO SILVEIRA *et al.*, 2006), *Hemigrammus* (PECIO *et al.*, 2007) e *Hollandichthys* (AZEVEDO, 2004) e *Brittanichthys* (JAVONILLO *et al.* 2007).

Os espermatozóides da maioria dos gêneros estudados em Characidae, assim como na maioria dos Characiformes, são do tipo aquasperm, com núcleo esférico à ovóide e peça intermediária reduzida, característico de espécies com fertilização externa (JAMIESON, 1991). Os espermatozóides de *Hollandichthys affinis*, *H. perstriatus*, *H. sp.* (AZEVEDO, 2004) e *Brittanichthys axelrodi* diferem-se dos demais por serem do tipo introsperm, característicos de peixes inseminadores. Os espermatozóides destas espécies possuem cabeça e núcleo alongados, cromatina na forma de finos filamentos homogeneamente compactados e mitocôndrias grandes, assim como em outras três linhagens de Characídeos: Diapomini, Corynopomini (Stevardiinae) e Glandulocaudini (Glandulocaudinae) (BURNS *et al.*, 1998).

Os dados disponíveis sobre a ultraestrutura dos espermatozóides nos Characidae *incertae sedis* mostram uma grande diversidade morfológica. Tamanha diversidade reflete a heterogeneidade e complexidade taxonômica do grupo. Estudos criteriosos e sistematizados das características ultraestruturais dos espermatozóides devem, com certeza, fornecer importantes subsídios para as análises das inter-relações entre os táxons hoje alocados em *incertae sedis*.

Objetivos

Dado o potencial de aplicabilidade das informações sobre os caracteres reprodutivos masculinos para os estudos filogenéticos:

-descreve-se aqui a estrutura testicular, a espermatogênese, a espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozóides dos representantes de alguns gêneros *incertae sedis* em Characidae.

-tendo como hipótese inicial de trabalho o a proposta de Reis e colaboradores (2003) que alteram o status da maioria dos gêneros que integravam a subfamília Tetragonopterine (*sensu* GÉRY) para *incertae sedis* em Characidae, comparou-se com base nas características da espermatogênese, da espermiogênese e da ultraestrutura dos espermatozóides, as hipóteses de relacionamento, hoje disponíveis para o grupo;

-considerando que as espécies aqui analisadas encontravam-se anteriormente alocadas em Tetragonopterinae, as análises comparativas foram realizadas principalmente em relação a *Tetragonopterus argenteus*, espécime tipo do gênero nominal da subfamília;

- tendo como hipótese inicial de trabalho o a proposta de Malabarba e Weitzman (2003) para um grupo denominado clado A, comparou-se com base nas características da espermiogênese e da ultraestrutura dos espermatozóides, a hipótese de relacionamento deste grupo;

- propôs-se aqui, uma lista de caracteres morfológicos correspondentes às características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides dos gêneros *incertae sedis* em Characidae a ser utilizadas nas análises cladísticas;

Materiais e métodos

Materiais

Testículos de 88 exemplares machos, sexualmente maduros de representantes de gêneros *incertae sedis* na família Characidae foram coletados no período de agosto de 2006 a novembro de 2007. As coletas foram realizadas no Rio Cuiabá e seus afluentes, nos municípios de Cuiabá, Chapada dos Guimarães e Poconé-MT, nos afluentes do Rio Tiete, nos municípios de Botucatu e Bofete- SP. Entretanto, maioria dos espécimes foi adquirida na loja de aquarismo Fish Ornament, município de Botucatu-SP e são provenientes da Bacias Hidrográficas da América Central e do Sul, principalmente da Bacia Amazônica. Os testículos de *Deuterodon singularis* e *Moenkhausia dichroua* foram cedidos pelo Professor Dr. Luis Roberto Malabarba. O testículo de *Gymnocorymbus* sp. n. foi disponibilizado pelo Dr. Ricardo Cardoso Benine e é proveniente de espécime de coleção zoológica fixado inteiro em formol 10% e conservado em álcool 70%.

Para a retirada dos testículos os exemplares foram anestesiados com uma solução de benzocaína obtida a partir da diluição de 0,5g de benzocaína em 5 ml de álcool absoluto e 5 L de água. Todos os exemplares utilizados foram subsequentemente fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, São Paulo, como espécimens-testemunho.

Para efeito de comparação foram utilizadas as descrições dos espermatozoides de *Tetragonopterus argenteus* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) e *Hemigrammus erythrozonus* (PECIO *et al.*, 2007).

Espécies	Número de Registro
<i>Astyanax bockmanni</i>	LBP 6040
<i>Astyanax fasciatus</i>	LBP 6041
<i>Astyanax jordani</i>	LBP 4586
<i>Boehlkea fredcochui</i>	LBP 4937
<i>Bryconamericus exodon</i>	LBP 4628
<i>Bryconella pallidifrons</i>	LBP 4646
<i>Creagrutus sp.</i>	LBP 3969
<i>Deuterodon singularis</i>	MCP 28769
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	LBP 4634
<i>Gymnocorymbus sp.n</i>	ANSP 130539
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	LBP 4667
<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>	LBP 4636 e LBP 4643
<i>Hyphessobrycon columbianus</i>	LBP 5984
<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	LBP 4948
<i>Hyphessobrycon sp.</i>	LBP 4642
<i>Inpaichthys kerri</i>	LBP 4668
<i>Markiana nigripinnis</i>	LBP 4935
<i>Moenkhausia bonita</i>	LBP 3950 e LBP 3976
<i>Moenkhausia dichrourea</i>	MCP 33542
<i>Moenkhausia oligolepis</i>	LBP 3956
<i>Oligosarcus paranensis</i>	LBP 4626
<i>Paracheiroidon axelrodi</i>	LBP 4638
<i>Piabina anhembí</i>	LBP 4622
<i>Pristella maxillaris</i>	LBP 7220

Tabela 1- Lista de espécies utilizadas e dos seus respectivos números de registro. **LBP-** Laboratório de Biologia de Peixes, **MCP-** Museu de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, **ANSP-** Academy of Natural Sciences of Philadelphia.

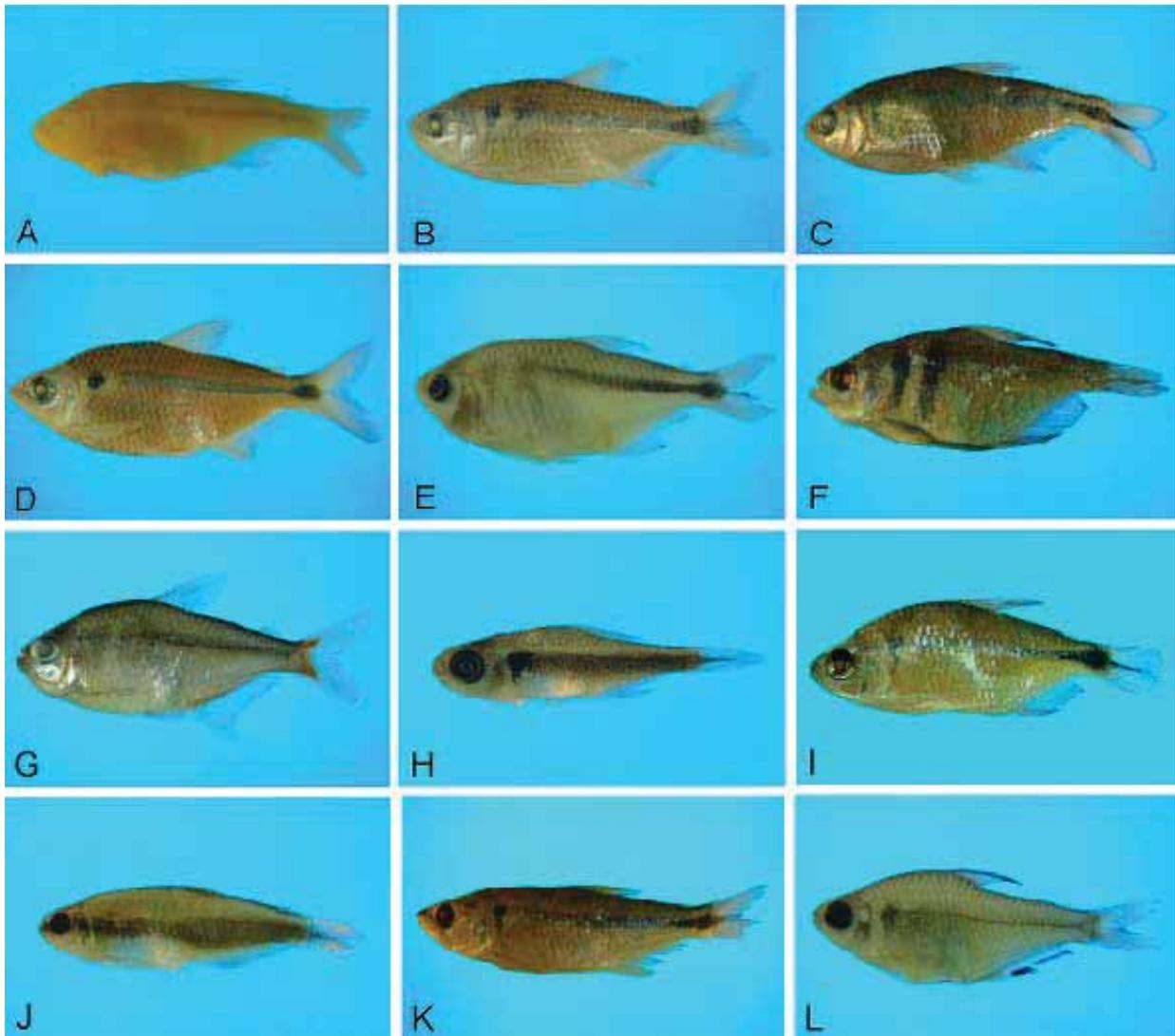


Figura 9-Vista lateral de exemplares representativos de: **A-** *Astyanax jordani* LBP 4586 **cp-** 3,67cm, **B-** *Astyanax bockmanni* LBP 6040 **cp-** 5,90cm, **C-** *Astyanax fasciatus* LBP 6041 **cp-** 7,46cm, **D-** *Deuterodon singularis* MCP 28769 **cp-** 6,65cm, **E-** *Hyphessobrycon anisitsi* LBP 4667 **cp-** 4,79cm, **F-** *Hyphessobrycon bifasciatus* LBP 4636 **cp-** 36.3cm, **G-** *Hyphessobrycon columbianus* LBP 5984 **cp-** 3,48 cm, **H-** *Hyphessobrycon herbertaxelrodi* LBP 4948 **cp-** 1,92cm, **I-** *Hyphessobrycon* sp. LBP 4642 **cp-** 4,83cm, **J-** *Inpaichthys kerri* LBP 4668 **cp-** 3,01cm, **K-** *Oligosarcus paranensis* LBP 4626 **cp-** 8,76cm, **L-** *Pristella maxillaris* LBP 7220 **cp-** 3,07cm.

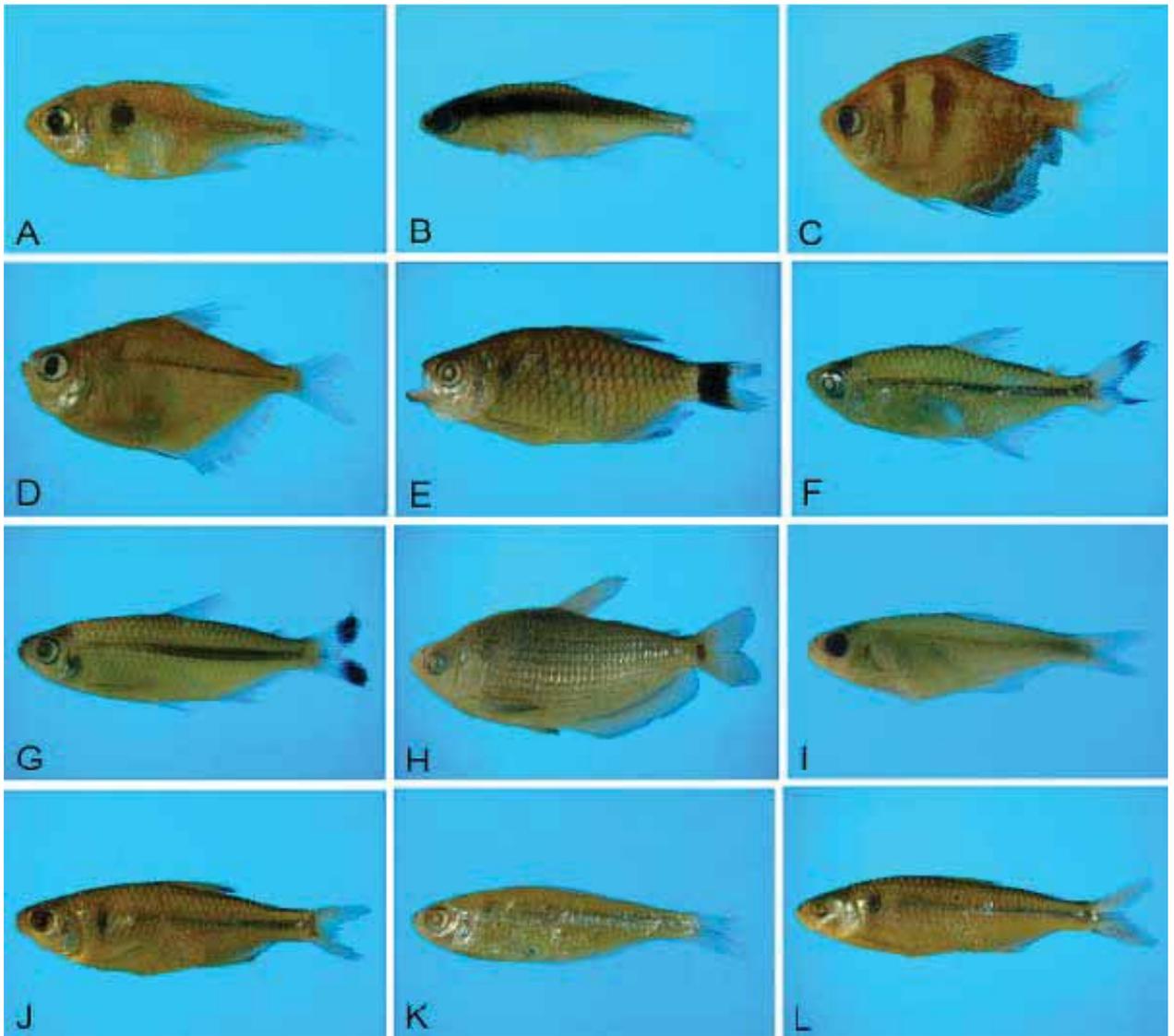


Figura 10- Vista lateral de ejemplares representativos de **A-***Bryconella pallidifrons* LBP 4646 **cp-** 2,26cm, **B-***Paracheirodon axelrodi* LBP 4638 **cp-** 2,09cm, **C-***Gymnocorymbus ternetzi* LBP 4634 **cp-** 3,78cm, **D-***Gymnocorymbus* sp.n ANSP 130539 **cp-** 4,04cm, **E-** *Moenkhausia oligolepis* LBP 3956 **cp-** 4,13cm, **F-***Moenkhausia bonita* LBP 3950 **cp-** 3,21cm, **G-** *Moenkhausia dichroua* MCP 33542 **cp-** 5,10 cm, **H-***Markiana nigripinnis* LBP 4935 **cp-** 6,93cm, **I-***Boehlkea fredcochui* LBP 4937 **cp-** 2,79cm, **J-***Bryconamericus exodon* LBP 4628 **cp-** 4,34cm, **K-***Cregrutus* sp. LBP 3969 **cp-** 3,21cm, **L-***Piabina anhemi* LBP 4622 **cp-** 6,28cm.

Processamento do material para análise estrutural

Os testículos foram retirados e fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2 por pelo menos 48 horas. A estrutura morfológica do testículo foi fotografada e o material fixado processado para análise em microscópio óptico, seguindo o protocolo:

- *desidratação em seqüência crescente de álcool etílico*
- *embebição em mistura 1:1 de álcool etílico 95% e historresina Leica por 08 horas*
- *embebição em resina pura por 24 horas*
- *inclusão em resina pura e polimerização em estufa à 60° C (06 horas)*

Cortes transversais e longitudinais de 3µm foram obtidos no micrótomo Leica Junk RM2045 e corados em Hematoxilina /Eosina, Azul de Toluidina e PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow (QUINTERO-HUNTER *et. al.*, 1991) . As secções histológicas foram analisadas e documentadas através de sistema computadorizado para análise de imagens Leica Qwin 2.5. Com base nas fotografias obtidas, foram descritas as características anatômicas e histológicas dos testículos.

Processamento do material para análise ultraestrutural

Os testículos foram seccionados e fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4%, tampão fosfato Sorensen, 0,1M e ácido pícrico 1% a pH 7,2 por pelo menos 48 horas. Os testículos selecionados foram então processados para a análise ao microscópio eletrônico de transmissão, seguindo o protocolo:

- *lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (3x de 15 minutos);*
- *pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, no escuro (2 horas);*
- *lavagem em água destilada (3x de 5 minutos);*
- *contrastação em bloco com solução aquosa de acetato de uranila 0,5% (2 horas);*
- *desidratação em seqüência crescente de soluções de acetona;*
- *embebição em mistura de resina Araldite® e acetona 100% (12 horas);*
- *embebição em resina pura na estufa à 37° C (1 hora);*
- *inclusão em resina pura e polimerização em estufa à 60° C (72 horas).*

Os cortes semifinos (0,5 µm), confeccionados em micrótomo Leica RM 2165, equipado com navalha de vidro, foram corados com solução de azul de metileno 1% em solução de bórax 1% e examinados em microscópio fotônico para seleção das áreas específicas para o estudo ao microscópio eletrônico de transmissão.

Após esta análise, os blocos contendo o material selecionado foram desbastados e em seguida feitos os cortes ultrafinos. Estes foram obtidos no ultramicrótomo Leica Ultracut UCT,

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 20 minutos, seguida de lavagem, por várias vezes, em água destilada. Os cortes assim preparados foram observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips – CM 100 e fotografados em filme 35mm da Kodak (Eastman 5302). As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico da Kodak (Kodabrome RC Print). Com base nas elétron-micrografias obtidas, foram descritas as características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozoides das espécies apresentadas na tabela 1.

Resultados

ESTRUTURA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE

Em todas as espécies analisadas a estrutura testicular e a espermatogênese são muito semelhantes e serão descritas no seu conjunto.

Os testículos são pares, saculiformes, achatados e de contorno irregular (fig. 11A). São do tipo tubular anastomosado, no qual o compartimento germinativo organiza-se a partir da periferia do testículo em forma túbulos que se anastomosam por toda extensão do órgão (fig. 11B). Os testículos são revestidos externamente por uma cápsula, constituída por mesotélio e tecido conjuntivo frouxo subjacente. O testículo é dividido em dois compartimentos, o germinativo e o intersticial, que são separados por uma membrana basal. O compartimento germinativo é revestido pelo epitélio germinativo (células germinativas e células de Sertoli) enquanto que o compartimento intersticial é uma continuação da cápsula, com tecido conjuntivo frouxo, vasos sangüíneos, células de Leydig e outros componentes. Uma secreção de provável natureza protéica é encontrada no interior dos cistos contendo espermátides finais e no compartimento luminal de *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni*, *Astyanax fasciatus*, *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*, *Hyphessobrycon* sp., *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Cregrutus* sp. e *Piabina Anhembi* (fig. 11 C, D e F). A secreção é produzida pelas células de Sertoli e lançada para o interior dos cistos e para o compartimento luminal do testículo (fig. 11E).

A espermatogênese é cística e, portanto, a diferenciação das espermátides ocorre o interior dos cistos localizados no epitélio germinativo (fig. 11 C e D). Ao final do processo de diferenciação os cistos se abrem e liberam os espermatozóides para o interior do compartimento luminal dos testículos.

ESPERMIOGÊNESE

Em todas as espécies analisadas a espermiogênese é denominada tipo I e será descrita no seu conjunto para que suas diferenças possam ser adequadamente ressaltadas.

As espermátides iniciais estão interconectadas por pontes citoplasmáticas, têm formato arredondado, núcleo esférico contendo cromatina descondensada, poucas mitocôndrias e poucas vesículas esparsas no citoplasma. O complexo centriolar tem posição lateral em relação ao núcleo, os centríolos são perpendiculares um ao outro e estão ancorados na membrana plasmática. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo e traz consigo a membrana plasmática que se invagina. Forma-se assim o canal citoplasmático (figs. 12A, 12C, 12E e 13A, 13C 13E e 13G). No envoltório nuclear na região voltada para o complexo centriolar forma-se uma depressão dupla, a fossa (figs 12B, 12D, 13D e 13H). O núcleo sofre uma rotação incompleta em relação ao flagelo que pode acontecer de duas formas. O núcleo roda em um ângulo inferior a 90° e superior a 10°, com isso a dupla fossa assume uma posição que varia de levemente a fortemente excêntrica (fig. 12A-F). Esta forma é comum à maioria das espécies analisadas. A outra forma ocorre quando o núcleo roda em um ângulo igual ou inferior a 10° levando a um posicionamento lateral da dupla fossa nuclear e do flagelo como em *Moenkhausia dichroua*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembi* (fig. 13A-H). Com a movimentação do núcleo, a massa citoplasmática se desloca em direção ao flagelo. A massa citoplasmática contendo as mitocôndrias e as vesículas forma a peça intermediária do futuro espermatozóide. As vesículas organizam-se na peça intermediária e formam arranjos e/ou sistemas túbulo-vesiculares característicos conforme a espécie analisada (figs. 12B, 12D, 12F, 13B, 13D, 13F e 13H). Dependendo da localização das mitocôndrias e das vesículas a peça intermediária pode tornar-se assimétrica em relação ao flagelo. Na maioria das espécies a peça intermediária localiza-se a partir da base do núcleo (fig. 12B, D e F), exceto em *Moenkhausia dichroua*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Cregrutus* sp. e *Piabina Anhembi* nas quais essa localização é basolateral (fig. 13B, D, F e H).

ESPERMATOZÓIDES

- **Gênero *Astyanax***

Os espermatozóides foram analisados em três espécies: *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni* e *Astyanax fasciatus*. Os espermatozóides são muito semelhantes e serão descritos no seu conjunto para que suas diferenças possam ser adequadamente ressaltadas.

No espermatozóide de *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni* e *Astyanax fasciatus* o núcleo é esférico com diâmetro médio de 1,69 μm , 1,98 μm e 1,59 μm , respectivamente. A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por algumas áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo. A fossa nuclear é dupla, rasa, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e lateral em relação ao centríolo distal (figs 15A e 16B) exceto em *A. jordani* cujo centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig. 14A). A peça intermediária é ligeiramente assimétrica, curta em *A. bockmanni* (1,66 μm) e *A. jordani* (1,77 μm) (figs 15A e 14A-B) e de dimensão intermediária em *A. fasciatus* (2,02 μm) (fig. 16A). A largura da peça intermediária é de 2,11 μm em *A. jordani*, 1,5 μm em *A. bockmanni* e 1,76 μm em *A. fasciatus*. As várias mitocôndrias são alongadas e distribuem-se nos dois terços anteriores da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. As mitocôndrias são menos numerosas em *A. bockmanni* do que em *A. jordani* e *A. fasciatus*. O sistema túbulo-vesicular, inicialmente com localização periférica, distribui-se no sentido longitudinal na peça intermediária (figs 14A e B, 15B e 16A e B). O sistema concentra-se em posição diametralmente oposta à região em que inicialmente se encontram as mitocôndrias e no terço posterior da peça intermediária. É constituído por vesículas de dimensões intermediárias e por inúmeros túbulos de pequeno diâmetro distribuídos por toda a peça intermediária. Este sistema é muito desenvolvido na região inicial da peça intermediária e torna-se progressivamente menos desenvolvido ao seu término (figs 14B, 15A e 16B) Em *A. jordani* e *A. fasciatus* o sistema túbulo-vesicular apresenta ainda algumas vesículas de maior dimensão localizadas no terço posterior da peça intermediária. Os túbulos e vesículas interconectam entre si e a membrana plasmática. A luz dos túbulos e vesículas está preenchida pela secreção existente no compartimento luminal do testículo (figs 14A-K, 15A-C, 16A-M). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui expansões laterais ou fins (figs 14A-B, 14D-K, 15G e 16N).

- *Deuterodon singularis*

O espermatozóide de *Deuterodon singularis* possui núcleo esférico com diâmetro médio de 1,94 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig. 17A-B). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig. 17A detalhe). Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 1,04 μm de largura, é assimétrica, longa, com comprimento médio de 4,15 μm e termina em uma bainha citoplasmática (3,01 μm) (fig. 17A). As várias mitocôndrias são esféricas e concentram-se nos dois terços anteriores da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig. 17 D-E). O sistema túbulo-vesicular é pouco desenvolvido e constituído predominantemente por vários túbulos de pequeno diâmetro, além de algumas vesículas de dimensões intermediárias distribuídas por toda a peça intermediária (fig 17 B-C, E-G). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui expansões laterais ou fins (fig. 17F).

- *Hyphessobrycon anisitsi*

O espermatozóide de *Hyphessobrycon anisitsi* possui núcleo esférico com diâmetro médio de 1,88 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 18A-C). A fossa nuclear é dupla, rasa, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal (fig 18 B-C). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e lateral em relação ao centríolo distal. A peça intermediária tem 1,52 μm de largura é assimétrica e de dimensão intermediária (2.05 μm) com uma bainha citoplasmática (0,58 μm) (fig 18 A). Essa assimetria é decorrente da concentração preferencial das mitocôndrias e vesículas em um dos lados da peça intermediária. As várias mitocôndrias são levemente alongadas e localizam-se nos dois terços anteriores da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático(fig 18A-N). O sistema túbulo-vesicular distribui-se por toda a peça intermediária, exceto na bainha citoplasmática e possui grandes vesículas de distribuição periférica e vesículas de menor dimensão. As vesículas de maior dimensão conectam-se entre si, com as vesículas menores e com a membrana plasmática. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui expansões laterais ou fins (fig 18O).

- *Hyphessobrycon bifasciatus*

O espermatozóide de *Hyphessobrycon bifasciatus* possui núcleo esférico com diâmetro médio de 1,92 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma com algumas vesículas envolve o núcleo (fig 19A-B). A fossa nuclear é dupla, rasa, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal (fig 19B). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 19B). A peça intermediária é assimétrica, de dimensões intermediárias (2,54 μm) e termina em uma bainha citoplasmática (0,75 μm). As várias mitocôndrias são alongadas e concentram-se no terço anterior da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 19A-J). O sistema túbulo-vesicular é muito desenvolvido, distribui-se periféricamente no terço anterior e concentram-se principalmente nos dois terços posteriores da peça intermediária (fig 19A-B). Os túbulos e vesículas têm dimensões variadas, em corte transversal podem mostrar um aspecto rendilhado e eventualmente conectam-se a membrana plasmática. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos. O segmento inicial do flagelo, ainda no canal citoplasmático, apresenta uma maior quantidade de citoplasma e algumas pequenas vesículas (fig 19B e K). A membrana no segmento final do flagelo possui sutis projeções laterais que lhe conferem um aspecto crenado (fig 19M).

- *Hyphessobrycon columbianus*

O espermatozóide de *Hyphessobrycon columbianus* possui núcleo esférico com diâmetro médio de 1,58 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 20A). A fossa nuclear é dupla, rasa, excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 20B). A peça intermediária tem 1,30 μm de largura e é ligeiramente assimétrica e longa (3,77 μm) com uma bainha citoplasmática (3,01 μm) (fig 20A). As várias mitocôndrias são levemente alongadas e concentram-se na região anterior, preferencialmente em um dos lados da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático. As mitocôndrias não estão presentes na bainha citoplasmática (fig 20A-B). Túbulos de pequeno diâmetro, justapostos e concêntricos mostram-se, em corte longitudinal, como pequenas vesículas justapostas numa figura semelhante a favos de mel. Os túbulos localizam-se ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo (fig 20B). Além destes, algumas vesículas esparsas e de diâmetro intermediário eventualmente conectadas a membrana plasmática, são encontradas ao longo da peça intermediária até o início da bainha citoplasmática (fig 20F-K). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 20L).

- *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*

O espermatozóide de *Hyphessobrycon herbertaxelrodi* possui núcleo esférico com diâmetro médio de 2,05 μm (fig 21A). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 21A). A fossa nuclear é dupla, rasa, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal (fig 21A detalhe). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal. Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 1,66 μm de largura e é levemente assimétrica e longa (3,64 μm) e com uma bainha citoplasmática (2,35 μm) (fig 21A). As várias mitocôndrias são ligeiramente alongadas e concentram-se na região anterior, preferencialmente em um dos lados da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 21A-G). As mitocôndrias não estão presentes na bainha citoplasmática (fig 21H-J). O sistema túbulo-vesicular é pouco desenvolvido e é constituído por algumas vesículas esparsas de diâmetro intermediário e túbulos de pequeno diâmetro que eventualmente se conectam à membrana plasmática. O sistema localiza-se ao longo da peça intermediária mas não está presente na bainha citoplasmática (fig 21D-E). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos. O segmento inicial do flagelo, ainda no canal citoplasmático, apresenta uma maior quantidade de citoplasma e algumas pequenas vesículas (fig. 20G). A membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 20I-J).

- ***Hyphessobrycon* sp.**

O espermatozóide de *Hyphessobrycon* sp. possui núcleo esférico com diâmetro médio de 1,58 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 22A-B). A fossa nuclear é dupla, rasa, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 22A-B). A peça intermediária tem 1,08 μm de largura e ligeiramente assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,52 μm (fig 22A-B). As mitocôndrias são ligeiramente alongadas, distribuem-se por toda a peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 22E-N). As mitocôndrias estão ausentes apenas no término da peça intermediária (fig 22N). Alguns túbulos de pequeno diâmetro e algumas vesículas esparsas de diâmetro intermediário são encontrados na peça intermediária e eventualmente interconectam-se à membrana plasmática (fig 22C-K). As vesículas eventualmente conectam entre si. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar possui sutis projeções laterais que lhe conferem um aspecto crenado (fig 22D).

- *Inpaichthys kerri*

No espermatozóide de *Inpaichthys kerri* o núcleo é esférico com diâmetro médio de 1,76 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 23A-B). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, fortemente excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal (fig 23A detalhe). No complexo centriolar, o centríolo proximal é paralelo e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 23A detalhe). A peça intermediária tem 1,0 μm de largura e é assimétrica, larga e curta, com comprimento médio de 1,76 μm (fig 23A-B). As mitocôndrias distribuídas ao longo e preferencialmente concentradas em um dos lados da peça intermediária, são poucas, longas, e possivelmente fusionadas umas as outras (fig. 23A-B e E-J). O sistema túbulo-vesicular distribui-se perifericamente por toda a peça intermediária (fig 23B-K). É constituído por vesículas de dimensão intermediária e pode de ser encontrado também entre as mitocôndrias (fig 23E-I). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar possui sutis projeções laterais que lhe conferem um aspecto crenado.

- *Oligosarcus paranensis*

No espermatozóide de *Oligosarcus paranensis* o núcleo é esférico com diâmetro médio de 2,08 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 24A-D). A fossa nuclear é dupla, rasa, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 24 detalhe). A peça intermediária tem 1,73 μm de largura é ligeiramente assimétrica em corte transversal e desigual em comprimento com 1,50 μm no menor lado e 2,64 μm no maior lado (fig 24A-C). A assimetria é decorrente da variação na quantidade e tamanho das vesículas. As várias mitocôndrias são alongadas e distribuem-se por toda peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 24E-K). As mitocôndrias não estão presentes na região terminal do maior lado da peça intermediária (fig 24A, C). O sistema túbulo-vesicular distribui-se perifericamente ao longo da peça intermediária (fig 24A-C). No lado menor os túbulos e vesículas são de pequeno diâmetro e mostram um aspecto rendilhado em corte transversal (fig 24B, G-J). No lado maior este sistema forma grandes vesículas alongadas, muito dilatadas, conectam-se entre si e eventualmente com a membrana plasmática (fig 24A,C). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui expansões laterais ou fins (fig 24M).

- *Pristella maxillaris*

No espermatozóide de *Pristella maxillaris* o núcleo é esférico com diâmetro médio de 1,94µm. A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 25A). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e levemente oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 25 detalhe). A peça intermediária tem 1,11µm de largura é assimétrica e longa (3,83µm) com uma bainha citoplasmática (3,17µm) (fig 25A). A assimetria é decorrente da distribuição desigual das mitocôndrias que se concentram em um dos lados da peça intermediária. As mitocôndrias são ramificadas e concentram-se na região anterior da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 25B-F). As mitocôndrias não estão presentes na bainha citoplasmática (fig 25A e G). Uma longa cisterna periféricamente localizada acompanha toda a peça intermediária desde as proximidades do núcleo até o término da bainha citoplasmática (fig 25B-G). Além da cisterna, algumas vesículas de pequeno diâmetro são encontradas ao longo da peça (fig 25C-E). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 25G).

- *Bryconella pallidifrons*

No espermatozóide de *Bryconella pallidifrons* o núcleo é esférico com diâmetro médio de 1,84 μ m. A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma envolve o núcleo (fig 26A). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 26A e detalhe). A peça intermediária tem 1,43 μ m de largura é fortemente assimétrica e longa (3,50 μ m) com uma bainha citoplasmática (2,64 μ m) (fig 26A). As poucas mitocôndrias são longas, ramificadas e concentram-se na região anterior e preferencialmente em um dos lados da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 26B-H). As mitocôndrias não estão presentes na bainha citoplasmática (fig 26I,J). Uma longa cisterna periféricamente localizada acompanha toda a peça intermediária desde as proximidades do núcleo até o término da bainha citoplasmática. Além da cisterna, algumas vesículas esparsas são encontradas ao longo de toda peça intermediária (fig 26B-E). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 26K).

- *Paracheirodon axelrodi*

No espermatozóide de *Paracheirodon axelrodi* o núcleo é esférico com diâmetro médio de 1,83 μ m. A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 27A-C). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal (fig 27A,C). No complexo centriolar, o centríolo proximal é mais longo, anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal. Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro e ao envoltório nuclear. Um anel elétron-denso está presente na região anterior dos centríolos. A partir dele irradiam uma grande quantidade de microtúbulos que se ancoram à membrana plasmática (fig 27E). A peça intermediária é assimétrica, longa (4,52 μ m) e com uma bainha citoplasmática (3,39 μ m) (fig 27C). As várias mitocôndrias são levemente alongadas e concentram-se no terço anterior da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 27F-J). Um sistema de túbulos de pequeno diâmetro, justapostos, concêntricos que em corte mostram-se como pequenas vesículas justapostas numa figura semelhante a favos de mel, localiza-se nos dois terços anteriores e em apenas um dos lados da peça intermediária (fig 27D, B, G e detalhe). Além destes, a peça intermediária possui outros túbulos e vesículas de pequeno diâmetro e diâmetro intermediário esparsas ao longo da peça até o início da bainha citoplasmática (fig 27A-B, E-F, H-I). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 27 M).

- **Gênero *Gymnocorymbus***

Os espermatozoides foram analisados em duas espécies: *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n (Benine, R.C. comunicação pessoal). No espermatozoide de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n. o núcleo é levemente alongado no sentido anterior com 2,05µm e 1,56 µm no sentido longitudinal e 1,88µm e 1,30µm no sentido transversal, respectivamente (figs 28A-B e 29A-B). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo. A fossa nuclear é dupla, de profundidade moderada, levemente excêntrica ao núcleo e abriga o centríolo proximal e parte do distal (figs 28A-B e 29A-B). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (figs 28A-B e 29A-B). A peça intermediária tem 1,82µm e 1,56µm de largura em *Gymnocorymbus ternetzi* *Gymnocorymbus* sp. n., é assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,15µm e 0,92 µm respectivamente. Essa assimetria é decorrente da distribuição desigual das mitocôndrias que se concentram em um dos lados da peça intermediária. As várias mitocôndrias são alongadas e distribuem-se nos dois terços anteriores da peça intermediária, circundam a base do núcleo e estão separadas do flagelo pelo canal citoplasmático (figs 28A, D-H e 29A-B). O sistema túbulo-vesicular distribui-se perifericamente por toda peça intermediária e nos dois terços anteriores concentra-se na região diametralmente oposta àquelas em que se encontram as mitocôndrias. (figs 28A-H e 29B) O sistema é constituído nos seus dois terços anteriores por túbulos e vesículas de pequeno diâmetro que tornam-se progressivamente mais dilatadas e maiores no terço posterior. Os túbulos e vesículas conectam-se entre si e com a membrana plasmática (figs 28A-N e 29A-F). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins.

- *Moenkhausia oligolepis*

O espermatozóide de *Moenkhausia oligolepis* possui núcleo esférico com diâmetro médio de 1,84 μm . A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (figs 30A-D). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (figs 30B). A peça intermediária tem 1,17 μm de largura é fortemente assimétrica e longa (3,37 μm) com uma bainha citoplasmática (2,64 μm) (figs 30A-B). As várias mitocôndrias são alongadas e concentram-se na região anterior e preferencialmente em um dos lados da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (figs 30A, E-I). As mitocôndrias não estão presentes na bainha citoplasmática (figs 30 J-N). Um sistema de túbulos de pequeno diâmetro, justapostos, concêntricos que em corte mostram-se como pequenas vesículas justapostas numa figura semelhante a favos de mel, localiza-se junto ao núcleo e em apenas um dos lados da peça intermediária. Além destes, a peça intermediária possui outros túbulos e vesículas de dimensões intermediárias perifericamente distribuídos ao longo de toda a peça intermediária (figs 30A-B, E-F, J-N). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos. A membrana no segmento final do flagelo possui sutis projeções laterais que lhe conferem um aspecto crenado (figs 30O).

- ***Moenkhausia bonita***

No espermatozóide de *Moenkhausia bonita* o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 2,0 µm no sentido longitudinal e 1,76 µm no sentido transversal (fig 31A). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 31A-B). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, fortemente excêntrica ao núcleo e abriga parte dos centríolos proximal e distal (fig 31A-B e detalhe). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 31 detalhe). Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 1,52µm de largura é fortemente assimétrica e de dimensão intermediária, com comprimento médio de 2,17µm (fig 31A-B). As várias mitocôndrias são alongadas e concentram-se na região anterior e preferencialmente em um dos lados da peça intermediária, ao redor do centríolo distal e do início flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 31A-B, D-L). Algumas vesículas de grandes dimensões conectadas à membrana plasmática são encontradas entre as mitocôndrias, ao longo da peça intermediária (fig 31A-B, E-M). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 31N).

- *Moenkhausia dichroua*

No espermatozóide de *Moenkhausia dichroua* o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 1,5µm no sentido longitudinal e 1,2µm no sentido transversal (fig 32A-B). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve o núcleo (fig 32A-B). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, lateral e abriga parte do centríolo proximal (fig 32A-B e detalhe). A peça intermediária tem 1,76µm de largura é fortemente assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,17µm (fig 32A-F). Essa assimetria é decorrente da rotação incompleta do núcleo e conseqüente inserção lateral do flagelo. As poucas mitocôndrias são esféricas e concentram-se no maior lado da peça intermediária, na base ao núcleo e parcialmente ao redor do flagelo, do qual estão separadas pelo canal citoplasmático (fig 32A-F). Na região diametralmente oposta a região em que se encontram as mitocôndrias, apenas uma bainha delimita o canal citoplasmático (fig 32A-B). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico 9+2 microtúbulos. A membrana no segmento final do flagelo possui sutis projeções laterais que lhe conferem um aspecto crenado.

- *Markiana nigripinnis*

No espermatozóide de *Markiana nigripinnis* o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 1,8 μ m no sentido longitudinal e 1,38 μ m no sentido transversal (fig 33A-B). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétrón-lúcidas. As áreas elétrón-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve a região superior do núcleo (fig 33A-B). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, lateral e abriga parte do centríolo proximal (fig 33A e detalhe). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 33B e detalhe). A peça intermediária tem 1,70 μ m de largura é assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,51 μ m. Essa assimetria é decorrente da rotação incompleta do núcleo e conseqüente inserção lateral do flagelo. As mitocôndrias são poucas, longas e ramificadas e concentram-se na região basolateral do núcleo, a partir do início do canal citoplasmático (fig 33G-I). O sistema túbulo-vesicular circunda a base do núcleo, concentra-se na região diametralmente oposta àquela ocupada pelas mitocôndrias, além de estar presente na base e na periferia do restante da peça intermediária (fig 33A-J). É constituído por túbulos e vesículas que em corte transversal tem aspecto alveolar e conectam-se a membrana. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins.

- *Boehlkea fredcochui*

No espermatozóide de *Boehlkea fredcochui* o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 2,0 μ m no sentido longitudinal e 1,52 μ m no sentido transversal (fig 34A-B). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma com algumas vesículas envolve o núcleo (fig 34A-C). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, lateral e abriga parte do centríolo proximal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 34A). Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 2,39 μ m de largura é fortemente assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,60 μ m. Essa assimetria é decorrente da rotação incompleta do núcleo e conseqüente inserção lateral do flagelo (fig 34A-B). As várias mitocôndrias são ligeiramente alongadas e concentram-se no maior lado da peça intermediária, a partir do início do canal citoplasmático (fig 34A-B, E-I). O sistema túbulo-vesicular é constituído por grandes vesículas alongadas e muito dilatadas que se distribuem periféricamente ao núcleo e a peça intermediária (fig 34A-K). Outras vesículas menores encontram-se entremeadas nas mitocôndrias. Além destes o sistema possui conjuntos de túbulos que em corte transversal tem aspecto rendilhado (fig 34A-B, J). Os túbulos e vesículas conectam-se entre si e eventualmente com a membrana plasmática. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins.

- *Bryconamericus exodon*

No espermatozóide de *Bryconamericus exodon* o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 1,5 μ m no sentido longitudinal e 1,2 μ m no sentido transversal (fig 35A). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve a região superior do núcleo (fig 35A). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, lateral e abriga parte do centríolo proximal. Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 1,56 μ m de largura é fortemente assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,17 μ m (fig 35A). Essa assimetria é decorrente da rotação incompleta do núcleo e conseqüente inserção lateral do flagelo. As várias mitocôndrias são ligeiramente alongadas e distribuem-se a partir do início canal citoplasmático no maior lado da peça intermediária (fig 35A-F, I-M). O sistema túbulo-vesicular circunda a base do núcleo, concentra-se na região diametralmente oposta àquela ocupada pelas mitocôndrias, além de estar presente na base e na periferia do restante da peça intermediária (fig 35A-F, I-M). O sistema de túbulos e vesículas tem aspecto rendilhado ao corte transversal e conectam-se entre si e eventualmente com a membrana plasmática (fig 35E, M). No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 35 detalhe).

- *Creagutus* sp.

No espermatozóide de *Creagutus* sp. o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 1,5 μ m no sentido longitudinal e 1,13 μ m no sentido transversal (fig 36A-B). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são frequentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve a região superior do núcleo (fig 36A-C). A fossa nuclear é dupla, muito rasa, lateral e abriga parte do centríolo proximal (fig 36A-C). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (fig 36A). Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 1,88 μ m de largura é fortemente assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,47 μ m (fig 36A-K). Essa assimetria é decorrente da rotação incompleta do núcleo e conseqüente inserção lateral do flagelo. As várias mitocôndrias são ligeiramente alongadas, e concentram-se no maior lado da peça intermediária, a partir do início do canal citoplasmático (fig 36A-H). O sistema túbulo-vesicular circunda a base do núcleo, concentra-se na região diametralmente oposta àquela ocupada pelas mitocôndrias, além de estar presente na base e na periferia do restante da peça intermediária (fig 36A-K). É constituído por amplas vesículas alongadas e por conjuntos de túbulos com aspecto rendilhado (fig 36D, M e H) ao corte transversal e que conectam-se entre si e eventualmente com a membrana plasmática. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins (fig 36 K).

- *Piabina anhembi*

No espermatozóide de *Piabina anhembi* o núcleo é levemente alongado em direção ao flagelo e tem comprimento médio de 1,94 μ m no sentido longitudinal e 1,64 μ m no sentido transversal (fig 37A). A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas. As áreas elétron-lúcidas têm formato esférico e são freqüentemente pequenas, mas algumas maiores estão sempre presentes. Uma estreita faixa de citoplasma sem organelas envolve a região superior do núcleo. A fossa nuclear é dupla, muito rasa, lateral e abriga parte do centríolo proximal. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal. Fibrilas de ancoragem conectam os centríolos um ao outro, ao envoltório nuclear e à membrana plasmática. A peça intermediária tem 2,05 μ m de largura é fortemente assimétrica e curta, com comprimento médio de 1,13 μ m (fig 37A, C-K). A assimetria é decorrente da rotação incompleta do núcleo e conseqüente inserção lateral do flagelo. As várias mitocôndrias são ligeiramente alongadas e concentram-se no maior lado da peça intermediária, a partir do início do canal citoplasmático (fig 37A, C-K). O sistema túbulo-vesicular é pouco desenvolvido e localiza-se entre as mitocôndrias (fig 37A-K). Além deste, existem vesículas grandes, alongadas e muito dilatadas com distribuição periférica desde a região médio-basal do núcleo e ao longo de toda a peça intermediária (fig 37A, B-H). As vesículas conectam-se entre si, com o sistema túbulo vesicular e eventualmente com a membrana plasmática. No flagelo, o axonema contém o arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e a membrana flagelar não possui projeções laterais ou fins.

Figura 14- Espermatozóide de *Astyanax jordani*

Espermatozóides em corte longitudinal **A**: barra= 0,48µm **B**: barra= 0,65µm **C**: barra= 0,65µm. Peça intermediária em corte transversal **D**: barra= 0,48µm **E**: barra= 0,48µm **F**: barra= 0,48µm **G**: barra= 0,48µm **H**: barra= 0,48µm foto-montagem **I**: barra= 0,65µm **J**: barra= 0,65µm

n: núcleo, **p**: centríolo proximal, **d**: centríolo distal, **m**: mitocôndria, **v**: vesícula e *: flagelo

Figura 15- Espermatozóide de *Astyanax bockmanni*

Espermatozóide em corte longitudinal **A**: barra= 0,75µm Peça intermediária. Corte oblíquo **B**: barra= 0,43µm. Corte transversal **C**: barra= 0,43µm. **D**: barra= 0,17µm **E**: barra= 0,43µm **F**: barra= 0,43µm **G**: barra= 0,12µm

n: núcleo, **p**: centríolo proximal, **d**: centríolo distal, **m**: mitocôndria, **v**: vesícula e *: flagelo

Figura 16- Espermatozóide de *Astyanax fasciatus*

Espermatozóide em corte longitudinal **A:** barra= 0,65µm **B:** barra= 0,65µm Peça intermediária em corte transversal **C:** barra= 0,43µm. **D:** barra= 0,48µm **E:** barra= 0,65µm **F:** barra= 0,43µm **G:** barra= 0,48µm **H:** barra= 0,48µm **I:** barra= 0,43µm **J:** barra= 0,65µm **K:** barra= 0,43µm **L:** barra= 0,65µm **M:** barra= 0,48µm **N:** barra= 0,43µm **O:** barra= 0,31µm

n: núcleo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *****: flagelo

Figura 17- Espermatozóide de *Deuterodon singularis*

Espermatozóide em corte longitudinal **A:** barra= 0,43µm **Detalhe:** barra= 0,21µm Peça intermediária. Corte oblíquo **B:** barra= 0,43µm. Corte transversal **C:** barra= 0,43µm. **D:** barra= 0,43µm **E:** barra= 0,58µm **F:** barra= 0,43µm **G:** barra= 0,58µm **Detalhe:** barra= 0,21µm.

n: núcleo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *****: flagelo

Figura 18- Espermatozóide de *Hyphessobrycon anisitsi*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58 μ m **B:** barra= 0,75 μ m **Detalhe:** barra= 0,58 μ m Peça intermediária em corte transversal **C:** barra= 0,43 μ m. **D:** barra= 0,43 μ m **E:** barra= 0,43 μ m **F:** barra= 0,58 μ m **G:** barra= 0,43 μ m **H:** barra= 0,43 μ m **I:** barra= 0,43 μ m **J:** barra= 0,43 μ m **K:** barra= 0,43 μ m

n: núcleo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e ***:** flagelo

Figura 19- Espermatozóide de *Hyphessobrycon bifasciatus*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58 μ m **Detalhe:** barra= 0,29 μ m **B:** barra= 0,75 μ m. Peça intermediária em corte transversal **C:** barra= 0,58 μ m. **D:** barra= 0,58 μ m **E:** barra= 0,58 μ m **F:** barra= 1,1 μ m **G:** barra= 0,75 μ m **H:** barra= 0,58 μ m **I:** barra= 0,75 μ m **J:** barra= 0,75 μ m **K:** barra= 0,43 μ m **Detalhe:** barra= 0,21 μ m

n: núcleo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e ***:** flagelo

Figura 20- Espermatozóide de *Hyphessobrycon columbianus*

Espermatozóides em corte longitudinal **A**: barra= 0,58 μ m **B**: barra= 0,43 μ m Peça intermediária em corte transversal **C**: barra= 0,43 μ m. **D**: barra= 0,43 μ m **E**: barra= 0,43 μ m **F**: barra= 0,43 μ m **G**: barra= 0,31 μ m **H**: barra= 0,31 μ m. **I**: barra= 0,43 μ m (foto-montagem) **J**: barra= 0,43 μ m **K**: barra= 0,43 μ m

n: núcleo, **c**: centríolo, **p**: centríolo proximal, **d**: centríolo distal, **m**: mitocôndria, **v**: vesícula e *: flagelo

Figura 21- Espermatozóide de *Hyphessobrycon hebertaxelrodi*

Espermatozóides em corte longitudinal **A**: barra= 0,75 μ m **B**: barra= 0,75 μ m corte transversal do núcleo e da peça intermediária em **C**: barra= 0,43 μ m. **D**: barra= 0,43 μ m **E**: barra= 0,43 μ m **F**: barra= 0,43 μ m **G**: barra= 0,43 μ m **H**: barra= 0,43 μ m **I**: barra= 0,43 μ m **J**: barra= 0,43 μ m **K**: barra= 0,43 μ m **L**: barra= 0,43 μ m **M**: barra= 0,43 μ m **N**: barra= 0,43 μ m **O**: barra= 0,31 μ m

n: núcleo, **c**: centríolo, **p**: centríolo proximal, **d**: centríolo distal, **m**: mitocôndria, **v**: vesícula e *: flagelo

Figura 22- Espermatozóide de *Hyphessobrycon* sp.

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58µm **B:** barra= 0,43µm Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária **C:** barra= 0,43µm. **D:** barra= 0,58µm **E:** barra= 0,43µm **F:** barra= 0,58µm **G:** barra= 0,43µm **H:** barra= 0,43µm **I:** barra= 0,43µm **J:** barra= 0,43µm **K:** barra= 0,43µm **L:** barra= 0,43µm **M:** barra= 0,43µm **N:** barra= 0,31µm

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 23- Espermatozóide de *Inpaichthys kerri*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58µm **Detalhe:** barra= 0,21µm **B:** barra= 0,58µm Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária **C:** barra= 0,43µm. **D:** barra= 0,58µm **E:** barra= 0,43µm **F:** barra= 0,43µm **G:** barra= 0,43µm **H:** barra= 0,43µm **I:** barra= 0,43µm **J:** barra= 0,43µm

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 24- Espermatozóide de *Oligosarcus paranensis*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,75µm **Detalhe:** barra= 0,29µm **B:** barra= 0,43µm **C:** barra= 0,75µm Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **D:** barra= 0,75µm **E:** barra= 0,58µm **F:** barra= 0,43µm **G:** barra= 0,43µm **H:** barra= 0,43µm **I:** barra= 0,43µm **J:** barra= 0,75µm **K:** barra= 0,75µm **L:** barra= 0,43µm **M:** barra= 0,43µm

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 25- Espermatozóide de *Pristella maxillaris*

Espermatozóide em corte longitudinal **A:** barra= 1,11µm **Detalhe:** 0,29µm Cortes transversais da peça intermediária **B:** barra= 0,43µm **C:** barra= 0,43µm. **D:** barra= 0,43µm **E:** barra= 0,31µm **F:** barra= 0,43µm (foto-montagem) **G:** barra= 0,31µm

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 26- Espermatozóide de *Bryconella pallidifrons*

Espermatozóide em corte longitudinal **A:** barra= 0,75 μ m **Detalhe:** barra= 0,21 μ m Cortes transversais da peça intermediária. **B:** barra= 0,43 μ m **C:** barra= 0,43 μ m **D:** barra= 0,43 μ m **E:** barra= 0,43 μ m **F:** barra= 0,43 μ m (foto-montagem) **G:** barra= 0,43 μ m **H:** barra= 0,43 μ m **I:** barra= 0,43 μ m **J:** barra= 0,58 μ m **K:** barra= 0,43 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e
*: flagelo

Figura 27- Espermatozóide de *Paracheirodon axelrodi*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58 μ m **B:** barra= 0,58 μ m **C:** barra= 0,75 μ m Cortes oblíquos da peça intermediária e do núcleo **D:** barra= 0,58 μ m detalhe: 0,29 **E:** barra= 0,43 μ m Cortes transversais da peça intermediária. **F:** barra= 0,58 μ m **G:** barra= 0,58 μ m **H:** barra= 0,75 μ m **I:** barra= 0,58 μ m **J:** barra= 0,58 μ m **K:** barra= 0,58 μ m **L:** barra= 0,43 μ m **M:** barra= 0,43 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e
*: flagelo

Figura 28- Espermatozóide de *Gymnocorymbus ternetzi*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58µm **B:** barra= 0,58µm Cortes transversais da peça intermediária. **C:** barra= 0,43µm **D:** barra= 0,43µm **E:** barra= 0,43µm **F:** barra= 0,43µm **G:** barra= 0,43µm **H:** barra= 0,43µm **I:** barra= 0,43µm **J:** barra= 0,58µm **K:** barra= 0,43µm **L:** barra= 0,43µm **M:** barra= 0,43µm **N:** barra= 0,43µm

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 29- Espermatozóide de *Gymnocorymbus sp. n.*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,43µm **B:** barra= 0,43µm Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **C:** barra= 0,43µm **D:** barra= 0,43µm **E:** barra= 0,43µm **F:** barra= 0,43µm

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 32- Espermatozóide de *Moenkhausia dichroua*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,75 μ m **B:** barra= 0,58 μ m **Detalhe:** barra= 0,37 μ m Corte oblíquo **C:** barra= 0,75 μ m Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **D:** barra= 0,43 μ m **E:** barra= 0,58 μ m **F:** barra= 0,75 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e ***:** flagelo

Figura 33- Espermatozóide de *Markiana nigripinis*

Espermatozóide em corte longitudinal **A:** barra= 0,43 μ m **Detalhe:** barra= 0,29 μ m Corte oblíquo **B:** barra= 0,58 μ m Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **C:** barra= 0,58 μ m **D:** barra= 0,58 μ m **E:** barra= 0,58 μ m **F:** barra= 0,58 μ m **G:** barra= 0,58 μ m **H:** barra= 0,58 μ m **I:** barra= 0,58 μ m **J:** barra= 0,58 μ m **K:** barra= 0,21 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e ***:** flagelo

Figura 34- Espermatozóide de *Boehlkea fredcochui*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58 μ m **B:** barra= 0,43 μ m Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **C:** barra= 0,58 μ m **D:** barra= 0,58 μ m **E:** barra= 0,58 μ m **F:** barra= 0,58 μ m **G:** barra= 0,58 μ m **H:** barra= 0,43 μ m **I:** barra= 0,58 μ m **J:** barra= 0,58 μ m **K:** barra= 0,75 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 35- Espermatozóide de *Bryconamericus exodon*

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,75 μ m **Detalhe:** barra= 0,15 μ m **B:** barra= 0,31 μ m **C:** barra= 0,58 μ m **D:** barra= 0,31 μ m **E:** barra= 0,31 μ m Corte oblíquo **F:** barra= 0,43 μ m Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **G:** barra= 0,75 μ m **H:** barra= 0,58 μ m **I:** barra= 0,43 μ m **J:** barra= 0,31 μ m **K:** barra= 0,31 μ m **L:** barra= 0,31 μ m **M:** barra= 0,31 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e *: flagelo

Figura 36- Espermatozóide de *Cregrutus* sp.

Espermatozóides em corte longitudinal **A:** barra= 0,58 μ m **B:** barra= 0,43 μ m **C:** barra= 0,43 μ m
Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **D:** barra= 0,43 μ m **E:** barra= 0,43 μ m **F:**
barra= 0,43 μ m **G:** barra= 0,43 μ m **H:** barra= 0,43 μ m **I:** barra= 0,58 μ m **J:** barra= 0,43 μ m **K:**
barra= 0,43 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e ***:**
flagelo

Figura 37- Espermatozóide de *Piabina anhembi*

Espermatozóide em corte longitudinal **A:** barra= 0,58 μ m Cortes transversais do núcleo e da peça
intermediária. **B:** barra= 0,58 μ m **C:** barra= 0,58 μ m **D:** barra= 0,43 μ m **E:** barra= 0,43 μ m Corte
oblíquo **F:** barra= 0,43 μ m **G:** barra= 0,43 μ m **H:** barra= 0,43 μ m **I:** barra= 0,43 μ m **J:** barra=
0,43 μ m **K:** barra= 0,43 μ m

n: núcleo, **c:** centríolo, **p:** centríolo proximal, **d:** centríolo distal, **m:** mitocôndria, **v:** vesícula e ***:**
flagelo

Figura 30- Espermatozóide de *Moenkhausia oligolepis*

Espermatozóides em corte longitudinal **A**: barra= 0,75µm **B**: barra= 0,75µm Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **C**: barra= 0,58µm **D**: barra= 0,58µm **E**: barra= 0,75µm **F**: barra= 0,58µm **G**: barra= 0,58µm **H**: barra= 0,58µm **I**: barra= 0,58µm **J**: barra= 0,43µm **K**: barra= 0,43µm **L**: barra= 0,43µm **M**: barra= 0,43µm **N**: barra= 0,43µm **O**: barra= 0,43µm

n: núcleo, **c**: centríolo, **p**: centríolo proximal, **d**: centríolo distal, **m**: mitocôndria, **v**: vesícula e *: flagelo

Figura 31- Espermatozóide de *Moenkhausia bonita*

Espermatozóides em corte longitudinal **A**: barra= 0,58µm **B**: barra= 0,58µm Cortes transversais do núcleo e da peça intermediária. **C**: barra= 0,58µm **D**: barra= 0,43µm **E**: barra= 0,58µm **F**: barra= 0,58µm **G**: barra= 0,58µm **H**: barra= 0,58µm **I**: barra= 0,58µm **J**: barra= 0,58µm **K**: barra= 0,58µm **L**: barra= 0,58µm **F**: barra= 0,29µm

n: núcleo, **c**: centríolo, **p**: centríolo proximal, **d**: centríolo distal, **m**: mitocôndria, **v**: vesícula e *: flagelo

Lista de Caracteres Para os Gêneros Incertae Sedis em Characidae

ESTRUTURA TESTICULAR

1- Testículo tubular anastomosado:

- (0) sem secreção
- (1) com secreção

ESPERMIOGÊNESE

1-Tipo de espermiogênese

- (0) tipo I
- (1) tipo II

2-Rotação nuclear na espermiogênese do tipo I

- (0) total / igual a 90°
- (1) parcial /superior a 10°
- (2) parcial / igual ou inferior a 10°

ESPERMATOZÓIDE

Núcleo

1-Formato do núcleo

- (0) esférico
- (1) levemente alongado no sentido anterior
- (2) levemente alongado em direção ao flagelo

2-Aspecto final da cromatina

- (0) granular
- (1) flocular

3-Áreas elétron-lúcidas

- (0) várias de pequenas dimensões
- (1) várias de pequenas dimensões e algumas maiores

4-Faixa citoplasmática ao redor do núcleo

- (0) sem vesículas
- (1) com vesículas

5-Posição em relação ao flagelo

- (0) medial
- (1) levemente excêntrico
- (2) excêntrico
- (3) fortemente excêntrico
- (4) lateral

Fossa nuclear

6-Posição

- (0) medial
- (1) levemente excêntrica
- (2) excêntrica
- (3) fortemente excêntrica
- (4) lateral

7-Profundidade da fossa nuclear

- (0) rasa
- (1) muito rasa

Complexo centriolar

8-Posição em relação a fossa nuclear

- (0) centríolo proximal inserido e distal parcialmente inserido na fossa nuclear
- (1) centríolo proximal e distal parcialmente inseridos na fossa nuclear
- (2) somente o centríolo proximal inserido na fossa nuclear

9-Posição relativa dos centríolos

- (0) centríolo proximal anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal
- (1) centríolo proximal maior, anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal
- (2) centríolo proximal anterior e lateral em relação ao centríolo distal
- (3) centríolo proximal paralelo e oblíquo em relação ao centríolo distal

10-Fibrilas de ancoragem

- (0) não conspícua
- (1) conspícua

Peça intermediária

11-Comprimento da peça intermediária

- (0) curta (1,0 - 2,0 μm)
- (1) intermediária (2,0 - 3,0 μm)
- (2) longa (acima de 3,0 μm)

12-Simetria da peça intermediária em relação ao flagelo

- (0) simétrica
- (1) ligeiramente assimétrica
- (2) assimétrica
- (3) fortemente assimétrica

13- Bainha citoplasmática

- (0) presente
- (1) ausente

14- Comprimento da bainha citoplasmática

- (0) curta (até 1,0 μm)
- (1) intermediária (1,0 - 2,0 μm)
- (2) longa (acima de 2,0 μm)

Mitocôndrias

15- Quantidade

- (0) algumas
- (1) várias
- (2) inúmeras

16- Formato da mitocôndria

- (0) esférica
- (1) levemente alongada
- (2) alongada
- (3) longa
- (4) longa e ramificada

17-Localização das mitocôndrias

- (0) somente no terço anterior da peça intermediária
- (1) nos dois terços anteriores da peça intermediária
- (2) por toda a peça intermediária

18-Distribuição das mitocôndrias

- (0) somente na região interna da peça intermediária
- (1) somente em um dos lados da peça intermediária
- (2) no maior lado da peça intermediária
- (3) ao longo e preferencialmente em um dos lados da peça intermediária
- (4) no maior lado da peça intermediária a partir do canal citoplasmático
- (5) ao redor do centríolo distal e do flagelo

Vesículas na peça intermediária

19-Quantidade

- (0) algumas
- (1) várias
- (2) inúmeras

20-Características

- (0) sistema túbulo-vesicular
- (1) sistema túbulo-vesicular e vesículas
- (2) túbulos
- (3) túbulos e vesículas
- (4) vesículas
- (5) cisterna interposta entre membranas e vesículas
- (6) sistema túbulo-vesicular e túbulos

21-Localização do sistema de túbulos e vesículas

- (0) ao redor da base do núcleo
- (1) desde a região médio-basal do núcleo
- (2) nos dois terços anteriores da peça intermediária
- (3) no maior lado da peça intermediária
- (4) por toda a peça intermediária

22-Distribuição do sistema de túbulos e vesículas

- (0) inicialmente periférica e no sentido longitudinal
- (1) periférica
- (2) periférica e nos dois terços anteriores concentra-se na região diametralmente oposta àquela em que se encontram as mitocôndrias
- (3) periférica no terço anterior e aleatoriamente nos dois terços posteriores
- (4) até o início da bainha citoplasmática

23- Conexão

- (0) não conectadas
- (1) conectadas entre si
- (2) conectadas entre si e a membrana plasmática

Sistema túbulo-vesicular

24- Características ao corte transversal

- (0) sem uma organização característica
- (1) rendilhado
- (2) alveolar

25-Localização do sistema túbulo-vesicular

- (0) por toda a peça intermediária
- (1) no menor lado da peça intermediária
- (2) no maior lado da peça intermediária
- (3) entre as mitocôndrias
- (4) desde a base do núcleo

26-Distribuição

- (0) sem organização
- (1) muito desenvolvido na região inicial da peça intermediária e progressivamente menos desenvolvido ao seu término
- (2) concentra-se na região diametralmente oposta às mitocôndrias
- (3) periférica e concentra-se na região diametralmente oposta às mitocôndrias
- (4) periférica, concentra-se na região diametralmente oposta às mitocôndrias e é progressivamente mais desenvolvido no terço posterior

27-Conexão com a membrana plasmática

- (0) não conectadas
- (1) conectadas

Túbulos

28-Tipos:

- (0) concêntricos
- (1) não concêntricos

29-Localização

- (0) na região anterior da peça intermediária
- (1) por toda a peça intermediária
- (2) por toda a peça intermediária até o início da bainha citoplasmática

30-Distribuição

- (0) ao redor do centríolo distal e da região inicial do flagelo
- (1) em um dos lados da peça intermediária
- (2) aleatória

Vesículas

31-Dimensão

- (0) pequena
- (1) intermediária
- (2) grande
- (3) grande e dilatada

32- Quantidade

- (0) algumas
- (1) várias
- (2) inúmeras

33- Localização

- (0) no terço posterior
- (1) por toda a peça intermediária

34-Distribuição

- (0) no maior lado da peça
- (1) entre as mitocôndrias
- (2) periféricamente ao núcleo e a peça intermediária
- (3) periféricamente ao longo de toda a peça intermediária desde a região médio basal do núcleo
- (4) até o início da bainha citoplasmática

35-Conexão

- (0) não conectadas
- (1) conectadas entre si
- (2) conectadas entre si e a membrana plasmática

36- Características do sistema de túbulos e vesículas

- (0) túbulos e vesículas
- (1) túbulos delgados e justapostos em arranjo similar a favos de mel
- (2) cisterna interposta entre membranas
- (3) somente vesículas interconectadas que formam grandes vesículas
- (4) túbulos delgados e pequenas vesículas que se interconectam entre si

Flagelo

37-Vesículas no segmento inicial do flagelo

- (0) ausentes
- (1) presentes

38-Membrana flagelar

- (0) aspecto crenado
- (1) aspecto não crenado



ESTRUTURA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE

Conforme proposto por Grier (1993) e confirmado por Parenti e Grier (2004), os testículos do tipo tubular anastomosado são característicos dos Osteichythes mais basais, incluindo os Teleostei mais basais, como os Ostariophysii. Considerando a proposta dos autores supra citados, as espécies de Characidae *incertae sedis* aqui analisadas, e aquelas analisadas por Mojica (2007), compartilham o mesmo tipo de estrutura testicular, isto é, possuem testículos do tipo tubular-anastomosado. No estudo de Parenti e Grier (2004) o único representante da ordem Characiformes analisado foi *Gymnocorymbus ternetzi*, coincidentemente um Characidae *incertae sedis*.

A despeito de todos os táxons analisados compartilharem a mesma estrutura testicular, a presença de uma secreção de provável natureza protéica no interior dos cistos contendo espermátides finais e no compartimento luminal é compartilhada por um grupo restrito. *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Cregrutus* sp., *Piabina anhembi*, *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni*, *Astyanax fasciatus*, alguns *Hyphessobrycon* (presente estudo), *Bryconops affinis* (ANDRADE *et al.*, 2001) e *Tetragonopterus argenteus* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) são os únicos táxons descritos até o momento que compartilham esta característica. A presença da secreção pode ser mais uma característica reprodutiva masculina a ser incorporada nas análises cladísticas com o intuito de investigar as suas implicações filogenéticas.

A espermatogênese nos Teleostei pode transcorrer integralmente no interior dos cistos (Grier, 1981) ou ser semi-cística (MATTEI *et al.*, 1993). Em todas as espécies analisadas a espermiogênese é cística, ou seja, a diferenciação de espermátide em espermatozóide ocorre no interior de cistos no epitélio germinativo. O mesmo tipo de espermatogênese também foi encontrado em *Bryconops affinis* (ANDRADE *et al.*, 2001), *Gymnocorymbus ternetzi*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Hyphessobrycon eques* (MOJICA, 2007), todos pertencentes à subfamília Tetragonopterinae (*sensu* GÉRY, 1977). Até o momento, não existem relatos de espermatogênese semi-cística na ordem Characiformes.

ESPERMIOGÊNESE

Entre os peixes teleósteos, o desenvolvimento do flagelo nas espermatídes é geralmente lateral e nos espermatozóides pode posicionar-se paralela ou perpendicularmente ao núcleo. Estas posições resultam da ocorrência ou não da rotação nuclear em relação ao flagelo que caracteriza dois tipos de espermiogênese, tipo I e II, respectivamente (MATTEI, 1970). A espermiogênese e os espermatozóides nos gêneros *incertae sedis* em Characidae e na subfamília Tetragonopterinae são do tipo I (JAMIESON, 1991; ANDRADE *et al.*, 2001; VICENTINI, 2002; GUSMÃO-POMPIANI, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA *et al.*, 2006; PECIO *et al.*, 2007 e MOJICA, 2007). A principal variação neste tipo de espermiogênese refere-se ao grau de rotação nuclear. Nas espécies estudadas, a rotação nuclear é incompleta e ocorre em dois níveis resultando em dois tipos de espermatozóides. Apesar de na maioria das espécies estudadas o espermatozóide ser claramente do tipo I, em que o flagelo varia de levemente excêntrico a excêntrico, os espermatozóides de *Moenkhausia dichroua*, *Markiana nigripinnis*, *Boehlkea fredcochui*, *Bryconamericus exodon*, *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembí* têm um aspecto intermediário entre o tipo I e II. Isto se deve ao fato de que a rotação nuclear neste grupo estaciona no seu início e conseqüentemente apenas uma pequena parte do núcleo avança sobre o complexo centriolar, de forma que o flagelo torna-se lateral em relação ao núcleo. A análise comparativa da espermiogênese, mostra que ontogenia do espermatozóide nos diferentes grupos é determinante para o entendimento da sua estrutura final.

ESPERMATOZÓIDE

Gênero *Astyanax*

Apesar da natureza problemática do gênero (VARI E CASTRO, 2007), as três espécies analisadas obedecem ao mesmo padrão de espermatozóide. *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni* e *Astyanax fasciatus* compartilham 32 dos 36 caracteres analisados. As diferenças encontradas referem-se à posição relativa dos centríolos, comprimento, quantidade e característica das vesículas na peça intermediária. Em *A. jordani* e *A. bockmanni* o centríolo proximal é anterior e lateral em relação ao centríolo distal e a peça intermediária é curta. Em *A. fasciatus* o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal e a peça intermediária é de dimensão intermediária. Em *A. bockmanni* o sistema túbulo-vesicular é menos desenvolvido, não apresentando vesículas de grandes dimensões conectadas a membrana plasmática no terço posterior da peça intermediária.

Conforme Géry (1977), o gênero *Deuterodon* está relacionado com alguns *Astyanax*. Para Eigenmann (1927) *Deuterodon iguape* (espécie-tipo) é muito similar a *Astyanax fasciatus*. O espermatozóide de *D. singularis*, aqui analisado, é muito diferente dos de *A. jordani*, *A. bockmanni* e *A. fasciatus* compartilhando apenas características relacionadas ao núcleo, a posição relativa dos centríolos, a distribuição das mitocôndrias na peça intermediária e ao flagelo. Segundo Lucena e Lucena (2002) alguns dos caracteres utilizados na identificação do gênero *Deuterodon* ocorrem em outros gêneros *incertae sedis* em Characidae. A fim de retratar a íntima relação entre suas espécies, os autores restringiram a definição de *Deuterodon*. Dela foram excluídas *D. pedri*, *D. parahybae*, *D. nasutrus*, e *D. potaroensis* as quais compartilham vários caracteres com *Astyanax* e *Hyphessobrycon*. A complexidade dos gêneros *Deuterodon* e *Astyanax* pede uma ampliação das descrições dos espermatozóides até que um banco de dados mais robusto possa ser constituído de forma a permitir uma análise mais elucidativa.

Gênero *Moenkhausia*

Conforme proposto por Costa (1994) e reconhecido por Benine (2004), *Moenkhausia oligolepis* e *Moenkhausia sanctaefilomenae* são intimamente relacionadas entre si devido às escamas laterais do corpo possuírem uma borda escura e exibirem um padrão de colorido reticulado; a presença de uma faixa negra sobre a porção terminal do pedúnculo caudal e sobre a base da nadadeira caudal que é precedida por uma área clara no pedúnculo caudal. O compartilhamento de uma ampla mancha no pedúnculo caudal, dentes multicuspidados no maxilar, fenestra formada pelos ossos metapterigóide e quadrado horizontalmente alongada, além do espinho supra-occipital não atingir a vertical que passa pela face anterior da primeira vértebra aparecem como uma sinapomorfias do clado 19 de Benine (2004). Os espermatozóides de *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) compartilham todos os 36 caracteres analisados e são congruentes com a hipótese de Benine (2004).

Em uma análise comparativa, os espermatozóides de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003), *Moenkhausia oligolepis*, *Moenkhausia bonita* e *Moenkhausia dichroua* compartilham 18 dos 36 caracteres analisados. A cromatina é altamente condensada, tem aspecto granular e é entremeada por várias áreas elétron-lúcidas nas três espécies analisadas. A rotação nuclear é gradualmente menor em *M. oligolepis*, *M. bonita* e *M. dichroua*. O núcleo torna-se gradualmente mais alongado em direção ao flagelo e mais excêntrico até tornar-se lateral em *M. dichroua*. A fossa nuclear em *M. oligolepis* e em *M. bonita* varia de excêntrica a fortemente excêntrica e abriga parte dos centríolos proximal e distal. Em *M. dichroua* a fossa nuclear é lateral e abriga apenas parte do centríolo proximal. As mitocôndrias são alongadas em *M. oligolepis* e em *M. bonita* e esféricas em *M. dichroua*. A peça intermediária é gradualmente menor e o sistema de vesículas gradualmente menos desenvolvido em *M. oligolepis*, *M. bonita* e *M. dichroua*. Segundo Benine (2004) o gênero *Moenkhausia* não constitui uma unidade monofilética. Aparentemente, ocorre nas espécies analisadas uma perda gradual da rotação nuclear que leva ao deslocamento do complexo centriolar e conseqüentemente do flagelo e da peça intermediária.

Gênero *Hyphessobrycon*

Segundo Lima *et al.* (2003), o gênero *Hyphessobrycon* possui uma natureza complexa e, provavelmente, é não monofilético. Os espermatozóides de *Hyphessobrycon* sp. *H. anisitsi*, *H. bifasciatus*, *H. columbianus*, *H. herbertaxelrodi* (presente estudo) e *H. eques* (Gusmão-Pompiani, 2003) compartilham 12 dos 36 caracteres analisados. Os 12 caracteres compartilhados referem-se, principalmente às características do núcleo e da fossa nuclear. As características da peça intermediária como simetria e comprimento, tipos e distribuição das mitocôndrias e vesículas associadas às características do flagelo constituem um conjunto de variações inter-específicas. A ultraestrutura dos espermatozóides dos táxons de *Hyphessobrycon* descritas até o momento sugere que o grupo, de fato, não constitui uma unidade monofilética.

Segundo Benine (2004) *Hyphessobrycon herbertaxelrodi* possui uma estreita relação de parentesco com *Hyphessobrycon eques*. Os espermatozóides de *H. herbertaxelrodi* e *H. eques* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) apresentam as mesmas características relacionadas ao núcleo, a posição dos centríolos um em relação ao outro, ao formato das mitocôndrias e ao flagelo e, diferem quanto à inserção dos centríolos na fossa nuclear, ao comprimento da peça intermediária e ao sistema de túbulos e vesículas e sua distribuição. Com base na ultraestrutura dos espermatozóides analisados *H. eques* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) provavelmente está mais relacionado com *Hyphessobrycon* sp. e com *Tetragonopterus argenteus* do que com *H. herbertaxelrodi* e outros táxons do gênero. Ainda considerando os espermatozóides, *H. eques* pode, de fato, estar mais relacionado com os “rosy tetras” (informação pessoal), que para Weitzman e Palmer (1997), compreendem um grupo provavelmente monofilético.

Conforme proposto por Eigenmann (1917), reconhecido por Benine (2004) e por Calcagnotto *et al.* (2005), o gênero *Hyphessobrycon* está relacionado com algumas formas de *Hemigrammus*. Os espermatozóides de *Hemigrammus erythrozonus* (PECIO *et al.*, 2007), *Hyphessobrycon bifasciatus*, *H. columbianus* e *H. herbertaxelrodi* são muito semelhantes quanto as características do núcleo, da fossa nuclear, do complexo centriolar e do comprimento da peça intermediária. O compartilhamento de tais características é congruente com as hipóteses supra citadas nas quais *Hemigrammus* pode estar relacionado com alguns *Hyphessobrycon*. As principais diferenças entre estas espécies estão relacionadas à constituição e distribuição do sistema de túbulos e vesículas na peça intermediária e especialmente às características do flagelo. Em *Hemigrammus erythrozonus* o flagelo não possui vesículas no citoplasma e tampouco as sutis projeções laterais de membrana como encontrada em alguns *Hyphessobrycon*. Estas formas de *Hyphessobrycon* podem, portanto, estar mais relacionadas entre si do que com *Hemigrammus erythrozonus* (PECIO *et al.*, 2007).

Gênero *Gymnocorymbus*

Segundo Benine (2004), *G. ternetzi* e *G. thayeri* são mais relacionados entre si e poderiam estar relacionados com *Stichonodon*, *Poptella*, algumas *Moenkhausia* (*M. levidorsa*) e *Tetragonopterus*. Segundo Ferreira (2007) *G. ternetzi* está mais relacionado com *Poptella longipinnis* do que com *Stichonodon*, *Moenkhausia levidorsa* e *Tetragonopterus*. Os espermatozóides de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n. compartilham todos os 36 caracteres analisados, sendo congruentes com a hipótese de estreita relação proposta por Benine (2004). Entretanto, os espermatozóides de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n são muito diferentes dos espermatozóides de *Poptella paraguayensis* e *Tetragonopterus argenteus*.

O núcleo de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n é levemente alongado no sentido anterior, característica não compartilhada com *Poptella paraguayensis* e *Tetragonopterus argenteus* cujo núcleo é esférico. Alguns cheirodontíneos como *Serrapinus notomelas* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003), *Compsura heterura* (OLIVEIRA, 2007) e *Macropsobrycon uruguayanae* (BURNS *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2008) possuem núcleo alongado no sentido anterior. O comprimento da peça intermediária e o sistema de túbulos e vesículas de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n não se assemelham aos de *Poptella paraguayensis* e *Tetragonopterus argenteus*. *Poptella paraguayensis* possui uma peça intermediária longa com uma bainha citoplasmática e algumas vesículas de dimensão intermediária que se distribuem até o início da bainha citoplasmática. *Tetragonopterus argenteus* possui uma peça intermediária de dimensão intermediária e com um sistema túbulo-vesicular distribuído ao longo da peça intermediária, preferencialmente na região diametralmente oposta àquelas em que se encontram as mitocôndrias. *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp.n possuem uma peça intermediária curta e um sistema túbulo-vesicular que nos dois terços anteriores concentra-se na região diametralmente oposta àquelas em que se encontram as mitocôndrias e é progressivamente mais desenvolvido no terço posterior.

A retirada do gênero *Gymnocorymbus* da subfamília Tetragonopterinae (*sensu* Géry) para o status *incertae sedis* na família Characidae (REIS *et al.*, 2003) é congruente com as diferenças detectadas na ultraestrutura dos espermatozóides desse gênero e *Tetragonopterus argenteus*. Além disso, as características dos espermatozóides das espécies de *Gymnocorymbus* analisadas não são compartilhadas com nenhum outro caracídeo, até então descrito.

Bryconella pallidifrons* versus *Pristella maxillaris

Segundo Géry (1977), *Bryconella pallidifrons* é muito parecida com *Hemigrammus*, do qual difere por não possuir osso pós-orbital e dentes pré-maxilares muito irregulares. Em alguns espécimes de *B. pallidifrons* as duas fileiras de dentes são confundidas com uma única fileira irregular como em *Pristella* e *Paracheirodon*, dentre outros gêneros similares (GÉRY, 1977). A ultraestrutura dos espermatozóides de *Bryconella pallidifrons* e *Pristella maxillaris* é muito similar, diferindo em apenas dois caracteres dos 36 analisados. Em *Pristella maxillaris* o centríolo proximal é levemente anterior e oblíquo em relação ao distal e a peça intermediária é assimétrica. Em *Bryconella pallidifrons* o centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao distal e a peça intermediária é fortemente assimétrica assim como em *Hemigrammus erythrozonus* (PECIO *et al.*, 2007). *Hemigrammus erythrozonus* só difere de *B. pallidifrons* pela ausência de uma cisterna perifericamente localizada ao longo da peça intermediária. Os espermatozóides de *B. pallidifrons*, *P. maxillaris* compartilham muitas características entre si e com *H. erythrozonus* (PECIO *et al.*, 2007) sugerindo uma estreita relação de parentesco entre estes táxons.

Paracheirodon axelrodi compartilha com *B. pallidifrons*, *P. maxillaris* e *H. erythrozonus* apenas características referentes ao núcleo, fossa nuclear e ao comprimento da peça intermediária e difere quanto ao formato e distribuição das mitocôndrias na peça intermediária bem como a constituição do sistema de túbulos e vesículas. Além disso, *P. axelrodi* possui um anel elétron-denso do qual irradiam uma grande quantidade de microtúbulos na região anterior dos centríolos e o centríolo proximal é mais longo que o centríolo distal. Estas características não são compartilhadas com nenhum outro Characidae *incertae sedis*. Considerando os espermatozóides, *Paracheirodon axelrodi* não teria uma relação tão próxima com *B. pallidifrons* e *P. maxillaris* como sugerido por Géry (1977). Em contrapartida, *P. axelrodi* e *P. innesi* estariam mais relacionados entre si do que com *P. simulans* (= *Hyphessobrycon simulans*) (WEITZMAN E FINK, 1983; GÉRY E MAHNERT, 1986). Embora uma descrição do espermatozóide de *P. innesi* esteja disponível (Jamieson 1991) o seu detalhamento, infelizmente, não é suficiente para a condução de uma análise comparativa.

Inpaichthys kerri

Segundo Géry e Junk (1976) *Inpaichthys kerri* difere de todos os tetragonopteríneos (*sensu* Géry), sendo um gênero difícil de situar. A sua definição compartilha muitos caracteres com *Hyphessobrycon* (*sensu lato*), mas difere em muitos outros, especialmente quanto à dentição. Os autores relatam que sua dentição é muito semelhante à de *Bryconella pallidifrons*, mas estes não parecem pertencer à mesma linhagem filogenética. Segundo Calcagnotto *et al.* (2005), *I. kerri* está relacionado com *Astyanax*, *Astyanacinus*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e *Moenkhausia* que, em sua análise, aparece como grupo-irmão. O espermatozóide de *I. kerri* compartilha poucas características com os espermatozóides dos demais gêneros de fertilização externa em Characidae *incertae sedis*. As características se restringem ao núcleo e a constituição do sistema de túbulos e vesículas. O espermatozóide de *Inpaichthys* não assemelha-se aos espermatozóides de *Bryconella pallidifrons*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e especialmente aos espermatozóides de *Moenkhausia* descritos até o momento.

Oligosarcus paranensis

Segundo Menezes (1988) o gênero *Oligosarcus* provavelmente constitui uma unidade monofilética e está mais relacionado com alguns tetragonopteríneos (*sensu* GÉRY) do que com *Brycon*. Esta hipótese foi corroborada por Ribeiro (2007) em seu estudo de revisão do gênero *Oligosarcus*. Na análise de Ribeiro (2007) *Oligosarcus* está relacionado com *Astyanax*, *Tetragonopterus* e *Bryconops*. Em linhas gerais, os espermatozóides de *Astyanax*, *Tetragonopterus argenteus* e alguns *Hyphessobrycon* assemelham-se ao espermatozóide de *O. paranensis*. Entretanto, algumas características da peça intermediária como assimetria e sistema de túbulos e vesículas não são compartilhadas com nenhum outro táxon. A análise comparativa dos espermatozóides é congruente com as hipóteses de Menezes (1998) e Ribeiro (2007) na qual *Oligosarcus* está intimamente relacionado com alguns dos tetragonopteríneos (*sensu* GÉRY).

Tetragonopterus argenteus versus *Hyphessobrycon*, *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Paracheirodon*, *Bryconella pallidifrons*, *Pristella maxillaris*, *Deuterodon singularis*, *Inpaichthys kerri* e *Oligosarcus paranensis* e *Gymnocorymbus*

Géry (1977) define a subfamília Tetragonopterinae (*sensu lato*) como o grupo mais bem sucedido da família Characidae e a subdivide em seis grupos artificiais. Pela falta de evidências que suportassem a monofilia do grupo, Tetragonopterinae foi reduzida por Reis (2003) a apenas seu gênero tipo, *Tetragonopterus*. Calcagnotto *et al.* (2005) corroboraram a hipótese de não monofilia do grupo. O espermatozóide de *Tetragonopterus argenteus* e os espermatozóides dos tetragonopteríneos (*sensu* Géry) compartilham apenas algumas características como formato do núcleo, compactação da cromatina, formato da fossa nuclear e arranjo do flagelo. Tamanha diversidade na estrutura espermática reflete a complexidade do grupo conforme já apontado por diferentes autores e confirmado por Calcagnotto *et al.* (2005).

Em linhas gerais, os espermatozóides de quase todos os táxons aqui analisados assemelham-se ao espermatozóide de *Tetragonopterus argenteus*, com exceção de *Gymnocorymbus ternetzi*, *Gymnocorymbus* sp.n. e *Bryconamericus exodon*, *Markiana nigripinis*, *Boehlkea fredcochui*, *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembi*. Essas semelhanças referem-se especialmente às características do núcleo, da fossa nuclear, das mitocôndrias e do arranjo do axonema. Os táxons relacionados a *T. argenteus* podem, no entanto, ser divididos em dois subgrupos de acordo com as características da peça intermediária. O primeiro grupo seria constituído por *Deuterodon singularis*, *Hyphessobrycon columbianus*, *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*, *Pristella maxillaris*, *Bryconella pallidifrons*, *Paracheirodon axelrodi*, *Moenkhausia oligolepis* (presente estudo), *Hemigrammus erythrozonus* (Pecio *et al.*, 2007) e *Moenkhausia sanctaefilomenae* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) que compartilham a presença de uma peça intermediária que varia de assimétrica a fortemente assimétrica, longa e com uma bainha citoplasmática (superior a 2,0µm), além de um sistema de túbulos e vesículas menos desenvolvidos e de menor diâmetro que concentra-se preferencialmente na região anterior e num dos lados da peça intermediária. O segundo grupo, por sua vez, congregaria *Astyanax jordani*, *Astyanax bockmanni*, *Astyanax fasciatus*, *Hyphessobrycon anisitsi*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Hyphessobrycon* sp., *Inpaichthys kerri*, *Oligosarcus paranensis*, *Moenkhausia bonita* (presente estudo) e *H. eques* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003). Nesse segundo grupo a peça intermediária varia de curta a intermediária com um sistema de túbulos e vesículas mais desenvolvido e de maior diâmetro. Embora no segundo grupo na dependência do tipo, quantidade e distribuição das vesículas tornem a peça intermediária diversificada, o grupo como um todo parece estar mais relacionado com *Tetragonopterus argenteus* do que as espécies contidas no primeiro grupo.

Por outro lado, os espermatozóides de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp. n. são muito semelhantes entre si e, diferem daqueles descritos até o momento. *Gymnocorymbus* pode, portanto, constituir um grupo natural, cujas relações com *Tetragonopterus argenteus* e demais tetragonopteríneos (*sensu* Géry) ainda carecem ser melhor esclarecidas.

Bryconamericus exodon*, *Boehlkea fredcochui*, *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembi* versus *Markiana nigripinnis

Os espermatozóides de *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembi* compartilham 35 dos 36 caracteres analisados, sendo congruentes com a hipótese de Vari e Harold (2001) na qual *Piabina* aparece como grupo-irmão de *Cregrutus*. A única diferença está no aspecto do sistema túbulo-vesicular ao corte transversal que em *Cregrutus* sp. tem um aspecto rendilhado e em *P. anhembi* não possui uma organização característica.

Os espermatozóides de *Bryconamericus stramineus* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) e *Bryconamericus exodon* são idênticos e congruentes com as hipóteses de estreita relação entre estes táxons (SERRA E LANGEANI, 2006 e FERREIRA, 2007). Segundo Serra e Langeani (2006) *B. exodon*, *B. stramineus* e *B. turiuba*. são mais relacionados entre si e possuem uma combinação exclusiva de estados de caracteres dentro do gênero.

Segundo Malabarba e Weitzman (2003) a presença de quatro dentes na série interna do pré-maxilar e ii, 8 raios na nadadeira dorsal é uma sinapomorfia para um grupo denominado clado A. Este clado é constituído pela subfamília Glandulocaudinae e pelos gêneros *Cyanocharax*, *Attonitus*, *Boehlkea*, *Bryconacidnus*, *Bryconamericus*, *Caiapobrycon*, *Ceratobranchia*, *Cregrutus*, *Hemibrycon*, *Hipobrycon*, *Knodus*, *Microgenys*, *Monotocheiroidon*, *Odontostoechus*, *Othonocheiroidus*, *Piabarchus*, *Piabina*, *Rhinobrycon* e *Rhinopetita*. Calcagnotto *et al.* (2005) em seu estudo sobre as relações entre os Characiformes com base em características moleculares e Ferreira (2007) numa revisão do gênero *Knodus* corroboraram esta hipótese. As diferenças entre os espermatozóides de *Bryconamericus stramineus* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003), *Bryconamericus exodon*, *Boehlkea fredcochui*, *Cregrutus* sp., *Piabina anhembi* e *Markiana nigripinnis* (presente estudo) restringem-se apenas ao sistema de túbulos e vesículas e as mitocôndrias que são longas e ramificadas em *Markiana nigripinnis* e alongadas em *Boehlkea fredcochui*. *Markiana nigripinnis* compartilha 25 dos 36 caracteres analisados nos espermatozóides de alguns táxons do clado A, além da presença de quatro dentes na série interna do pré-maxilar (informações pessoais). A similaridade dos espermatozóides é congruente com a hipótese de Malabarba e Weitzman (2003) na qual estes táxons podem constituir um grupo mais relacionado entre si do que com os demais gêneros *incertae sedis* em Characidae.

Comentários Gerais

A análise dos dados obtidos mostra que em Characidae *incertae sedis*:

- a espermatogênese cística e os testículos do tipo tubular anastomosado são comuns a todas as espécies analisadas. Entretanto, a presença de secreção pode ser mais uma característica reprodutiva masculina a ser incorporada nas análises cladísticas com o intuito de investigar as suas implicações filogenéticas;

- a complexidade dos gêneros *Deuterodon* e *Astyanax* pede uma ampliação das descrições dos espermatozoides até que um banco de dados mais robusto possa ser constituído de forma a permitir uma análise mais elucidativa;

- a ultraestrutura dos espermatozoides é congruente com a estreita relação de *Moenkhausia oligolepis* e *Moenkhausia sanctafilomenae* sugerida por Costa (1994) e Benine (2004);

- para Benine (2004) o gênero *Moenkhausia* não constitui uma unidade monofilética. Porém, nas espécies analisadas, aparentemente ocorre uma perda gradual da rotação nuclear que leva ao deslocamento do complexo centriolar e conseqüentemente do flagelo e da peça intermediária. Considerando tal gradação, *M. oligolepis*, *M. bonita* e *M. dichrourea* podem estar mais relacionadas do que proposto por Benine (2004).

- a ultraestrutura dos espermatozoides dos táxons de *Hyphessobrycon* descritas até o momento suporta a hipótese de que o gênero *Hyphessobrycon* possui uma natureza complexa e, provavelmente, não é monofilético (LIMA *et al.*, 2003).

- com base na ultraestrutura dos espermatozoides analisados, *Hyphessobrycon eques* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) está mais relacionado com *Hyphessobrycon* sp. e com *Tetragonopterus argenteus* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003) do que com *H. herbertaxelrodi* e outros táxons do gênero. Os dados obtidos a partir da ultraestrutura dos espermatozoides não concordam com a hipótese de Benine (2004), no qual *Hyphessobrycon herbertaxelrodi* possui uma estreita relação de parentesco com *Hyphessobrycon eques*.

- conforme proposto por Eigenmann (1917), reconhecido por Benine (2004) e por Calcagnotto e colaboradores (2005), o gênero *Hyphessobrycon* está relacionado com algumas formas de *Hemigrammus*. Com base na ultraestrutura dos espermatozoides analisados estas formas de *Hyphessobrycon* parecem estar mais relacionadas entre si do que com *Hemigrammus erythrozonus* (PECIO *et al.*, 2007).

- segundo Benine (2004), *Gymnocorymbus* é monofilético e está relacionado com *Stichonodon*, *Poptella*, algumas *Moenkhausia* (*M. levidorsa*) e *Tetragonopterus*. Com base na ultraestrutura dos espermatozoides a retirada de *Gymnocorymbus* da subfamília

Tetragonopterinae (*sensu* Géry) para o status *incertae sedis* na família Characidae (Reis e colaboradores, 2003) foi uma decisão acertada. Os espermatozóides de *Gymnocorymbus ternetzi* e *Gymnocorymbus* sp. n. são muito semelhantes entre si suportando a hipótese de Benine (2004) na qual o gênero pode constituir um grupo natural. Os espermatozóides das duas espécies de *Gymnocorymbus* são muito diferentes dos espermatozóides de *Poptella paraguayensis* e *Tetragonopterus argenteus* e não suportam a hipótese de Benine (2004) na qual estes gêneros estariam relacionados. Entretanto, sua relação com *Tetragonopterus argenteus* e demais tetragonopteríneos (*sensu* Géry) ainda carecem ser melhor esclarecidas.

- segundo Géry (1977), *Bryconella pallidifrons* é muito parecida com *Hemigrammus*, e sua dentição pode ser confundida com *Pristella* e *Paracheirodon*, dentre outros gêneros parecidos com *Pristella*. Os espermatozóides de *B. pallidifrons*, *P. maxillaris* compartilham muitas características entre si e com *H. erythrozonus* (Pecio e colaboradores, 2007) sugerindo uma estreita relação de parentesco entre estes táxons. Entretanto, com base na ultraestrutura dos espermatozóides, *Paracheirodon axelrodi* não estaria intimamente relacionada com *B. pallidifrons* e *P. maxillaris*.

- o espermatozóide de *Inpaichthys* não se assemelham aos espermatozóides de *Bryconella pallidifrons*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e especialmente com os de *Moenkhausia* descritos até o momento, não concordando com a hipótese de Calcagnotto e colaboradores (2005) de que estes táxons estariam relacionados.

-O espermatozóide de *Tetragonopterus argenteus*, com exceção de *Gymnocorymbus ternetzi*, *Gymnocorymbus* sp.n. e *Bryconamericus exodon*, *Markiana nigripinis*, *Boehlkea fredcochui*, *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembi* assemelha-se, em linhas gerais, aos espermatozóides de todos os demais táxons analisados;

- os espermatozóides de *Cregrutus* sp. e *Piabina anhembi* são muito semelhantes e suportam a hipótese de Vari e Harold (2001) na qual *Piabina* aparece como grupo-irmão de *Cregrutus*;

- segundo Serra e Langeani (2006), *Bryconamericus exodon*, *Bryconamericus stramineus* e *Bryconamericus turiuba* compartilham algumas características exclusivas no gênero. Os espermatozóides de *B. stramineus* (Gusmão-Pompiani, 2003) e *B. exodon* são idênticos, e apesar do espermatozóide de *B. turiuba* ainda não ser conhecido, os dados disponíveis concordam com a proposta de Serra e Langeani (2006) de que estas espécies poderiam formar um grupo dentro do gênero.

- a similaridade entre os espermatozóides de *Bryconamericus stramineus* (Gusmão-Pompiani, 2003), *Bryconamericus exodon*, *Boehlkea fredcochui*, *Cregrutus* sp., *Piabina anhembi* concorda com a hipótese de Malabarba e Weitzman (2003) que estes táxons podem

constituir um grupo mais relacionado entre si do que com os demais gêneros *incertae sedis* em Characidae;

- as características do espermatozóide de *Markiana nigripinnis* indica que a espécie pode estar mais relacionada com o grupo denominado por Malabarba e Weitzman (2003) como clado A do até então suposto. Soma-se a isto o fato de que *M. nigripinnis* compartilha com os componentes do clado A a presença de apenas quatro dentes na série interna do pré-maxilar;

-tamanho diversidade na estrutura espermática nas espécies analisadas reflete a complexidade do grupo conforme já apontado por diferentes autores e confirmado Calcagnotto e colaboradores (2005);

- apesar da ultraestrutura dos espermatozóides constituir-se indiscutivelmente numa nova ferramenta auxiliar na compreensão das relações entre gêneros pertencentes a uma mesma família, a compreensão da ontogênese é imprescindível para o correto entendimento da estrutura final das células espermáticas.

Conclusão



- Com base nas características ultraestruturais dos espermatozoides os vinte e quatro táxons, aqui analisados, anteriormente alocados na subfamília Tetragnopterinae podem ser divididos em dois grupos. Um primeiro grupo correspondente ao clado A e um segundo correspondente a parte dos “Tetragnopterinae” conforme Weitzman e Malabarba (2003). O segundo grupo, a parte dos Tetragnopterinae Weitzman e Malabarba (2003), pode ser dividido em dois subgrupos de acordo com as características da peça intermediária. O primeiro subgrupo é mais homogêneo e o segundo mais heterogêneo na dependência do tipo, quantidade e distribuição das vesículas presentes na peça intermediária. O segundo subgrupo como um todo parece estar mais relacionado com *Tetragnopterus argenteus* do que as espécies contidas no primeiro subgrupo;

Referências bibliográficas

- ABILHOA, V. E DULBOC, L. F. A new species of the freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v.1587, p.43–52, 2007.
- AIRES, E.D.; STEFANINI, M.A. E ORSI, M.A. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermátides de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2000.
- AMARAL, A.A. Aspectos ultra-estruturais da espermatogênese do piaçu *Leporinus macrocephalus* Garavello e Bristski, 1988 (Teleostei, Characiformes, Anostomidae). 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- ANDRADE, R.F., BAZZOLI, N., RIZZO, E. *et al.* Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue and Cell**, v.33, p.524–532, 2001.
- AZEVEDO, M.A. Análise comparada de caracteres reprodutivos em três linhagens de Characidae (Teleostei: Ostariophysi) com inseminação. 2004. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BACCETTI, B., BURRINI, A.G., CALLAINI, G., *et al.* Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. **Gamete Research**, v.10, p.373-396, 1984.
- BENINE, R. C. Análise filogenética do gênero Moenkhausia Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) com uma revisão dos táxons do alto Rio Paraná. 2004. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BENINE, R. C. E LOPES, G. A. M. A new species of *Hemigrammus* Gill, 1858 (Characiformes: Characidae) from Río Caura, Venezuela. **Zootaxa** v.1610, p.53–59, 2007.
- BURNS, J.R., WEITZMAN, S.H., LANGE, K.R. *et al.* Sperm ultrastructure in characid fishes (Teleostei, Ostariophysi). Pp. 235-244. In: MALABARBA, L. R., REIS, R. E., VARI, R. P., Lucena, Z. M. S. e Lucena, C. A. S. (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. 235-244p
- BURNS, J. R.; WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. *et al.* Sperm modifications in inseminating ostariophysan fishes, with new documentation of inseminating species, p. 255. In: B. NORBERG, O.S. KJESBU, G.L. TARANGER, E. ANDERSSON AND S.O. STEFANSSON (Eds.). **Proc. Sixth Inter. Symp. Reprod. Physiol. Fish.** Inst. Mar. Res. and Univ. Bergen, Bergen, Norway. 2000.
- BURNS, J.R., MEISNER A.D., WEITZMAN, S.H. *et al.* Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating cathfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae). **Copeia** v.1, p.173-179, 2002.

- BURNS, J.R. E WEITZMAN, S.H. Insemination in ostariophysian fishes. In: GRIER, H.J. AND URIBE, M.C., (Eds.). **Viviparous Fishes**. Homestead Florida, New Life Publications, p.107-134, 2005.
- CALCAGNOTTO, D.; SCOTT, A. S. E DE SALLE. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.36, p.135–153, 2004.
- CRUZ-LANDIM, C., ABDALLA, F.C. E CRUZ-HÖFLING, M.A. Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **BioCell** v.27, p.319-328, 2003.
- EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool.**, v.43, n.2, p.103-208, 1917.
- EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool.**, v.43, n.3, p.209-310, 1921.
- EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool.**, v.43, n.4, p.311-428, 1927.
- FERREIRA, K. M.; Análise Filogenética e Revisão Taxonômica do Gênero Knodus Eigenmann, 1911 (Characiformes: Characidae). 2007. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, USP. Ribeirão Preto. São Paulo.
- FINK, S.V. E FINK, W.L. Interrelationships of the ostariophysian fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnaeus Society**, London, v.72, p.297-353, 1981.
- FRANÇA, G.F., OLIVEIRA, C. E QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Gymnotus cf. anguillaris* and *Brachyhyopomus cf. pinnicaudatus* (Teleostei: Gymnotyformes). **Tissue and Cell**, v.39, p.131-139, 2007.
- GÉRY, J. **Characoids of the World**. 1.ed. U.S.A. T.F.H. Publications Inc Ltd, 1977. 672p.
- GÉRY, J. The savannah tetra: *Hyphessobrycon stegemanni* sp. nov. **Tropical Fish Hobbyist**, v.9, n.9, p.7-13, 1961.
- GÉRY, J E JUNK, W. J. *Inpaichthys kerri* n. g. n. sp. um novo peixe caracídeo do alto Rio Aripuanã, Mato Grosso, Brasil. **Acta Amazônica** v.7, n.3, p.417-422, 1977.
- GRIER, H. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, v.21, p.345-357, 1981.
- GRIER, H.J. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **Journal of Experimental Zoology** v.261, p.151-162, 1992.
- GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSEL, L.D. E GRISWOLD, M.D. (Eds.). **The Sertoli cell**. Florida, Cache River Press. p.704-730, 1993.

- GUSMÃO, P.. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da ordem Characiformes, família Characidae (Teleostei; Ostariophysi): uma abordagem filogenética. 2003. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HENNIG, W. **Phylogenetics systematics**. Urbana, University of Illinois Press. 1966.
- JAMIESON, B.G.M. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. 1.ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1991. 171p
- JAVONILLO, R.; BURNS, J. R. E WEITZMAN, S. H. Reproductive morphology of *Brittanichthys axelrodi* (Teleostei: Characidae), a miniature inseminating fish from South America. **Journal of morphology**, v.268, p.23-32, 2007.
- LAVOUÉ, S.; MIYA, M.; INOUE, J. G *et al.*. Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: Implications for higher-level relationships within the Otocephala. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.37, p.165–177, 2005.
- LIMA, F.C.T., MALABARBA, L.R., BUCKUP, P.A., *et al.* Genera Incertae Sedis in Characidae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., E FERRARIS, C.J., (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA)** Porto Alegre, Edipucrs. p.106-169, 2003.
- LUCENA, C. A. S. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). 1993. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Brasil.
- LUCENA, C. A. S. E LUCENA, Z. M. S. Redefinição do gênero *Deuterodon* Eigenmann (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Comunicações do Museu Ciência Tecnologia (PUC/RS)**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 113-135, 2002.
- LUCINDA, P. H. F.; MALABARBA, L. R. E BENINE R. C. On a new species of the genus *Moenkhausia* Eigenmann (Ostariophysi: Characidae). **Zootaxa**. v.1525, p.61-68, 2007.
- MAGALHÃES, A.L.B. DE Gametogenesis e reprodução de *Galeocharax knerii* (Steindachner, 1879) (Pisces, Characidae) nos reservatórios de Furnas e Itumbiara: estudo biométrico, histológico e ultra-estrutural. (1998). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MALABARBA, L.R., R.E. REIS.; R.P. VARI.; Z.M. *et al.* **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. 1. ed. Porto Alegre, Edipucrs. 1998.
- MALABARBA, L. R. E WEITZMAN, S. H. Description of a new genus with six species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comn. Mus. Ciên. PUCRS, Ser. Zool**. v.16, n.01, p.67-151, 2003.

- MATOS, E., MATOS, P., OLIVEIRA, E. *et al.* Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas** v.10, p.7-10, 1993.
- MATOS, E., MATOS, P., SANTOS, M.N.S. *et al.* Aspectos morfológicos e uultraestruturais do espermatozóide de *Curimata inornata* Vari, 1989 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. **Acta Amazonica** v.28, p.449-453, 1998.
- MATOS, E., MATOS, P., CORRAL, L. *et al.* Ultrastructure of the spermatozoon of *Leporinus friderici* Bloch, 1794 (Pisces, Teleostei) from the Amazon River. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém v.31, p.93-99, 1999a.
- MATOS, E., SANTOS, M. N. S., CORRAL, L. *et al.* Ultrastructural aspects of the spermatozoon of *Hoplerythrinus unitaeniatus* Spix, 1829 (Pisces, Teleostei, Erythrinidae) from the Amazon Region. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém v.32, p.27-32, 1999b.
- MATOS, E., MATOS, P., CORRAL, L. e Azevedo, C.. Estrutura fina do espermatozóide de *Acestrorhyncus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** v.17, p.747-752, 2000.
- MATTEI, X. Spermio genése des poisson.. In: BACCETTI, B. (Ed.). **Comparative Spermatology** New York, Academic Press. p.57-72, 1970.
- MATTEI, X., The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biology of the Cell** v.63, p151-158, 1988.
- MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal of Zoology** v.69, p.3038-3055, 1991.
- MATTEI, X.; MARCHAND, B.; THIAW, O.T. Unusual midpiece in the spermatozoon of the teleost fish, *Citharinus sp.* **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology** v.27, p.189-191, 1995.
- MENEZES, N.A. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. **Academia Brasileira de Ciências**. p.295-303, 1988.
- MIRANDE, J. M. (2007). Filogenia de Characidae (Teleostei, Characiformes) y optimización autopesada. VII Reunión Argentina de Cladística y Biogeografía. **Darwiniana**. 45: 19-22.
- MOJICA, C. A. P. Morfologia Testicular e Estrutura da Espermatogênese em Peixes Ornamentais Tetra Negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; Tetra Amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e Mato Grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei, Characiformes). 2007. Tese (Doutorado). Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.

- MOREIRA, C.R. Relações Filogénéticas em Iguanodectinae (Characidae; Characiformes; Teleostei). Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. p.276, 2002.
- NELSON, J.S. **Fishes of the World**. New York. 3. ed. John Wiley and Sons. 1994. p.600
- NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 4. ed. New York, John Wiley and Sons. 2006. p. 601
- ORTÍ, G. E MEYER, A. Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among Euteleost fishes. **Mol. Biol. Evol.** v.13, n.4, p. 556-573, 1996.
- OLIVEIRA, C. L. C. Análise comparada da ultraestrutura dos espermatozoides e morfologia da glândula braquial em espécies de Cheirodontinae (Characiformes: Characidae). 2007. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 136p.
- PARENTI, L.R. E GRIER, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v.44, p.333-348, 2004.
- PECIO, A. E RAFINSKI, J. Spermiogenesis in *Mimagoniates barberi* (Teleostei, Ostariophysi, Characidae), an oviparous, internally fertilizing fish. **Acta Zoologica** v.80, p.35-45, 1999.
- PECIO, A. Spermiogenesis and fine structure of the spermatozoon in a headstander, *Chilodus punctatus* (Teleostei, Characiformes, Anostomidae). **Folia biologica** (Kraków) v.51, p.55-62, 2003.
- PECIO, A., BURNS, J.R. E WEITZMAN, S.H. Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating species *Tytocharax cochui*, *T. tambopatensis*, and *Scopaeocharax rhinodus* (Pisces: Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae: Xenobryconini). **Journal of Morphology** v.263, p.216-226, 2005.
- PECIO, A., BURNS, J. R. E WEITZMAN, S. H. Comparison of spermiogenesis in externally fertilizing *Hemigrammus erythrozonus* and the inseminating *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**. v.5, n.4, p.457-470, 2007.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I., GAMEIRO, M.C., SCHNEIDER, T. MALABARBA, L.R. *et al.* Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. **Neotropical Ichthyology** v.1, p.35-45, 2003.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I., NEGRÃO, J. N. C., CARVALHO, E. D. e Foresti, F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). **Journal of Fish Biology** v.59, p.1494-1502, 2001.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. E OLIVEIRA, C. A new type of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Pimelodidae with a comparative review on spermatozoa ultrastructure of the Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoologischer Anzeiger**. v.1, p1-12. 2008.

- QUINTERO-HUNTER, I; GRIER; H. E MUSCATO, M. Enhancement of Histological Detail Using Metanil Yellow as Counterstain in Periodic Acid Schiff's Hematoxylin Staining of Glycol Methacrylate Tissue Sections. ***Biotechnic and Histochemistry*** V.66 n 4, p. 169-172.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. E FERRARIS, C. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA)** Porto Alegre, Edipucrs. 2003. 729p
- RIBEIRO, A. C. Filogenia e biogeografia do gênero *Oligosarcus* Günther, 1864 (Ostariophysi; Characidae). 2007. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu. Botucatu, São Paulo.
- ROMAGOSA, E., NARAHARA, M. Y., BORELLA, M. I., Pariera, S. F. e Fenerich-Verani, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). ***Tissue and Cell*** v.31, p.540-544, 1999.
- SERRA, J. P. E LANGEANI, F. Redescrição e osteologia de *Bryconamericus exodon* Eigenmann, 1907(Ostariophysi, Characiformes, Characidae). ***Biota Neotropica*** v.6, n.3, 2006. Disponível em–www.biotaneotropica.org.br/v6n3/pt/abstract?article+bn01906032006
- SHAHIN, A.A.B. Semicystic spermatogenesis and biflagellate spermatozoon ultrastructure in the Nile electric catfish *Malapterurus electricus* (Teleostei: Siluriformes: Malapteruridae). ***Acta Zoologica*** v.87, p.215-227, 2006a.
- SHAHIN, A.A.B. Spermatogenesis and spermatozoon ultrastructure in the Nile Pebbyfish *Alestes dentex* (Teleostei: Characiformes: Alestidae) in Egypt. ***World Journal of Zoology*** v.1, p.1-16, 2006b.
- SPADELLA, M.A., OLIVEIRA, C. E QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ocurrence of biflagellate spermatozoa in Cetopsidae, Aspredinidae, and Nematogenyidae (Teleostei: Ostariophysi). ***Zoomorphology*** v.125, p.135-145, 2006a.
- SPADELLA, M.A., OLIVEIRA, C. E QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermogenesis and introsperm ultrastructure of *Scoloplax distolothrix* (Teleostei: Siluriformes: Scoloplacidae). ***Acta Zoologica*** (Stockholm) v.87, p.341-348, 2006b.
- SPADELLA, M.A. Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei, Siluriformes) com base na ultraestrutura dos espermatozoides. 2007.Tese (Doutorado). Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- VARI, R.P. **Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review.** In: MALABARBA, L.R., R.E. REIS.; R.P. VARI.; *et al.* (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.** Porto Alegre, Edipucrs. 1998. p.111-122.

- VARI, R.P. E HAROLD, A.S. **Phylogenetic study of the neotropical fish genera *Creagrutus* Gunter and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the Cis-Andean species.** Smithsonian Institution Press. 2001. 239p.
- VARI, R. P. E CASTRO, R. C. M. New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper Rio Paraná system, Brazil. **Copeia**. v.1, p.150-162, 2007.
- VERÍSSIMO-SILVEIRA, R., GUSMÃO-POMPIANI, P., VICENTINI, C.A. *et al.* Spermogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) **Acta Zoológica (Stockholm)** v.87. 2006.
- VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Estudo filogenético da sub-ordem Characoidei (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes) com base na ultraestrutura dos espermatozoides. 2007. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- VICENTINI, C. A. Estrutura comparativa da espermatogênese em peixes neotropicais, *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phallaceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei). 2002. Tese (livre-docência). Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru.
- WEITZMAN, S. H. E PALMER, L. A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from the Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative “rosy tetra clade”. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**. v.7, n.3, p.209-242, 1997.
- WEITZMAN, S.H., MENEZES, N.A., EVERS, H.-G. e Burns, J.R. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology** v.3, p.329-360, 2005.
- ZANATA, A. M. Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Muller e Troschel. 2000. 358f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ZAIDEN, S. F. Morfologia gonadal e metabolismo energético da piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual. 2000. Tese (Doutorado). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.