

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maria Angélica Spadella

**ESTUDO FILOGENÉTICO NA SUPERFAMÍLIA
LORICARIOIDEA (TELEOSTEI: SILURIFORMES) COM
BASE NA ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZÓIDES**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia
Celular.**

**Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto
Co-orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

- Sp11e** **Spadella, Maria Angélica**
Estudo filogenético na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes)
com base na ultraestrutura dos espermatozóides / Maria Angélica Spadella. -
-
Campinas, SP:[s.n.], 2004.
- Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto
Co-Orientador: Claudio de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.
- Morfologia. 2. Evolução. 3. Peixe. I. Quagio-Grassiotto, Irani.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 18 de fevereiro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto (Orientadora)

(Assinatura)

Prof. Dr. José Lino Neto

(Assinatura)

Prof. Dr. Mário César Cardoso de Pinna

(Assinatura)

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

(Assinatura)

... à minha vontade de continuar

*Quando não houver saída,
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída,
Nenhuma idéia vale uma vida.
Quando não houver esperança,
Quando não restar nem ilusão,
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós, algo de uma criança.*

*Enquanto houver sol, enquanto houver sol,
Ainda haverá...
Enquanto houver sol, enquanto houver sol.*

*Quando não houver caminho,
Mesmo sem amor, sem direção,
A sós ninguém está sozinho,
É caminhando que se faz o caminho.
Quando não houver desejo,
Quando não restar nem mesmo dor,
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós, aonde Deus colocou.*

*Enquanto houver sol, enquanto houver sol,
Ainda haverá...*

Sérgio Britto

Meus agradecimentos

- À Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto pela orientação, amizade, incentivo, ajuda e pelos ensinamentos durante este trabalho;
- Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira pela orientação, atenção, dedicação, ajuda, amizade e pelos ensinamentos;
- À Profa. Dra. Maria Dalva Cesario pela ajuda, preocupação, conselhos em vários momentos e pela eterna amizade;
- Ao Prof. Dr. Mário C. C. de Pinna, ao Prof. Dr. Flávio Alicino Bockmann e ao Prof. Dr. Odair Aguiar Junior, pela disponibilidade e contribuições dadas a este trabalho no decorrer da banca prévia;
- Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade e por ter aceitado fazer parte da banca de defesa;
- Ao Prof. Dr. Marcelo Ribeiro de Britto pelas conversas e sugestões dadas a este trabalho;
- Ao Prof. Dr. Edmir Daniel Carvalho pela oportunidade de participação nas coletas em Buritama e em Paraguaçu Paulista;
- Ao Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu pela acolhida nos últimos seis anos e pelo uso das instalações para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Departamento de Biologia Celular, I.B., UNICAMP pela oportunidade de realização da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural;

- Aos técnicos do Laboratório de Rotina em Biologia Celular e de Reprodução de Peixes Neotropicais, Depto. de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, Antônio Vicente Salvador e Ricardo André dos Santos Teixeira, pela colaboração no processamento do material e nas coletas;
- Ao técnico do Laboratório de Genética e Citogenética de Peixes, Depto. Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, Renato Devidé, pela ajuda nas coletas;
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu e à sua supervisora Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório, pela utilização das instalações;
- Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu, Claudete dos Santos Tardivo, Maria Euleda Lino Peres, Maria Helena Moreno e Nivalde Antônio Basso, pela amizade e grande auxílio técnico prestados no decorrer deste trabalho;
- À Líliam Alves Senne Panagio, secretária do Depto. de Biologia Celular, I.B., UNICAMP, pela imensa ajuda e amizade;
- À Patrícia Luciane Souza Ramos e à Luciana Cristina Montes, secretárias do Depto. de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, pela colaboração;
- Às agências financiadoras, FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro destinado a este trabalho;
- Aos meus pais, César e Amélia e aos meus avós, Clóvis e Nilza, pelo carinho, ajuda, educação que tive e pelo incentivo constante;
- Aos meus outros familiares, minha tia Nilza e meus primos, Neto e Marco, pela colaboração e apoio;

- À toda família Ramos de Andrade, em especial, à Dona Roseli, pela imensa ajuda durante os últimos anos;
- Ao Glauco pelo carinho, atenção, compreensão e ajuda. Obrigada por sempre me incentivar e querer o melhor para mim;
- Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais, I.B., UNESP, Botucatu, Ariene, Fernanda, Gian, Gisleine, Márcio, Priscila, Rafael e Rosicleire, pela ajuda, companheirismo e pelo bate-papo;
- Aos amigos que não estão mais no laboratório, Maria Carolina, Tatiana e Rinaldo, pela ajuda e pela amizade;
- Aos outros amigos dos Laboratórios de Genética e Citogenética e de Ecologia de Peixes, em especial, à Adriana, Ana Paula, Cristiane, Daniela, Érica, Igor e Márcio, pela ajuda sempre oferecida, pelo carinho e pelas risadas;
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Ordem Siluriformes	2
1.2. Superfamília Loricarioidea	5
1.3. Estrutura testicular e espermatogênese em peixes	11
1.4. Classificação da espermiogênese em peixes	14
1.5. Classificação dos espermatozóides em peixes	15
1.6. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides em peixes teleósteos e sua implicações filogenéticas	18
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Material	30
3.2. Métodos	
3.2.1. Análise ultraestrutural	31
3.2.2. Análise filogenética	33

4. RESULTADOS

4.1. Análise ultraestrutural

4.1.1. Família Trichomycteridae, subfamília Trichomycterinae 38

4.1.2. Família Callichthyidae, subfamília Corydoradinae 42

4.1.3. Família Loricariidae, subfamília Loricariinae 44

4.1.4. Família Cetopsidae, subfamília Cetopsinae 45

4.2. Análise filogenética

4.2.1. Lista de caracteres 72

4.2.2. Cladogramas 105

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise ultraestrutural 112

5.2. Análise filogenética 129

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 136

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 140

8. APÊNDICE

8.1. Apêndice 1: manuscrito submetido 154

RESUMO

A superfamília Loricarioidea é o maior grupo monofilético de Siluriformes da região Neotropical, incluindo atualmente seis famílias: Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae. As hipóteses atuais sobre as relações entre as famílias de Loricarioidea são baseadas quase que exclusivamente em caracteres osteológicos e de morfologia externa, sendo relativamente escassas as evidências para partes importantes do cladograma. Vários estudos têm revelado que os caracteres ultraestruturais dos espermatozóides, bem como da espermiogênese, em peixes teleósteos, apresentam importantes implicações filogenéticas. O presente trabalho teve por objetivo estudar a filogenia dos Loricarioidea utilizando a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de espécies pertencentes às famílias de Loricarioidea e de grupos externos diretamente relacionados com este clado. Os gêneros de Loricarioidea: *Nematogenys* (Nematogenyidae), *Trichomycterus* (Trichomycteridae), *Corydoras* (Callichthyidae) e *Loricariichthys* (Loricariidae), além de um membro da família Cetopsidae, *Cetopsis*, tiveram as características ultraestruturais dos seus espermatozóides descritas. Quando possível também foram descritos os processos de espermiogênese. Estes dados foram utilizados na construção de uma matriz de caracteres, que foi utilizada na elaboração de hipóteses filogenéticas de relacionamento entre as espécies estudadas. Uma análise combinada dos dados referentes à espermiogênese e aos espermatozóides com os dados osteológicos e de morfologia externa também foi realizada. Ainda que o número de espécies seja pequeno frente à diversidade de espécies de Loricarioidea, foram notórias as similaridades encontradas entre espermatozóides de espécies pertencentes a um mesmo gênero, enquanto que entre espermatozóides de espécies pertencentes a famílias diferentes, a variabilidade foi clara. Uma lista de 58 caracteres da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides foi obtida, refletindo os caracteres encontrados nos espermatozóides de espécies pertencentes apenas à ordem Siluriformes. As análises filogenéticas conduzidas com este conjunto de dados mostraram que, as hipóteses de relacionamento entre as famílias de Loricarioidea, bem como entre estas e os outros Siluriformes tornam-se conflitantes com a hipótese atualmente proposta com base em outros caracteres

morfológicos, à medida que são somados mais táxons terminais à análise. O reflexo disto pode ser verificado pela diminuição dos valores do índice de consistência e de *bootstrap*, somado ao aumento do número de árvores igualmente parcimoniosas que vão sendo obtidas. A possível causa destas interferências nas análises é o pequeno número de descrições dos espermatozóides de espécies de Loricarioidea, bem como de outros Siluriformes. Por outro lado, a filogenia derivada da análise combinada dos dados mostrou-se bastante congruente com a hipótese mais aceita atualmente para o grupo. A análise combinada revelou ainda, a partir da comparação dos índices de decaimento, que o uso dos caracteres da ultraestrutura dos espermatozóides em combinação com outros dados morfológicos poderá fornecer bons subsídios no esclarecimento de relações mal resolvidas ou ainda poderá aumentar o suporte para grupos cujos relacionamentos têm sido repetidamente demonstrado.

ABSTRACT

The superfamily Loricarioidea is the largest monophyletic group of neotropical Siluriformes, including actually six families: Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae, and Loricariidae. The hypotheses about relationships among Loricarioidea families are based almost exclusively on osteological and anatomical features. However, the evidences for important parts of the cladogram are relatively scarce. Several studies on Teleostei have shown that characteristics of the spermatozoal ultrastructure, as well as of the processes of spermiogenesis, have phylogenetics implications. The aim of this work was to study the Loricarioidea phylogeny using spermiogenesis and spermatozoa ultrastructural of species of Loricarioidea families and of out groups directly related to this clade. The Loricarioidea genera: *Nematogenys* (Nematogenyidae), *Trichomycterus* (Trichomycteridae), *Corydoras* (Callichthyidae) and *Loricariichthys* (Loricariidae), and of one member of the family Cetopsidae, *Cetopsis*, had the ultrastructural features of their spermatozoa described. When possible the processes of spermiogenesis were also described. This data were used in the construction of the matrix of character witch was used in the elaboration of phylogenetics hypotheses of relationship among the species analyzed. A combined analysis of the spermiogenesis and spermatozoal data with the osteological and anatomical data was realized. Despite of the species number to be small in comparison with the diversity of Loricarioidea species, similarities were observed among spermatozoa of species that belong to a same genera. However, in the spermatozoa of species belong to different families, the variability was evident. A list of 58 spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure characters was obtained, reflecting the characters present in the spermatozoa of species belonging to the ordem Siluriformes. The analyses conduced with this data set showed that the hypotheses of relationship among Loricarioidea families, as well as among this and the other Siluriformes, become conflicted with the hypothesis actually proposed, based on other morphological characters when more terminals taxa are added during the analyses. A reflex can be observed by the reduction of the consistency index values and *bootstrap* values, added to an increase of the number of parsimonious trees that were obtained. The possible cause of these interferences in the

analyses is the small number of spermatozoal descriptions for Loricarioidea species, as well as for other Siluriformes. On the other hand, the phylogeny derived from the combined data analyzes showed high levels of congruence with the hypothesis actually accepted for the group. The combined analysis still revealed, from the decay index comparison, that the use of spermatozoal ultrastructure characters combined with other morphological data can provide good subsidies in the elucidation of the poorly resolved relationships or still can increase the support for groups whose relationships has been poorly demonstrated.

1. INTRODUÇÃO

A história evolutiva dos organismos está associada às mudanças climáticas e geográficas ocorridas durante a história do planeta. A elucidação das relações filogenéticas entre os seres vivos permite não só o estudo da sua evolução, como também é base para estudos biogeográficos e ecológicos (Futuyma, 1992). O conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las, é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as demais disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995; Amorim, 2002).

A fauna neotropical de peixes de água doce é bastante rica, incluindo cerca de 4.500 espécies reconhecidamente válidas segundo o mais recente levantamento da diversidade de peixes de água doce da América do Sul e Central feito por Reis e colaboradores (2003). Além disso, os autores citados estimam que exista algo em torno de 1.600 espécies ainda não descritas, o que resultaria em uma estimativa total de cerca de 6.100 espécies de peixes de água doce neotropicais. Já Schaefer (1998) calculou, em um levantamento das tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae, que possam existir aproximadamente 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais o que corresponderia a 25% de todas as espécies de peixes do mundo. Este número foi discutido e aceito por Vari e Malabarba (1998) que acrescentaram que toda essa diversidade de peixes de água doce neotropicais ocorre em menos de 0,003% da água do planeta.

A superordem Ostariophysi soma algo em torno de três quartos dos peixes de água doce do mundo, o que a torna um amplo e importante componente da ictiofauna recente. Os Ostariophysi encontram-se incluídos na divisão Teleostei, subdivisão Euteleostei (Lauder e Liem, 1983). Os Ostariophysi compreendem duas séries: Anotoptysi, constituída pelos Gonorynchiformes e Otoptysi constituída pelos Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes (Fink e Fink, 1996). Os Ostariophysi, Otoptysi compreendem um grupo de peixes ósseos diagnosticado pela presença do aparelho de Weber, um complexo formado por um conjunto de ossículos (*tripus*, *intercalarium*, *claustrum* e *scaphium*) que permite a conexão da bexiga natatória com o ouvido interno

(Burgess, 1989; Fink e Fink, 1996). Fink e Fink (1996) propõem a seguinte classificação para os Ostariophysi, Otophysi: Cypriniphysi, que inclui a ordem Cypriniformes (carpas, barbos), Characiphysi, incluindo os Characiformes (lambaris, piranhas, pacús) e Siluriphysi, que inclui duas ordens, Gymnotiformes (poraquês, tuiarás, morenitas) e Siluriformes (peixes de couro, cascudos). Neste estudo de Fink e Fink (1996), a análise filogenética das relações entre os grupos de Otophysi, estabelece Cypriniformes como grupo irmão dos demais Otophysi e Characiformes como grupo-irmão de Siluriformes mais Gymnotiformes (Fig. 1).

O monofiletismo do clado formado por Gymnotiformes e Siluriformes, considerados grupos-irmãos, baseia-se em 16 características listadas em Fink e Fink (1996), sendo parte delas referentes à anatomia neural do sistema eletro-sensorial presente nestes grupos.

1.1. Ordem Siluriformes

A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais e neotropicais de todo o mundo, principalmente na América do Sul, África e sul e sudeste da Ásia (Burgess, 1989; Teugels, 1996; Ferraris, 1998; de Pinna, 1998; Arratia *et al.*, 2003). Desta forma, sua distribuição parece ser limitada pela temperatura, uma vez que a maioria das espécies habita tanto regiões tropicais quanto neotropicais e poucas são as espécies que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 1994).

O número de espécies de Siluriformes conhecidas é de cerca de 2.600, porém esse número pode exceder os 3.000, representando 1/3 do percentual de peixes de água doce conhecidos (Burgess, 1989; Nelson, 1994; Teugels, 1996; Ferraris, 1998). Embora a grande maioria dos peixes desta ordem seja encontrada em ambientes de água doce, duas famílias, Ariidae e Plotosidae têm uma representação significativa de espécies primariamente marinhas (Burgess, 1989; de Pinna, 1998). Além disso, as famílias Pangasiidae, Aspredinidae e Auchenipteridae incluem algumas espécies estuarinas, que podem ainda, apresentar certa tolerância a ambientes marinhos (de Pinna, 1998).

Os Siluriformes são conhecidos popularmente no Brasil como “bagres”, “cascudos”, “armados”, “mandis”, “jaús” ou “pintados”. São peixes que possuem formas e tamanhos extremamente variados e caracterizam-se principalmente por possuírem total ausência de escamas sobre o corpo, presença de barbilhões e freqüentemente de acúleos fortes e pungentes resultantes da modificação do segundo raio da nadadeira dorsal e do primeiro raio das nadadeiras peitorais (“tripé defensivo”), capazes de infringir graves ferimentos e, em alguns casos, de injetar um veneno produzido por células glandulares localizadas no tecido epidérmico que cobre estes acúleos (Alexander, 1965; Burgess, 1989; Ferraris, 1998). O corpo desprovido de escamas pode ser revestido por uma pele espessa conhecida popularmente como couro (“peixes de couro”), ou então, coberto total ou parcialmente por placas ósseas (“cascudos”, “bodós”, “caborjas”) (Burgess, 1989). Apresentam hábitos predominantemente crepusculares e noturnos, o que os leva a habitar, em geral, locais com águas turvas como o fundo dos rios e a permanecer entre rochas e a vegetação (Ferraris, 1998). Os hábitos alimentares também são variados, havendo espécies herbívoras, planctófagas, carnívoras e onívoras. Além disso, há espécies com hábitos alimentares extremamente particulares como os representantes de duas subfamílias de Trichomycteridae, os Vandelliinae, que são hematófagos (Machado e Sazima, 1982) e os Stegophilinae, que são lepidófagos (“comedores de escamas”) (Nelson, 1994). Provavelmente localizam alimentos no fundo e orientam sua natação por meio dos barbilhões gustativos e tácteis, ou ainda, por meio de receptores de campo elétrico presentes no corpo, como é verificado em representantes de Malapteruridae (“bagres elétricos”) (Alexander, 1965; Ferraris, 1998). Esta enorme diversidade ecológica e evolutiva observada na ordem Siluriformes a faz foco de muitos estudos (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1981, 1996; de Pinna, 1998; Arratia *et al.*, 2003; Britto, 2003).

Apesar da importância científica e econômica dos Siluriformes, o grupo apresenta ainda inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos em razão de sua ampla diversidade. A própria classificação das famílias de Siluriformes ainda não é consensual, uma vez que, a cada novo estudo sistemático e/ou filogenético sobre a ordem; novas espécies, gêneros e até mesmo famílias são propostos, ou melhor, caracterizados. Assim, por exemplo, o número de famílias reconhecidas para a ordem é de 29 segundo Ferraris (1998), 33 para Teugels

(1996) e Eschmeyer (1998), 34 para Nelson (1994) e 35 segundo Ferraris e de Pinna (1999).

O número de estudos enfocando as relações entre as várias famílias de Siluriformes, com base em dados morfológicos, tem-se expandido consideravelmente nos últimos anos devido à incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso da metodologia de análise filogenética proposta inicialmente por Hennig (1966) e implementada por diversos autores. Segundo Diogo (2003), muitos dos estudos pré-cladísticos sobre os relacionamentos entre os Siluriformes são confusos e questionáveis, com propostas de agrupamentos dos táxons tendo por base caracteres plesiomórficos e altamente homoplásticos ou simplesmente não embasadas. Entretanto, o autor ressalta que tais trabalhos não devem ser ignorados.

Embora nos últimos anos notem-se progressos até então não vistos, a grande maioria dos estudos cladísticos sobre a filogenia dos Siluriformes é dedicada aos intra-relacionamentos de famílias de Siluriformes (Diogo, 2003). Contudo, três importantes trabalhos que atentam para uma análise filogenética mais global entre as famílias de Siluriformes são o de Mo (1991 *apud* de Pinna, 1998), o de de Pinna (1993) e o de Britto (2003), os quais têm por base uma grande quantidade de caracteres novos. Entre os tópicos abordados por de Pinna (1998) em seu estudo sobre as relações filogenéticas dos Siluriformes neotropicais, o autor apresenta uma comparação entre os resultados obtidos por Mo (1991) e por de Pinna (1993) concluindo que há uma concordância em alguns pontos destes trabalhos, que podem ser vistos como uma evidência de corroboração independente, apresentada em ambos, sobre as relações entre as famílias de Siluriformes.

A recente análise filogenética realizada por Britto (2003), com base em 331 caracteres morfológicos de representantes de todos os principais grupos da ordem Siluriformes, indicou que algumas famílias formam agrupamentos polifiléticos e vários grupos tradicionais tiveram seu monofiletismo corroborado, concordando com as hipóteses propostas por Mo (1991 *apud* de Pinna, 1998) e de Pinna (1993, 1998) (Fig. 2). Como exemplos de hipóteses propostas em estudos prévios e que no estudo de Britto (2003) foram confirmadas, tem-se a posição basal da família Diplomystidae dentro da ordem, bem como o monofiletismo da superfamília Loricarioidea e as relações entre suas famílias. Dentre as

novas hipóteses, não foi confirmada a relação da família Pseudopimelodidae com o grupo formado por Sisoroidea, Loricarioidea e Amphiliidae, que se mostra agora mais relacionada a Heptapteridae e outros Siluriformes. Entre os grupos apresentados, os que possuem representantes na região neotropical são: Diplomystidae, Cetopsidae, Aspredinidae, Loricarioidea, Pseudopimelodidae, Heptapteridae, Doradoidea, Pimelodidae e Ariidae. O grupo-irmão de cada uma destas linhagens inclui alguns membros com distribuição fora da região neotropical (de Pinna, 1998; Britto, 2003). Possivelmente isto indica que a diversificação dos Siluriformes na região neotropical precede a separação entre a América do Sul e os outros blocos continentais, justificando, por exemplo, os componentes afro-neotropicais presentes em Siluriformes (de Pinna, 1998).

1.2. Superfamília Loricarioidea

Atualmente a superfamília Loricarioidea é composta por seis famílias: Nematogenyidae (1 espécie), Trichomycteridae (171 espécies), Callichthyidae (177 espécies), Scoloplacidae (4 espécies), Astroblepidae (54 espécies) e Loricariidae (673 espécies) (de Pinna, 1998; Reis *et al.*, 2003). Dentro deste grupo estão os três maiores gêneros de Siluriformes: *Hypostomus*, *Corydoras* e *Trichomycterus*, além de um grande número de espécie de interesse econômico, principalmente como espécies ornamentais.

A superfamília Loricarioidea é o maior grupo monofilético de Siluriformes da região neotropical (de Pinna, 1998; Britto, 2003). Esta superfamília foi o primeiro grupo natural de famílias de Siluriformes reconhecido. Essa afinidade foi primeiramente proposta por Peyer (1922 *apud* de Pinna, 1998), com base na presença de odontódios e na estrutura do primeiro raio da nadadeira peitoral. Além desses caracteres, dois outros confirmam o monofiletismo da superfamília, que são: dentes mandibulares com cúspides bífidas e ramos anteriores do basipterígio sem cartilagem nos adultos (de Pinna, 1998). De acordo com a recente análise de Britto (2003), a presença dos ossículos do aparelho de Weber encapsulados mostrou-se também um caráter exclusivo de Loricarioidea.

A relação da superfamília Loricarioidea com as outras famílias de Siluriformes observada no cladograma de Britto (2003) sugere sua proximidade com a família

Amphiliidae e com a superfamília Sisoroidea, sendo Amphiliidae considerada grupo-irmão de Loricarioidea.

As hipóteses de relacionamento entre as famílias constituintes de Loricarioidea apresentada por de Pinna (1998) e Britto (2003) mostram que as famílias Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae formam um clado separado de Nematogenyidae e Trichomycteridae; com Loricariidae e Astroblepidae como grupos-irmãos. Várias transformações de caracteres são conhecidas para os diferentes clados de Loricarioidea, como pode ser observado na Figura 3. Por outro lado, as filogenias apresentadas em de Pinna (1998) revelam que são relativamente poucas as hipóteses de relacionamento dentro das famílias de Loricarioidea.

Os estudos sobre a origem dos diferentes clados de Loricarioidea são ainda muito incipientes. O fóssil melhor conhecido de Callichthyidae, *Corydoras revelatus*, com cerca de 50 milhões de anos parece ser extremamente antigo (Reis, 1998). Considerando outras evidências, Reis (1998) concluiu que as principais linhagens de peixes neotropicais, em nível de família, poderiam estar diferenciadas antes da separação da América do Sul e da África, a cerca de 100 milhões de anos.

Entre os Loricarioidea, a família Nematogenyidae é constituída por uma única espécie, *Nematogenys inermis*, endêmica do Chile central (Nelson, 1994; de Pinna, 2003). O gênero *Nematogenys* foi primeiramente incluído na subfamília Nematogenyinae, pertencente à família Trichomycteridae. A família Nematogenyidae foi proposta por Eigenmann em 1927, porém tal fato foi rejeitado pela maioria dos autores subseqüentes, que continuaram a incluir *Nematogenys* na família Trichomycteridae (de Pinna, 1998; de Pinna, 2003). A idéia de separação foi reconhecida a partir de Baskin em 1973, com a proposta de que *Nematogenys* é o grupo-irmão dos demais Loricarioidea (de Pinna, 1998; de Pinna, 2003). Entretanto, a inclusão do gênero *Trichogenes* por Britski e Ortega em 1983, e da subfamília Copionodontinae por de Pinna em 1992, na família Trichomycteridae, mudou novamente esse quadro (de Pinna, 1998, 2003), assinalando que a hipótese de inclusão do gênero *Nematogenys* em Trichomycteridae ainda é possível. Além disso, de Pinna (1992) sugere que a família Nematogenyidae seja mantida devido à difusão do seu uso na literatura (de Pinna, 2003). No cladograma de relacionamentos entre

as famílias de Loricarioidea proposto por de Pinna (1998) e por Britto (2003), a família Nematogenyidae é grupo-irmão da família Trichomycteridae. De acordo com de Pinna (1998) *Nematogenys* é talvez o Loricarioidea mais interessante por ser o único, dentro da superfamília, que retém muitos estados de caráter que são representativos de condição plesiomórfica e, portanto, de grande valia para a elucidação dos relacionamentos entre os Loricarioidea e os outros Siluriformes. Apesar do seu interesse filogenético, pouco é conhecido sobre sua anatomia, biologia reprodutiva e ecologia, sendo isto resultado, em parte, da dificuldade de acesso ao seu hábitat natural, além da sua presente ameaça de extinção devido à introdução de espécies exóticas e à degradação do seu hábitat, o que possivelmente comprometerá estudos futuros (de Pinna, 1998).

A família Trichomycteridae é considerada uma das famílias de Loricarioidea mais rica em número de espécies, as quais encontram-se atualmente distribuídas em oito subfamílias: Copionodontinae, Trichogeninae, Trichomycterinae, Vandelliinae, Stegophilinae, Tridentinae, Glanapteryginae, Sarcoglanidinae (de Pinna e Wosiacki, 2003). Por algum tempo, a família Trichomycteridae foi conhecida como Pygidiidae, por influência principalmente de Eigenmann, que interpretou erroneamente a história taxonômica dos nomes *Trichomycterus* e *Pygidium* (de Pinna, 1998). A família forma um grupo monofilético bem diagnosticado e encontra-se distribuída em quase toda a América do Sul, na Costa Rica e no Panamá (Teugels, 1996). Com exceção de Trichomycterinae, todas as subfamílias de Trichomycteridae são consideradas monofiléticas (de Pinna, 1998). A sinapomorfia mais conspícua do grupo é a estrutura do aparelho opercular. Nesta, o interopérculo é modificado em uma estrutura compacta, com uma grande plataforma ventrolateral formando um suporte para os odontódios (de Pinna, 1998). A maioria das espécies desta família, como é o caso dos Trichomycterinae, é predadora de pequenos invertebrados. No entanto, podem apresentar notáveis especializações alimentares, com espécies hematófagas, como os Vandelliinae, que vivem nas câmaras branquiais de outros peixes (Machado e Sazima, 1983; Burgess, 1989). Além destas, há espécies da subfamília Stegophilinae que se alimentam de muco e escamas de outros peixes (Nelson, 1994). Algumas espécies da subfamília Vandelliinae conhecidas popularmente por “candirus”

podem penetrar acidentalmente na uretra humana e de outros mamíferos, causando graves consequências à vítima (de Pinna, 1998; Nelson, 1994).

A família Callichthyidae também apresenta um grande número de espécies distribuídas em duas subfamílias: Callichthyinae e Corydoradinae (de Pinna, 1998; Reis, 2003). Das 177 espécies válidas da família Callichthyidae, o gênero *Corydoras* representa cerca de 80% da diversidade da família (cerca de 143 spp.), o que o torna o gênero mais especioso também dentro da ordem Siluriformes (Reis, 2003). A família Callichthyidae é considerada grupo-irmão do conjunto formado pelas famílias Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae (de Pinna, 1998; Britto, 2003). As relações filogenéticas da família têm sido estudadas por Reis (1998), que demonstrou o monofiletismo do grupo com base em 28 sinapomorfias. As subfamílias de Callichthyidae também foram demonstradas por este autor como sendo monofiléticas. Encontra-se distribuída em praticamente todas as grandes drenagens da América do Sul, desde o norte da Argentina até à bacia do Rio Orenoco e também na Colômbia e Panamá (Reis, 2003). São peixes relativamente pequenos e facilmente reconhecidos pela presença de duas séries de placas ósseas longitudinais revestindo o corpo (de Pinna, 1998). Os calictídeos apresentam respiração aérea acessória, sendo capazes de captar o ar na superfície da água, engoli-lo e passá-lo para uma região especial no intestino, que corresponde ao órgão respiratório acessório, e este ar pode eventualmente ser expelido pelo ânus (de Pinna, 1998; Reis, 2003). Para as duas subfamílias de Callichthyidae são descritos comportamentos reprodutivos distintos. Em um estudo sobre o comportamento reprodutivo de *Corydoras paleatus*, representante da subfamília Corydoradinae, Pruzsinszky e Ladich (1998) descrevem que os machos desta espécie emitem sons ao cortejar a fêmea madura e que durante esse momento eles não são agressivos com os outros machos da espécie. Contudo, estes autores relatam diferenças consideráveis no comportamento reprodutivo de *Hoplosternum thoracatum*, representante da subfamília Callichthyinae; o qual emite sons de territorialismo durante a desova e mostra-se bastante agressivo tanto na presença das fêmeas quanto na de outros machos.

A família Scoloplacidae é a mais recente família neotropical de Siluriformes reconhecida, encontrando-se atualmente constituída por quatro espécies pertencentes ao gênero *Scoloplax* (de Pinna, 1998; Schaefer, 2003a). A princípio os escoloplacídeos foram

considerados por Lundberg e Baskin, em 1969, como representante da família Aspredinidae (*Bunocephalus* sp.) e posteriormente, Bailey e Baskin, em 1976, os localizaram em uma nova subfamília de Loricariidae, denominada Scoloplacinae (de Pinna, 1998; Schaefer, 2003a). Mais tarde, em 1980, essa subfamília foi elevada por Isbrücker ao *status* de família, denominada Scoloplacidae, sendo então confirmada por Howes, em 1983, que concordou com a separação (de Pinna, 1998; Schaefer, 2003a). Na América do Sul, distribuem-se nas bacias Amazônica e Paraná/Paraguai. Nas relações filogenéticas dos grupos de Loricarioidea, Scoloplacidae é grupo-irmão de Astroblepidae mais Loricariidae (de Pinna, 1998; Britto, 2003). São Siluriformes diminutos, uma vez que não se conhece exemplares maiores que 20 mm em comprimento padrão (Sazima *et al.*, 2000; Schaefer, 2003a). Os representantes da família Scoloplacidae são reconhecidos pela presença de uma placa rostral móvel localizada na cabeça que sustenta numerosos odontódios (de Pinna, 1998; Sazima *et al.*, 2000; Schaefer, 2003a). Segundo Teugels (1996), essa característica representa uma notável estrutura neomórfica dentro da ordem Siluriformes. Em adição a esta sinapomorfia, outras foram descritas por Schaefer, em 1990, indicando que Scoloplacidae é um grupo monofilético (Schaefer, 2003a). Schaefer e colaboradores (1989), em uma revisão do gênero *Scoloplax*, sugerem que esse gênero possui características reduzidas, possivelmente pedomórficas. Estas características comumente encontradas em *Scoloplax* e compartilhadas por outros peixes-miniatura incluem redução do número de raios das nadadeiras, perda de vários ossos do crânio e redução e perda de partes do sistema látero-sensorial (Schaefer *et al.*, 1989). Estes mesmos autores comentam sobre alguns problemas inerentes ao uso destes caracteres redutivos nas análises filogenéticas dos grupos de peixes-miniatura, uma vez que nestes grupos estes caracteres podem representar homoplasias e sinapomorfias em diferentes níveis filogenéticos. Sazima e colaboradores (2000), em um estudo sobre a história natural de *Scoloplax empousa*, descreveram, a partir de amostras coletadas nos meses de maio e agosto, que estes peixes apresentam hábito noturno e uma dieta composta por invertebrados de fundo, principalmente larvas de quironomídeos e oligoquetas. Estes autores também verificaram uma mudança na estrutura da população com base na diferença entre as frequências de tamanho dos indivíduos amostrados em maio e em agosto, sugerindo que os

escoloplacídeos sejam peixes anuais. Quanto aos aspectos reprodutivos, Burns e colaboradores (2000) sugerem que *Scoloplax dicra* possa ser um peixe de inseminação.

A família Astroblepidae também está constituída por um único gênero, *Astroblepus*, com mais de 50 espécies reconhecidas (Schaefer, 2003b). Trata-se de peixes endêmicos da região norte dos Andes, altamente adaptados à ambientes elevados e de correnteza forte que são encontrados naquela região (de Pinna, 1998). Segundo de Pinna (1998), em termos filogenéticos, os astroblepídeos representam o grupo menos entendido de todos os outros Loricarioidea. Entretanto, o monofiletismo da família parece bem corroborado por Schaefer, em 1990, bem como sua posição como grupo-irmão de Loricariidae (de Pinna, 1998). Embora a família Astroblepidae compartilhe várias especializações com os Callichthyidae, Scoloplacidae e Loricariidae, eles não apresentam corpo revestido por placas ósseas (Schaefer, 2003b). Além desta característica, os astroblepídeos possuem boca inferior formando um disco sugatório, lábios expandidos e musculatura das nadadeiras pélvicas bastante desenvolvida (de Pinna, 1998; Schaefer, 2003b). A habilidade do grupo em escalar superfícies verticais, talvez seja decorrente da combinação eficiente entre sua fixação ao substrato por meio da boca sugatória e a contração da musculatura das nadadeiras pélvicas. Román-Valencia (2001), estudando a ecologia reprodutiva de *Astroblepus cyclopus*, mostra que nessa espécie a maturação dos ovários ocorre entre os meses de dezembro e maio, sendo que a fecundidade é baixa e os ovos são pequenos.

A família Loricariidae apresenta o maior número de espécies dentre todos os Loricarioidea e é provável que seja também a mais complexa taxonomicamente (de Pinna, 1998). A grande diversidade de espécies encontra-se arranjada em seis subfamílias: Ancistrinae (Fisch-Muller, 2003), Hypoptopomatinae (Schaefer, 2003c), Hypostominae (Weber, 2003), Lithogeneinae (Reis *et al.*, 2003), Loricariinae (Ferraris, 2003b) e Neoplecostominae (Ferraris, 2003a). Embora exista uma grande diversidade morfológica dentro do grupo, as relações entre as subfamílias de Loricariidae apresentadas em de Pinna (1998) mostram-se relativamente bem definidas com exceção de Hypostominae, que forma um agrupamento polifilético. São peixes amplamente distribuídos nas bacias hidrográficas das Américas do Sul e Central (Reis *et al.*, 2003). Apresentam o corpo quase que inteiramente revestido por placas ósseas arranjadas em mais que duas séries longitudinais

(Burgess, 1989; Teulgels, 1996). O hábito destes peixes de se alimentarem principalmente de algas está associado à sua boca suctória e aos seus dentes raspadores (de Pinna, 1998). A biologia reprodutiva dos Loricariidae é relativamente mais conhecida devido à popularização do seu uso em aquários (de Pinna, 1998). Em geral, caracterizam-se por uma baixa fecundidade, com desovas contendo poucos ovos, os quais são adesivos e grandes (Nakatani, 2001; Fávaro, 1999). Em algumas espécies há um marcante cuidado parental, como observado em *Loricaria typus*, onde os machos incubam os ovos em uma “bolsa de incubação” formada pelo desenvolvimento exacerbado do lábio inferior durante a época reprodutiva (Menezes, 1949). Na maioria das espécies do gênero *Ancistrus* observa-se um admirável dimorfismo sexual, com os machos possuindo um conjunto de tentáculos alongados no focinho, que possivelmente mimetizam o movimento de larvas, atraindo a fêmea madura (Sabaj *et al.*, 1999).

1.3. Estrutura testicular e espermatogênese em peixes

Em relação à anatomia, os testículos da maioria dos peixes são órgãos pares, em geral de formato alongado, podendo estar total ou parcialmente individualizados, ou ainda, unidos apenas em sua extremidade caudal para formar o ducto espermático que se abre na papila urogenital (Le Gac e Loir, 1999). Microscopicamente, os testículos encontram-se envolvidos por uma cápsula delgada. A ultraestrutura desta cápsula revela que ela é constituída por duas camadas celulares: uma mais externa, que corresponde ao mesotélio, o qual é constituído por um epitélio simples pavimentoso sustentado pela lâmina basal, e uma mais interna formada por tecido conjuntivo mais ou menos frouxo e células mióides (Koulish *et al.*, 2002). Os testículos estão conectados à região dorsal da cavidade celomática por meio do mesórquio, uma fina camada de peritônio (Pudney, 1993; Le Gac e Loir, 1999). Ao longo do ciclo reprodutivo anual das espécies são observadas alterações na morfologia dos testículos, bem como na coloração e principalmente no tamanho e peso (Le Gac e Loir, 1999).

A organização clássica dos testículos encontrada nos peixes também é compartilhada por outros vertebrados, mostrando-se ser uma característica plesiomórfica

(Pudney, 1993, 1995). Nesta organização o testículo encontra-se dividido em dois compartimentos: o germinativo e o intersticial (Pudney, 1993, 1995; Le Gac e Loir, 1999; Grier, 2002; Koulisch *et al.*, 2002). O compartimento germinativo é constituído pelo epitélio germinativo, o qual é formado pelas células de Sertoli, pelas células germinativas e pela lâmina basal mais fibras reticulares. O compartimento intersticial é formado pelas células de Leydig, fibroblastos, células mióides, macrófagos, vasos sanguíneos, nervos e fibras colágenas. Ambos os compartimentos encontram-se separados pela lâmina basal (Pudney, 1995; Grier, 2002; Lo Nostro *et al.*, 2003).

É no compartimento germinativo que tem lugar à produção dos gametas masculinos ou a espermatogênese (Pudney, 1995; Miura, 1999; Koulisch *et al.*, 2002). Mattei (1993) sugere que, em peixes teleósteos, há dois tipos de espermatogênese: a cística e a semi-cística. Na espermatogênese cística, a produção dos espermatozóides se dá completamente no interior de cistos ou espermatocistos presentes no compartimento germinativo; com a abertura desses cistos somente no final do processo, resultando na liberação dos gametas na luz (Mattei, 1993). Os cistos são formados por grupos de células germinativas em desenvolvimento mais ou menos sincrónico, sejam as espermatogônias primárias ou secundárias, os espermatócitos primários ou secundários, ou as espermátides, que se encontram envolvidos por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (Grier, 1981; Grier, 1993; Miura, 1999). Já na espermatogênese semi-cística, os cistos se abrem antes do final da produção dos espermatozóides, a qual é completada na luz do compartimento germinativo (Mattei, 1993). A abertura do cisto pode ocorrer em variados níveis de diferenciação das células germinativas, levando a uma mistura de diferentes tipos celulares na luz. Em geral, encontram-se misturados as espermátides e os espermatozóides recém-formados. A maioria dos peixes teleósteos apresenta espermatogênese do tipo cística (Mattei, 1993).

A espermatogênese inicia-se com a proliferação mitótica das espermatogônias, prossegue passando pela divisão meiótica e termina com a espermiogênese, na qual a espermátide haplóide diferencia-se em espermatozóide (Miura, 1999). Desta forma, nos cistos a espermatogônia primária (uma única espermatogônia envolvida pela célula de Sertoli) divide-se por mitoses e dá origem as espermatogônias secundárias (mais de uma

espermatogônia envolvida pela célula de Sertoli). Estas também se multiplicam por mitose e se diferenciam em espermatócitos primários, os quais entram em meiose e dão origem aos espermatócitos secundários após a primeira divisão meiótica. Os espermatócitos secundários originam as espermátides após a segunda divisão meiótica (Pudney, 1995). Nestas divisões celulares, as citocineses são incompletas e as células germinativas permanecem interligadas por pontes citoplasmáticas (Pudney, 1995; Le Gac e Loir, 1999).

A diferenciação das espermátides, ou espermiogênese resulta na formação dos espermatozóides. Durante a espermiogênese ocorrem marcantes mudanças morfológicas nas espermátides que consistem na formação da cabeça do espermatozóide e na compactação da cromatina, na formação da peça intermediária, na perda de citoplasma e no desenvolvimento do flagelo (Pudney, 1995; Miura, 1999). Ao término destes eventos, os processos citoplasmáticos das células de Sertoli se afastam e os espermatozóides são liberados na luz do compartimento germinativo (Pudney, 1995; Grier, 1993). Embora os espermatozóides tenham completado a espermiogênese, na maioria das espécies, estes gametas ditos testiculares ainda não são considerados maduros, uma vez que são imóveis; não sendo capazes de fecundar o gameta feminino. O processo de maturação do espermatozóide ocorre à medida que o gameta percorre o ducto espermático, onde adquire a sua motilidade. Este processo envolve, portanto, mudanças fisiológicas na célula e não morfológicas (Miura, 1999).

Na maioria dos peixes teleósteos a fertilização é externa. Em número menor, algumas espécies apresentam fertilização interna, com os machos possuindo um órgão copulador (gonopódio) com o qual deposita o esperma diretamente no trato reprodutivo da fêmea através da papila urogenital (Nakatani *et al.*, 2001). Burns e colaboradores (2002) consideram inadequado o uso do termo fertilização interna e sugerem que ele seja substituído por inseminação, uma vez que o tempo exato entre a introdução do esperma e a fertilização propriamente dita não é conhecido até o momento para nenhuma espécie de Ostariophysi que exibe esse modo de reprodução.

1.4. Classificação da espermiogênese em peixes

Mattei, em 1970, realizou uma análise comparativa da espermiogênese em peixes das classes Chondrichthyes e Osteichthyes: Sarcopterygii e Actinopterygii. Neste estudo foram analisadas 82 espécies de peixes, sendo que dessas, 76 eram de peixes teleósteos. Para esse grupo o autor citado propôs dois tipos de espermiogênese, a do tipo I e a II. Em ambos os tipos, o início do desenvolvimento do flagelo, nas espermátides jovens se dá lateralmente ao núcleo, sendo que é a ocorrência ou não de rotação nuclear que diferencia estes dois tipos de espermiogênese. Assim, se ao longo da espermiogênese ocorrer rotação nuclear, o eixo flagelar no espermatozóide se posicionará perpendicularmente ao núcleo, caracterizando a espermiogênese do tipo I (Fig. 4), porém se não ocorrer rotação nuclear, o eixo flagelar permanecerá paralelamente ao núcleo, caracterizando a espermiogênese do tipo II (Fig. 5).

Na espermiogênese do tipo I descrita por Mattei (1970), a espermátide jovem apresenta núcleo central, mitocôndrias esparsas pelo citoplasma e complexo centriolar lateral ao núcleo e preso à membrana plasmática; o centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e desenvolve o flagelo. O complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, trazendo a membrana, que sofre uma invaginação, e o segmento inicial do flagelo. Forma-se assim o canal citoplasmático, um espaço existente entre as membranas plasmática e flagelar. O flagelo dispõe-se tangencialmente ao núcleo e nessa face do contorno nuclear forma-se uma depressão, denominada de fossa nuclear. O núcleo sofre uma rotação de 90° em relação ao eixo flagelar e o complexo centriolar se insere na fossa nuclear. A região da fossa nuclear determina a base do núcleo, região para a qual migram as mitocôndrias.

Na espermiogênese do tipo II descrita por Mattei (1970), a espermátide jovem é bastante similar àquela caracterizada na espermiogênese do tipo I. A diferença é que nessa não ocorre a rotação do núcleo em relação ao flagelo, o que resulta em um posicionamento do flagelo paralelo ao núcleo (Mattei, 1970). Embora ocorra a formação da fossa nuclear, os centríolos permanecem fora dela (Mattei, 1970; Jamieson, 1991). Este tipo de

espermiogênese é característico de teleósteos mais derivados, como por exemplo, os Perciformes (Mattei, 1970; Jamieson, 1991).

Variações dos tipos I e II de espermiogênese resultam em um canal citoplasmático pequeno ou inexistente, o mesmo ocorrendo com a fossa nuclear (Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

Um outro tipo de espermiogênese, a do tipo III (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), foi recentemente descrito em Siluriformes, para a família Pimelodidae (*sensu* Lundberg e Littman, 2003). Nessa, a espermátide jovem apresenta núcleo central, mitocôndrias esparsas pelo citoplasma, complexo centriolar medial ao núcleo e preso à membrana plasmática; o centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar não se movimenta e o canal citoplasmático e a fossa nuclear não se formam. Não há também rotação nuclear. A peça intermediária é formada pela movimentação da massa citoplasmática em direção a região inicial do flagelo (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido). Embora neste tipo de espermiogênese não ocorra rotação nuclear, o flagelo apresenta localização perpendicular ao núcleo (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido).

Entre os tipos de espermiogênese descritos, a espermiogênese em um representante da família mais basal dos Siluriformes, *Diplomystes mesembrinus*, (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), corresponde à do tipo I de Mattei (1970).

1.5. Classificação dos espermatozóides em peixes

Franzén (1970), em um estudo sobre os aspectos filogenéticos da morfologia dos espermatozóides em vários filos de invertebrados aquáticos, propõem uma classificação para estes gametas em primitivos ou modificados. Para essa classificação, o autor considerou a estrutura e organização encontrada nos gametas masculinos por ele estudados, bem como o tipo de fertilização. Entende-se por primitivos os espermatozóides que ocorrem nos grupos com fertilização externa e que, portanto, são liberados no meio

aquático. Estes apresentam, numa sequência ântero-posterior: acrosso, cabeça arredondada ou cônica, núcleo esférico, dois centríolos: o proximal e o distal, sendo que o distal se diferencia em corpúsculo basal e desenvolve o axonema, peça intermediária com mitocôndrias arredondadas e pouco numerosas e flagelo contendo o axonema clássico (9+2). Já os espermatozoides modificados são encontrados em espécies de fertilização interna, sendo liberados diretamente no trato reprodutivo da fêmea. A morfologia destes gametas diverge em variados níveis da encontrada nos espermatozoides do tipo primitivo. Tais diferenças que destoam da condição primitiva correspondem principalmente à morfologia da cabeça, que se mostra mais alongada, e à peça intermediária, que também exibe um alongamento, além de uma reorganização das mitocôndrias. Após estas considerações, o autor conclui que os grupos mais primitivos de invertebrados analisados apresentam o espermatozoide do tipo primitivo, enquanto que os grupos mais derivados apresentam espermatozoides modificados e que esta divergência está associada à mudança no tipo de fertilização encontrada nestes dois grupos.

No livro de revisão de Jamieson (1991), o autor resume o conhecimento a respeito da estrutura dos espermatozoides dos diversos grupos de peixes, tanto da superclasse Agnatha quanto da Gnathostomata, assinalando as modificações estruturais que ocorreram em cada linhagem. Nesse estudo, o autor considera que a classificação dos espermatozoides em primitivos e modificados proposta por Franzén (1970) mostra-se equivocada para os espermatozoides dos peixes. Isto porque os espermatozoides tidos como primitivos estão presentes em grupos de peixes “superiores”, enquanto grupos “inferiores” apresentam espermatozoides estruturalmente considerados avançados. Desta forma, Jamieson (1991) sugere uma classificação para os espermatozoides dos peixes em *aquasperm* e *introsperm*, para designar, respectivamente, os espermatozoides dos peixes com fertilização externa, liberados no meio aquático, e os dos peixes de fertilização interna, liberados diretamente no trato reprodutivo da fêmea. O autor ainda estende esta classificação considerando também a presença ou a ausência do acrosso e o número de flagelos no espermatozoide. Com isso, tem-se no caso do *aquasperm*, o tipo *acrosomal aquasperm* ou o *anacrosomal aquasperm*. Este último subdivide-se em *uniflagellate*, *biflagellate* ou *aflagellate*. Com relação ao

introsperm há o *acrosomal introsperm* ou o *anacrosomal introsperm* e este pode ainda ser *simple* ou *complex*.

Jamieson (1991) considera que o espermatozóide encontrado na maioria dos Neopterygii corresponde à um típico *anacrosomal aquasperm uniflagellate*, o qual apresenta, em geral, em uma seqüência anterior-posterior: núcleo esférico, sem vesícula acrossomal, presença de fossa nuclear, centríolos proximal e distal frequentemente arranjados em ângulo reto e inseridos na fossa nuclear; centríolo distal se diferenciando em corpúsculo basal e desenvolvendo o axonema, mitocôndrias arredondadas e pouco numerosas e flagelo contendo apenas o axonema clássico (9+2). Segundo esse autor, a perda do acrossoma neste grupo é um caráter que o distingue dos demais grupos de peixes e vem acompanhada da presença da micrópila nos ovos destes animais (Jamieson, 1991). A micrópila é uma abertura no envoltório do ovo que permite a passagem do espermatozóide no momento da fertilização (Amanze e Yvengar, 1990). Para Jamieson (1991), os espermatozoides dos Neopterygii podem ter se desenvolvido secundariamente a partir de espermatozoides mais complexos encontrados nos grupos de peixes mais primitivos.

Em 1991, Mattei realizou um estudo sobre a ultraestrutura dos espermatozoides em peixes e suas implicações sistemáticas, acrescentando dados de cerca de 80 espécies aos existentes até aquela data. Encontra-se, nessa análise, a descrição dos espermatozoides de grupos pertencentes à superclasse Gnathostomata, incluindo Chondrichthyes e Osteichthyes: Sarcopterygii e Actinopterygii, revelando que é imensa a diversidade de formas encontrada nos espermatozoides dos peixes, não sendo possível estabelecer um único modelo para esses gametas, como é o caso, por exemplo, dos mamíferos. Ao longo do trabalho o autor não propõe nenhuma classificação para os espermatozoides dos peixes.

Com base nas comparações realizadas entre os espermatozoides dos grupos analisados, o estudo de Mattei (1991) mostra que dois caracteres, considerados novos, foram encontrados nos Neopterygii: a redução no tamanho do núcleo e a perda do acrossomo, sendo esse último também evidenciado por Jamieson (1991). Segundo Mattei (1991), estas duas características associadas à presença de uma peça intermediária curta, ocorrendo já no Actinopterygii primitivo, produzem um espermatozóide cuja estrutura

simplificada é bastante similar a dos espermatozóides dos invertebrados aquáticos com fertilização externa considerados como sendo do tipo primitivo por Franzén (1970).

Mattei (1991) sugere que a estrutura dos espermatozóides encontrada nos Neopterygii, em geral, consiste em um gameta sem acrossomo e uniflagelado. Esta estrutura corresponde ao *anacrosomal aquasperm uniflagellate*, descrito por Jamieson (1991), dos Neopterygii. No entanto, há grupos em Neopterygii, em particular nos Teleostei primitivos, em que são encontradas variações na estrutura dos seus espermatozóides. Como exemplos que chamam a atenção pode-se citar a ocorrência de espermatozóides aflagelados em Osteoglossomorpha e de espermatozóides com flagelo constituído por 9+0 microtúbulos em Elopomorpha (Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

1.6. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides em peixes teleósteos e suas implicações filogenéticas

A espermiogênese do tipo I de Mattei (1970) leva à formação de um *anacrosomal aquasperm* do tipo I (Jamieson, 1991). Estes gametas possuem núcleos pequenos, com formato que varia de ovóide a arredondado. Os centríolos, em ângulo reto, situam-se 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 no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo pelo canal citoplasmático. O flagelo apresenta o axonema clássico com nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central. A membrana flagelar pode ou não apresentar uma, duas ou três projeções laterais, denominadas também de “fins”.

A espermiogênese do tipo II de Mattei (1970) leva à formação de um *anacrosomal aquasperm* do tipo II (Jamieson, 1991). Nesse, o eixo flagelar é paralelo à base do núcleo. Os centríolos localizam-se fora da fossa nuclear (Mattei, 1970; Jamieson, 1991). A peça intermediária pode ser muito pequena e o canal citoplasmático pode estar ausente. No axonema, os microtúbulos A, das duplas um, dois, cinco e seis podem apresentar material denso no lúmen, constituindo as diferenciações intratubulares (Mattei, 1970; Jamieson, 1991).

A morfologia descrita para os espermatozóides dos tipos I e II pode variar quanto ao posicionamento do flagelo quando a rotação nuclear for incompleta, à presença e dimensão da fossa nuclear, à presença e tamanho do canal citoplasmático, ao tamanho e quantidade de mitocôndrias e ao número de flagelos, caracterizando tipos intermediários de espermatozóides (Jamieson, 1991; Mattei, 1970, 1991).

Já a espermiogênese do tipo III de Quagio-Grassiotto e Oliveira (manuscrito submetido) leva à formação de um *anacrosomal aquasperm*, o qual apresenta como principal diferença, quando comparado com os espermatozóides do tipo I e II, a ausência da fossa nuclear e do canal citoplasmático.

Com base no exposto, é notável o elevado número de características, qualitativas e quantitativas, que podem ser extraídas em análises estruturais e ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides (Fig. 6). Dentre estes caracteres, pode-se citar: o tipo de espermiogênese, a forma e dimensão do núcleo, o padrão de compactação da cromatina, a presença ou não de fossa nuclear, canal citoplasmático e projeções laterais nos flagelos, forma e distribuição de mitocôndrias e a presença de vesículas na peça intermediária.

Entende-se por caracteres qualitativos as características descritas por palavras, como, por exemplo, peça intermediária simétrica ou assimétrica, mitocôndrias arredondadas ou alongadas. Já os caracteres quantitativos representam as características descritas por escalas numéricas, isto é, por medidas, como comprimento e largura do núcleo, altura da fossa nuclear ou por contagens (Thiele, 1993). Nas análises filogenéticas, os caracteres quantitativos são geralmente codificados de forma qualitativa, com o objetivo de facilitar as comparações entre as variáveis quantitativas e qualitativas.

Desta forma, os estudos sobre a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides em peixes, vêm sendo direcionados no sentido da utilização das características estruturais dos espermatozóides em análises filogenéticas, podendo acrescentar dados importantes na elucidação de padrões de relacionamento em diversos grupos de peixes (Baccetti *et al.*, 1984; Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Atualmente alguns grupos são também suportados com base na estrutura de seus espermatozóides. Como

exemplo, tem-se o monofiletismo da superordem Elopomorpha que é corroborada por cinco sinapomorfias derivadas da estrutura dos espermatozóides (Jamieson, 1991).

Em um estudo recente sobre a ultraestrutura dos espermatozóides de lagartos da família Teiidae, Teixeira (2003) realiza uma análise filogenética sobre as relações entre os diferentes gêneros pertencentes à esta família com base em uma lista de 24 caracteres extraídos a partir da ultraestrutura dos espermatozóides. Teixeira (2003) propõe também que os caracteres oriundos da descrição destas características podem ser satisfatoriamente combinados com os outros dados morfológicos nas matrizes das análises filogenéticas. A autora expõe que os altos níveis de variabilidade inter e intra-genérica encontrados nos representantes da família Teiidae indicam que, para melhorar as estimativas da filogenia deste grupo, é necessário o uso de espécies como táxons terminais. Comparações do grau de congruência entre as filogenias derivadas da ultraestrutura dos espermatozóides e dos outros dados morfológicos, realizadas por Teixeira (2003), mostram que a ultraestrutura dos espermatozóides é um bom indicador de filogenia da família Teiidae, apresentando poucas regiões conflitantes e de pouco suporte com a topologia com base em outros caracteres morfológicos.

A despeito dos estudos de Jamieson (1991) e Mattei (1991) fornecerem dados sobre a ultraestrutura dos espermatozóides de praticamente todos os grandes grupos de peixes vivos, os espermatozóides dos teleósteos neotropicais de água doce são pouco conhecidos.

Com relação aos Siluriformes encontram-se disponíveis, até o momento, descrições da ultraestrutura dos espermatozóides de 26 espécies de 13 famílias: Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Clariidae (Mattei, 1991; Mansour *et al.*, 2002), Siluridae (Emel'yanova e Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2001), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982; Emel'yanova e Makeyeva, 1991; Emel'yanova e Makeyeva, 1992), Heptapteridae (Maggese *et al.*, 1984; Quagio-Grassiotto, 2001), Malapteruridae (Mattei, 1991), Mochokidae (Mattei, 1991), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), Bagridae (Emel'yanova e Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim e Lee, 2000), Schilbidae (Mattei, 1991) e Ariidae (Mattei, 1991). Entre essas, são encontradas boas descrições e fotodocumentações para 14 espécies,

enquanto para as demais existem apenas desenhos esquemáticos da morfologia dos espermatozóides ou então algumas imagens de espermatozóides em estudos mais amplos sobre reprodução. Como observado, não há, até o momento, descrições para nenhuma espécie de Loricarioidea. Assim, a realização de estudos ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes das famílias constituintes desta superfamília deverão ser bastante úteis no estudo das relações entre os seus componentes e poderão servir de base para estudos mais abrangentes em Siluriformes.

Ainda que as descrições disponíveis na literatura sobre os espermatozóides dos Siluriformes representem um número pequeno frente à diversidade de espécies encontrada nesta ordem, alguns dados chamam muito a atenção, como por exemplo, a alta incidência de espermatozóides biflagelados, encontrados em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982; Emel'yanova e Makeyeva, 1991; Emel'yanova e Makeyeva, 1992), Malapteruridae (Mattei, 1991) e Ariidae (Mattei, 1991) e de espermatozóides com canal citoplasmático e fossa nuclear ausentes, encontrados em espécies de Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido).

Com base nos estudos que abordam a implicação filogenética dos espermatozóides, disponíveis até o momento, nota-se que espermatozóides de espécies pertencentes à um mesmo gênero, quando comparados entre si, apresentam grandes similaridades, enquanto que espermatozóides de espécies pertencentes a famílias diferentes, mas reconhecidamente relacionadas, apresentam um alto grau de variabilidade (Baccetti *et al.*, 1984; Jamieson, 1991; Mattei, 1991; Teixeira, 2003). Considerando que os caracteres ultraestruturais dos espermatozóides podem então divergir entre grupos relacionados, é necessário que seja realizada uma avaliação do nível taxonômico em que eles possam ser mais informativos.

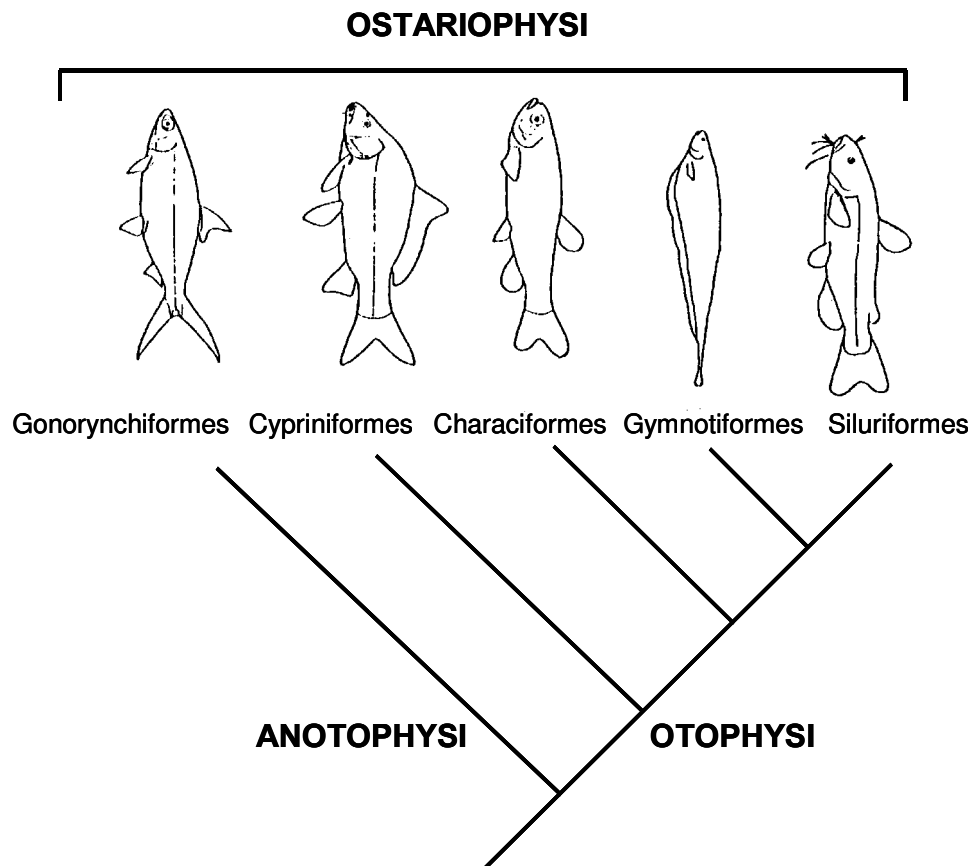


Figura 1. Cladograma expressando as relações entre os grupos constituintes de Ostariophysi, segundo Fink e Fink (1981, 1996).

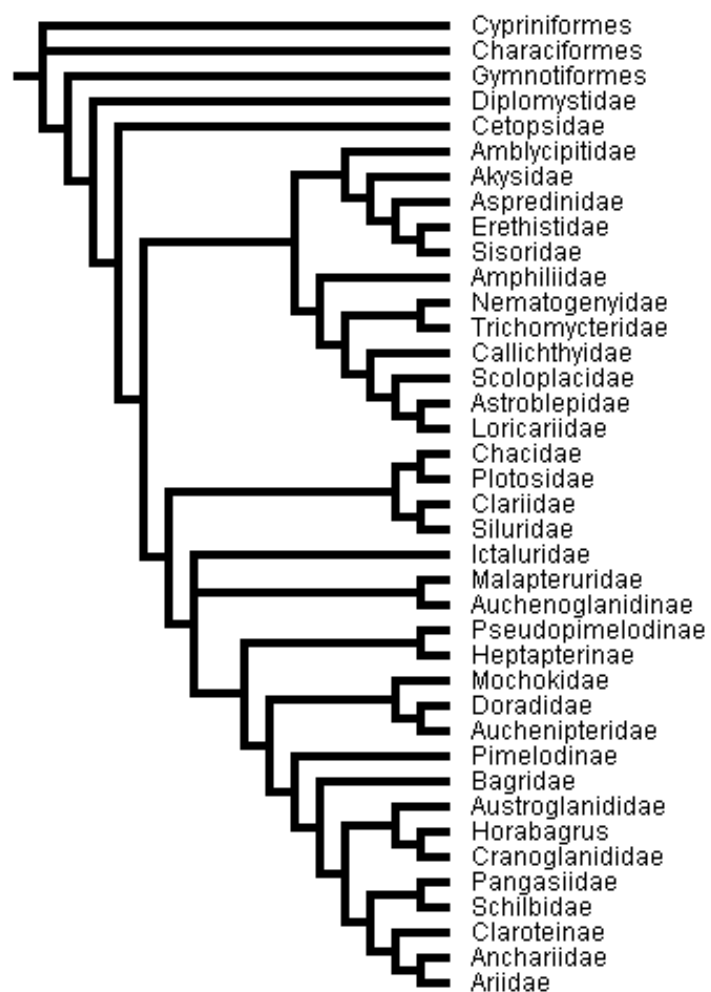


Figura 2. Filogenia proposta por Britto (2003) para a ordem Siluriformes.

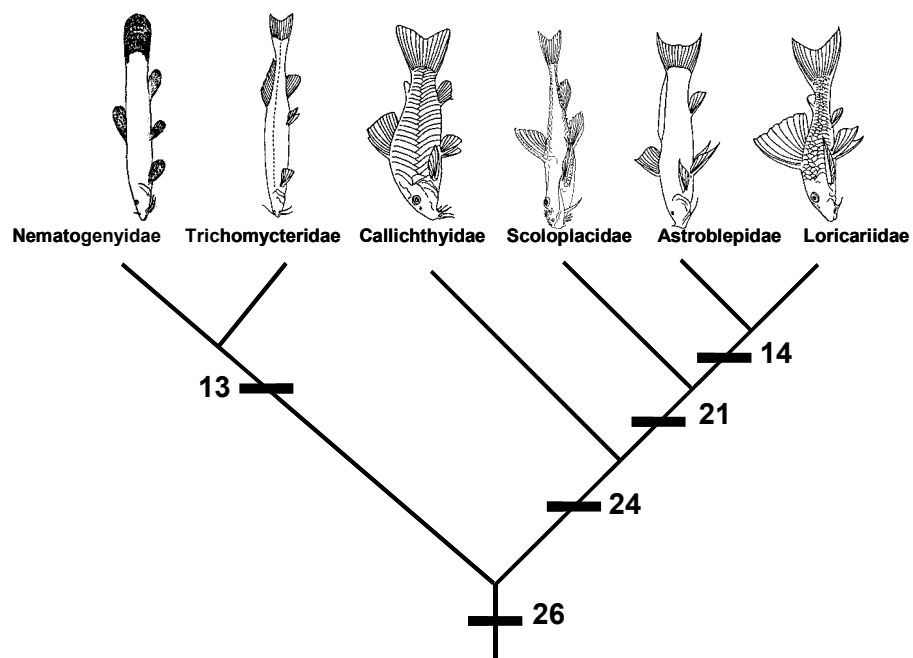


Figura 3. Cladograma mostrando as relações entre as famílias de Loricarioidea. Os retângulos pretos mostram o número de transformações de caracteres suportando cada ramo, segundo Britto (2003). Modificado de Britto (2003).

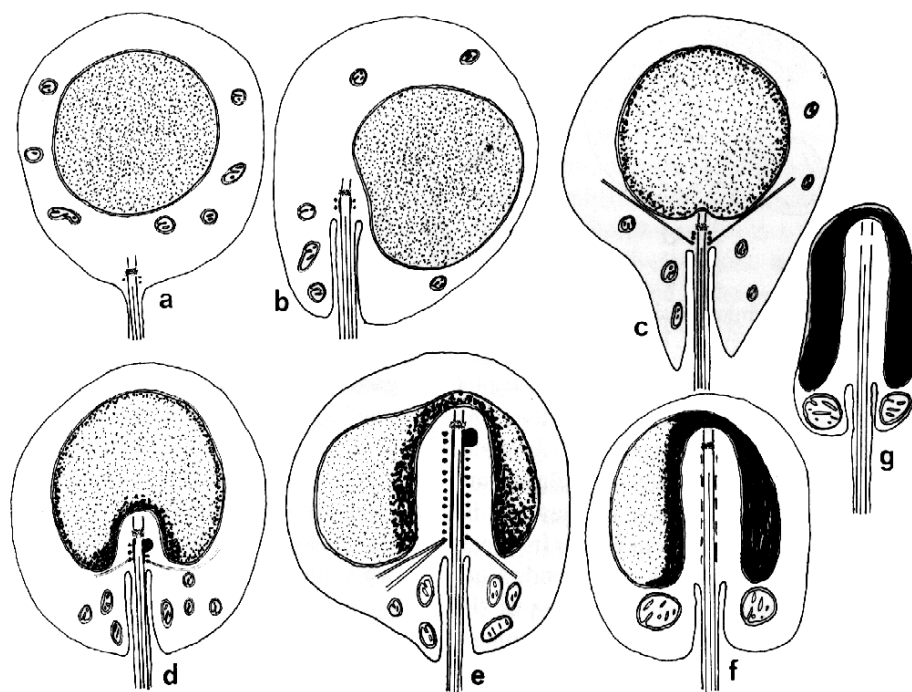


Figura 4. Esquema ilustrando a espermiogênese do tipo I, exemplificada em *Upeneus prayensis* (Mullidae), segundo Mattei (1970).

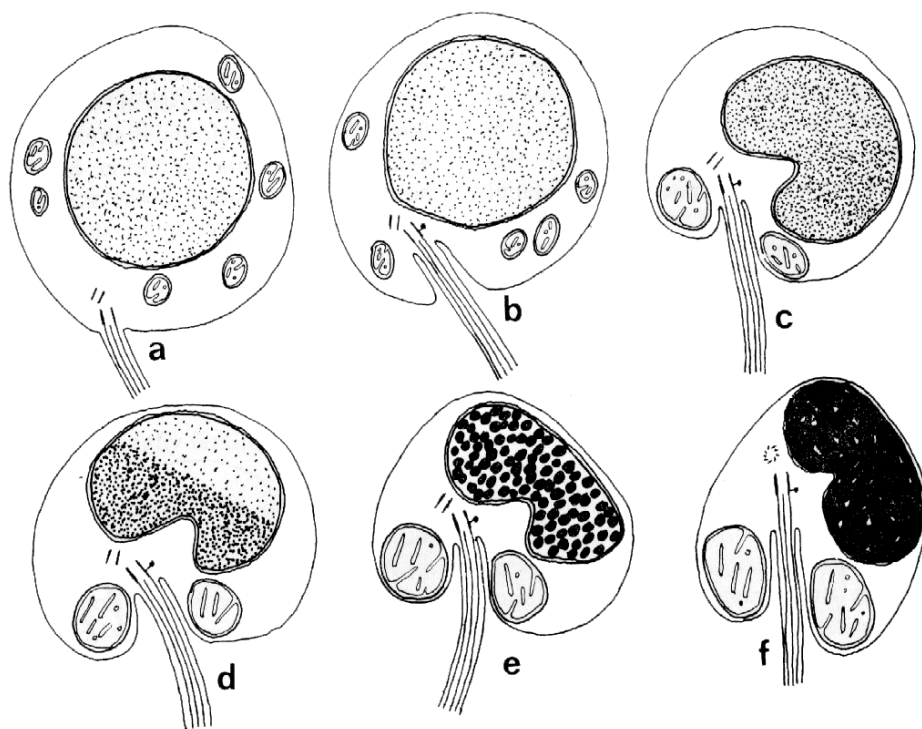


Figura 5. Esquema ilustrando a espermiogênese do tipo II, exemplificada em *Parapristipoma octolineatum* (Haemulidae), segundo Mattei (1970).

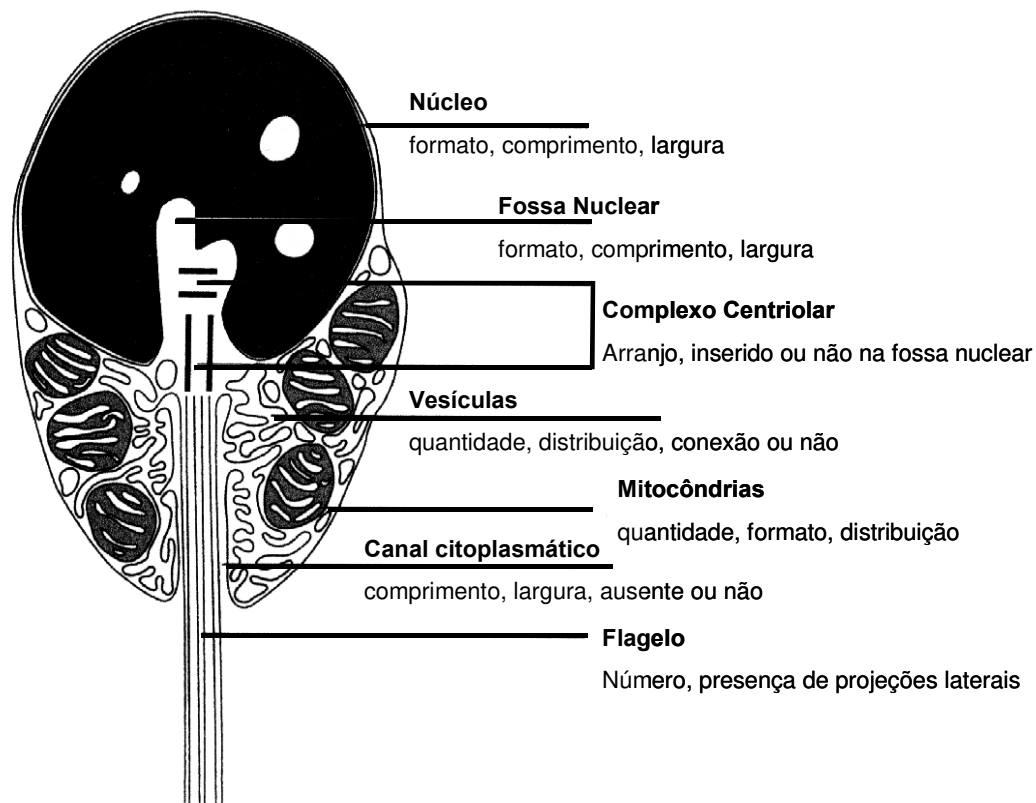


Figura 6. Desenho esquemático do espermatozóide de *Silurus microdorsalis*, evidenciando alguns caracteres que podem ser extraídos a partir da ultraestrutura dos espermatozóides em peixes. Modificado de Lee e Kim (2001).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho se insere em um programa geral de estudo da superfamília Loricarioidea, intitulado “Filogenia e evolução de Loricarioidea: uma abordagem multidisciplinar”, cujo objetivo principal é procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento neste grupo.

Este trabalho, em particular, procura contribuir com a obtenção de um conjunto de caracteres referentes à ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes de Loricarioidea, bem como de outras famílias de Siluriformes que servirão como grupos externos. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

1. Descrever, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, as características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes da superfamília Loricarioidea e de grupos externos, disponibilizando um conjunto de caracteres para este clado e procurando avaliar o grau de variabilidade encontrada na espermiogênese e nas estruturas dos espermatozóides em relação à diversidade de espécies do grupo;
2. Propor uma lista de caracteres morfológicos que reflita as características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides de espécies da ordem Siluriformes;
3. Realizar estudos comparativos a partir da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides e elaborar hipóteses sobre a filogenia dos Loricarioidea e de seus grupos constituintes com base nestes caracteres;
4. Comparar as hipóteses obtidas a partir dos dados de ultraestrutura dos espermatozóides com outras hipóteses disponíveis na literatura, elaboradas com base em outros caracteres morfológicos, principalmente osteológicos e de morfologia externa, procurando verificar se há ou não congruência entre os diferentes conjuntos de caracteres;

5. Analisar simultaneamente os dados de ultraestrutura de espermatozóides e os demais dados morfológicos obtidos por Britto (2003), procurando estabelecer uma hipótese de consenso sobre os padrões de relacionamento entre as famílias de Loricarioidea e então avaliar a importância das transformações nas diferentes classes de caracteres, principalmente da espermiogênese e dos espermatozóides, na evolução da superfamília.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram coletados exemplares machos, sexualmente maduros, de representantes de quatro das seis famílias de Loricarioidea: Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae e de um representante da família Cetopsidae, durante os períodos pré-reprodutivo e reprodutivo, em diferentes bacias hidrográficas da América do Sul. Segue a lista das espécies coletadas e que foram utilizadas no presente estudo e dos seus respectivos locais de coleta:

Famílias	Subfamílias	Espécies	Locais de Coleta
Nematogenyidae	—	<i>Nematogenys inermis</i> (LBP 10330, LBP 10331*)	Rio Águas de la Glória (S36°50,304'W72°55,642'), VIII Região, Águas de la Glória, Chile.
Trichomycteridae	Trichomycterinae	<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	Rio Capivara (S22°53,963'W48°23,204'), Botucatu, SP, Brasil;
		<i>T. areolatus</i> (LBP 10314, LBP 10320)	Rio Caramávida (S37°40,842'W73°15,997'), VIII Região, Antigua, Cañet, Chile;
		<i>T. reinhardti</i> (LBP 10229, LBP 10230)	Córrego Sapateiro (S21°16,432'W43°38,613'), Barbacena, MG, Brasil;
		<i>T. sp.</i> (LBP 663/02, LBP 664/02)	Córrego da Jacutinga (S23°09'W48°16'), Bofete, SP, Brasil;
		<i>T. sp.</i> (LBP 099/03, LBP 205/03)	Rio Alambari (S22°56'08''W48°19'15''), Botucatu, SP, Brasil.
Callichthyidae	Corydoradinae	<i>Corydoras flaveolus</i> (LBP 079/02, LBP 548/02)	Rio Alambari (S22°56'08''W48°19'15''), Botucatu, SP, Brasil.
Loricariidae	Loricariinae	<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Reservatório de Capivara (S22°51'52''W50°53'56''), Cândido Mota, SP, Brasil.
Cetopsidae	Cetopsinae	<i>Cetopsis coecutiens</i> (LBP 11801, LBP 13158)	Rio Araguaia (S16°00'W52°17'), Aragarças, GO, Brasil.

*: indica o número de tombo dos exemplares utilizados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia de Peixes, Depto. Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu.

Visando a dissecação para a retirada dos testículos, os exemplares coletados foram anestesiados com solução de benzocaína obtida a partir da diluição de 0,5 g 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, Botucatu, São Paulo, Brasil, como espécimens-testemunho.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Análise ultraestrutural

Para a análise ultraestrutural, os testículos retirados dos exemplares capturados foram fragmentados e processados primeiramente para análise à microscopia de luz, visando um estudo prévio do material, bem como sua seleção para a microscopia eletrônica de transmissão. Após esta etapa, os testículos selecionados foram então processados para a análise ao microscópio eletrônico de transmissão. A seguir são apresentados os protocolos utilizados no processamento do material para a microscopia de luz e para a microscopia eletrônica de transmissão:

- Processamento para Microscopia de Luz

O material foi processado no Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais, do Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, campus de Botucatu, utilizando-se o protocolo para historesina, descrito a seguir: fixação dos testículos em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH 7,3 por no mínimo 24 horas; desidratação em série crescente de concentração de álcool: álcool 70% (várias trocas ao longo de um dia) e álcool 95% (4 horas); infiltração em solução 1:1 de mistura de álcool 95% e resina de infiltração por 5 horas ou *overnight* e após em resina de infiltração por 5 horas ou *overnight*; inclusão em metacrilato glicol (JB-4 Embedding Kit Polysciences).

Os cortes de 3 a 5µm foram obtidos em micrótomo equipado com navalha de vidro Leica RM 2145; distendidos em água destilada e colocados sobre lâminas com auxílio de

um pincel; levados para estufa a 37 °C por 24 horas e em seguida submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (H/E) descrita a seguir: hidratação das lâminas em água destilada por 30 segundos; imersão em hematoxilina de Harris por 20 minutos; lavagem em água corrente por 10 minutos; passagem em álcool 90% por 30 segundos; imersão em eosina por 7 minutos e lavagem rápida em água corrente. Na sequência, as lâminas foram para a estufa a 37 °C por 24 horas e depois montadas com lamínula e “permount”.

- Processamento para a microscopia eletrônica de transmissão

O material foi processado e também analisado no Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, campus de Botucatu. O protocolo de rotina utilizado compreendeu: fixação dos testículos em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH 7,3 por no mínimo 24 horas; lavagem dos testículos selecionados em tampão fosfato Sorensen 0,1M (3X de 5'); pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, no escuro, por 2 horas, lavagem em água destilada (3X de 5'); contrastação em bloco com solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%. Segue-se, a desidratação em série crescente de concentração de acetona: 50% (2X de 10'), 70% (2X de 10'), 90% (2X de 15') e 100% (3X de 15') e a infiltração por um período de 12 horas em solução 1:1 de mistura de acetona e Araldite (Kit 502 Polysciences). Após a infiltração, os fragmentos de testículos foram pré-incluídos em mistura de Araldite, em frasco aberto, colocados em estufa a 37 °C por 1 hora, seguindo-se a inclusão em nova mistura de Araldite, em estufa a 58-60 °C por 48 horas.

Após o desbaste dos blocos, foram feitos os cortes semi-finos de 0,5 µm em micrótomo Leica RM 2165 equipado com navalha de vidro, os quais foram corados com azul de metileno 1% em solução de bórax 1%. A partir destes cortes foram selecionadas as áreas específicas para o estudo ao microscópio eletrônico de transmissão. Após esta análise, os blocos contendo o material selecionado foram re-desbastados e em seguida feitos os cortes ultrafinos. Estes foram obtidos no ultramicrotomo 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 sofre 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 Phillips - CM 100 e fotografados em filme 35 mm 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 espermatozóides de cada uma espécies analisadas.

3.2.2. Análise filogenética

- Elaboração da lista de caracteres

Foi elaborada uma lista de caracteres, qualitativos e quantitativos, que ocorrem na ordem Siluriformes, a partir do conjunto de características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes de Loricarioidea, obtidos neste estudo, bem como dos dados disponíveis na literatura das outras famílias de Siluriformes. O exame destes caracteres foi realizado com base na observação das elétron-micrografias obtidas neste estudo e das apresentadas na literatura utilizada, sendo que nesse segundo caso foram consideradas também as descrições dos autores.

Os dados disponíveis na literatura que foram utilizados referem-se às seguintes famílias e espécies: Diplomystidae, *Diplomystes mesembrinus* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001); Amblycipitidae, *Liobagrus mediadiposalis* (Lee e Kim, 1999); Clariidae, *Clarias gariepinus* (Mansour *et al.*, 2002); Siluridae, *Silurus microdorsalis* (Lee e Kim, 2001) e *Silurus asotus* (Kwon *et al.*, 1998); Ictaluridae, *Ictalurus punctatus* (Poirier e Nicholson, 1982); Auchenipteridae, *Trachelyopterus lucenai* (Burns *et al.*, 2002), Pimelodidae, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), *Sorubim lima* (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000) e *Iheringichthys labrosus* (Santos *et al.*, 2001); Bagridae, *Pseudobagrus fulvidraco* (Lee, 1998) e *Leiocassis ussuriensis* (Kim e Lee, 2000) e Heptapteridae, *Rhamdia quelen* (Quagio-Grassiotto, 2001).

O critério utilizado na escolha destes trabalhos foi a presença de uma boa fotodocumentação, que permitiu uma análise adequada dos caracteres, principalmente dos quantitativos, uma vez que para estes é necessário a realização de medidas das estruturas.

Visando a obtenção dos caracteres quantitativos foram realizadas medidas do comprimento e/ou da largura, com o auxílio de uma régua de 15,0 cm, das seguintes estruturas presentes nos espermatozoides: núcleo, peça intermediária e, quando presentes, fossa nuclear, canal citoplasmático e projeções laterais. Em todos os casos, as estruturas foram medidas sempre na região em que exibia o maior eixo. Para conversão do valor obtido em centímetros (cm) para micrômetros (μm), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$1 \mu\text{m} = \frac{\text{aumento final (AF)}}{10.000} = \text{comprimento da estrutura em centímetros}$$

Por exemplo: medida do comprimento do núcleo em uma fotomicrografia com um aumento final de 17.000X:

Com a régua mede-se, na elétron-micrografia, o comprimento da estrutura, no caso o núcleo, e obtém-se um valor correspondente, por exemplo, a 4,0 cm. A seguir colocam-se os valores na fórmula:

$$1 \mu\text{m} = \frac{17.000}{10.000} = 1,7 \text{ cm}$$

Aplica-se uma regra de três simples:

$$\begin{array}{l} 1\mu\text{m} \quad \text{_____} \quad 1,7\text{cm} \\ X\mu\text{m} \quad \text{_____} \quad 4,0 \text{ cm} \\ X = 2,35\mu\text{m} \end{array}$$

Portanto, 4,0 cm corresponde a 2,35 μm , ou seja, o comprimento do núcleo, em uma elétron-micrografia com aumento final de 17.000X, é de 2,35 μm .

As medidas obtidas foram trabalhadas em planilhas do programa Microsoft Excel (Windows XP), em seus valores absolutos. Foram calculados para o conjunto de valores das medidas de cada caráter quantitativo a média, o desvio padrão, o valor máximo e o

valor mínimo. A partir das medidas obtidas foram construídos, também no Excel, gráficos de dispersão, visando a definição dos intervalos de valores referentes a cada estado do caráter quantitativo, permitindo, assim, a codificação desses caracteres em caracteres qualitativos.

- Construção da matriz de dados

A partir da lista de caracteres obtida foi construída uma matriz de dados com as espécies analisadas neste estudo, bem como com as outras espécies descritas na literatura (Tabela VII).

Para efeito comparativo com grupos externos, foram utilizadas espécies consideradas mais basais entre os Siluriformes segundo o cladograma de Britto (2003). Assim, *Diplomystes mesembrinus* foi escolhido como grupo-irmão de todos Siluriformes; *Cetopsis coecutiens* foi escolhido como grupo-irmão de todos Siluriformes, com exceção de *Diplomystes*; *Liobagrus mediadiposalis* foi escolhido como representante de Sisoroidea e próximo a Loricarioidea. Uma espécie da ordem Characiformes, *Citharinus* sp., da família Citharinidae (Mattei, 1995), foi incluída na matriz de dados como grupo-externo dos Siluriformes. Esta espécie foi escolhida, dentre as outras da ordem Characiformes que possuem seus espermatozóides descritos, em razão de se tratar de um grupo reconhecidamente primitivo dentro de Characiformes (Fink e Fink, 1981).

Uma outra matriz de dados foi construída, combinando os caracteres da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides com os 331 caracteres descritos e apresentados por Britto (2003) em sua análise filogenética da ordem Siluriformes. Embora o estudo de Britto (2003) incluía espécies de todos os principais grupos de Siluriformes, na matriz de dados combinados foram utilizadas apenas as espécies de Loricarioidea, de famílias consideradas mais próximas a Loricarioidea e de um representante da ordem Characiformes. O critério para a escolha destas espécies teve por base a utilização, quando possível, da mesma espécie que foi utilizada na matriz de dados da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides; quando não, utilizou-se uma espécie do mesmo gênero. Como não havia para a família Loricariidae, espécie ou gênero que concordasse em ambos os estudos, foram utilizados os dados morfológicos do gênero *Neoplecostomus*, por

ser considerado o membro mais primitivo dentro desta família. Para a ordem Characiformes foi escolhida a única espécie disponível no trabalho, a qual, coincidentemente, faz parte da mesma família de *Citharinus* sp.. As espécies do estudo de Britto (2003) utilizadas, portanto, foram: *Diplomystes mesembrinus* (Diplomystidae), *Liobagrus reinii* (Amblycipitidae), *Cetopsis coecutiens* (Cetopsidae), *Nematogenys inermis* (Nematogenyidae), *Trichomycterus striatus* (Trichomycteridae), *Corydoras diffluviatilis* (Callichthyidae), *Neoplecostomus microps* (Loricariidae) e o caraciforme *Hemigrammocharax machadoi* (Citharinidae).

- Metodologia utilizada na análise filogenética

As matrizes de dados obtidas foram analisadas pelo método cladístico como implementado pelo programa PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versão 4.0b10 compatível com Microsoft Windows, seguindo as recomendações de Swofford e colaboradores (1996, 2002), Nei e Kumar (2000) e Schneider (2003). O critério utilizado nas análises foi o de Máxima Parcimônia, empregando como estratégia na pesquisa das árvores mais parcimoniosas, a busca heurística. Para esta busca foram feitas 1000 réplicas. Nestas réplicas o conjunto inicial de cladogramas foi obtido através do algoritmo “stepwise addition”, com a escolha “as is” dos primeiros três táxons, presentes nas matrizes de dados, que fizeram parte destas árvores iniciais. As árvores, assim obtidas, foram submetidas a um rearranjo dos seus ramos através do algoritmo de “branch swapping” denominado “tree bisection and reconnection” (TBR). A otimização dos caracteres sobre os cladogramas obtidos visando a estimativa dos comprimentos dos ramos, foi feita utilizando-se a opção ACCTRAN (accelarated transformation optimization), a qual maximiza as reversões em detrimento das convergências. O método estatístico utilizado para testar o grau de confiabilidade das árvores filogenéticas obtidas foi o teste do *bootstrap*, para o qual foram feitas 1000 réplicas.

Várias análises filogenéticas foram realizadas a fim de testar hipóteses de relacionamentos entre os membros constituintes de Loricarioidea analisados até o momento, bem como entre estes e os outros grupos de Siluriformes.

Na maioria das análises filogenéticas realizadas, os caracteres da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides foram tratados como não ordenados. Esta opção de tratar os caracteres como não ordenados, assumindo que cada estado de caráter pode ter sido derivado diretamente de qualquer outro, teve por base considerar um número mínimo de transformações de caracteres na obtenção das árvores mais parcimoniosas. Nestas análises, os grupos externos utilizados foram: *D. mesembrinus*, *C. coecutiens*, *L. mediadiposalis* e *Citharinus* sp.. Entretanto, para uma das análises os caracteres foram tratados como ordenados.

Na análise filogenética conduzida com a matriz de dados combinados, os caracteres referentes a ultraestrutura dos espermatozóides foram tratados como ordenados. Os caracteres osteológicos e de morfologia externa também foram tratados como ordenados de acordo com Britto (2003). Os grupos externos utilizados nesta análise foram *Citharinus* sp. e *H. machadoi*. Com o objetivo de verificar se houve alteração no suporte dos ramos, na topologia obtida nesta análise foi calculado o índice de decaimento ou de Bremer implementado pelo programa SEPAL (Strongest Evidence and Parsimony Analyser) (Salisbury, 2001), para os dados combinados e apenas para os dados osteológicos e de morfologia externa.

4. RESULTADOS

4.1. Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural do material permitiu a descrição das características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides das espécies: *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon* e *Cetopsis coecutiens*. Para as espécies *Nematogenys inermis* e *T. reinhardti*, somente a ultraestrutura dos espermatozóides foi descrita, uma vez que os exemplares analisados encontravam-se maduros.

A descrição das características ultraestruturais referentes aos espermatozóides de *N. inermis*, *T. aff. iheringi* e *T. areolatus* encontram-se apresentadas no trabalho intitulado: “Comparative analysis of the ultrastructure of spermatozoa in Nematogenyidae and Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes, Loricarioidea)”, que foi submetido ao *Journal of Fish Biology* (Anexo 1). As outras descrições são apresentadas a seguir:

4.1.1. Família Trichomycteridae, subfamília Trichomycterinae

- Espermiogênese em *Trichomycterus* (Figuras 7 a 10)

A espermiogênese do gênero *Trichomycterus* foi definida com base na análise das espermátides das espécies: *T. aff. iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Alambari) e *T. sp.* (Jacutinga).

A espermiogênese em *Trichomycterus* ocorre no interior de cistos localizados no compartimento germinativo. Nos cistos, as espermátides iniciais encontram-se interligadas por meio de pontes citoplasmáticas, as quais são resultantes de citocineses incompletas durante as divisões celulares (Fig. 7A). Nas espermátides iniciais, o complexo centriolar situa-se lateralmente ao núcleo, com o centríolo distal ancorado na membrana plasmática. O desenvolvimento do flagelo ocorre, então, lateralmente ao núcleo a partir do centríolo distal (Figs. 7B-E, 8A e B, 9A-C, 10A e B). Ao longo da espermiogênese, o núcleo sofre uma rotação parcial em relação ao flagelo em *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga) e *T. sp.*

(Alambari), o que resulta na permanência do flagelo na posição lateral (Figs. 7A-E, 9A-C, 10A, B, E e F). Em *T. areolatus* a rotação nuclear é praticamente completa, determinando uma posição excêntrica do flagelo em relação ao núcleo (Figs. 8A-D). Com o início da rotação nuclear, observa-se a formação da fossa nuclear, a qual assume uma posição lateral em relação ao núcleo em *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga) e *T. sp.* (Alambari) (Figs. 7D, 9A e B, 10A e F) e em *T. areolatus* sua posição é excêntrica (Figs. 8C e D). Em *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga) e *T. sp.* (Alambari) somente o centríolo proximal encontra-se inserido na fossa nuclear (Figs. 7B, 9B e 10D) e em *T. areolatus* o complexo centriolar está totalmente inserido (Fig. 8D). O processo de condensação da cromatina ocorre de maneira homogênea e inicia-se da base do núcleo até a sua região apical; permanecendo, com o evoluir do processo, com algumas áreas elétron-lúcidas (Fig. 7D, 8B e C, 9C, 10E e F). O complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, o que determina a formação do canal citoplasmático. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e em ângulo obtuso com o distal em *T. aff. iheringi* (Fig. 7B) e é lateral e em ângulo obtuso com o distal em *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga) e *T. sp.* (Alambari) (Figs. 8D, 9B, 10D). A massa citoplasmática migra em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a futura peça intermediária. Nesta observam-se mitocôndrias alongadas e também é notória a formação de vesículas (Figs. 7F e G, 8E, 9D e E, 10C, E e F), que já se mostram conectadas formando um compartimento membranoso em *T. aff. iheringi* (Fig. 7G). Na peça intermediária também são encontrados pontos elétron-densos, que possivelmente correspondam a grânulos de glicogênio (Figs. 7A, 8E, 9E, 10E). O flagelo exibe o axonema clássico de nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central. Observa-se nos flagelos de todas as espécies de *Trichomycterus* a formação de projeções laterais e em *T. sp.* (Alambari), também é observada a formação do compartimento membranoso (Figs. 7F inset, 8F e G, 9F, 10G-H).

- Espermatozóide de *Trichomycterus reinhardti* (Figura 11)

O espermatozóide *T. reinhardti* apresenta cabeça ovóide, peça intermediária assimétrica e um único flagelo lateral ao núcleo (Fig. 11A). Não há vesícula acrossomal. O núcleo de formato ovóide no sentido horizontal possui comprimento curto (1,76µm) e

largura média (1,46µm). A cromatina apresenta-se heterogeneamente compactada na forma de filamentos finos justapostos, sendo entremeada por poucas áreas elétron-lúcidas. A área citoplasmática ao redor do núcleo é estreita e nela não são encontradas organelas (Figs. 11B e C). A fossa nuclear é rasa (0,35µm), estreita (0,23µm), com formato em arco único e, posiciona-se lateralmente ao núcleo (Figs. 11D e E). A peça intermediária é média em comprimento (1,47µm) e em largura (0,88µm). Nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária são observadas poucas mitocôndrias de formato irregular (Fig. 11F). Nestas regiões as mitocôndrias distribuem-se aleatoriamente (Figs. 11F e G). As mitocôndrias encontram-se separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático (Figs. 11H-J). Não ocorrem vesículas na peça intermediária. O canal citoplasmático possui comprimento médio (1,05µm) e é estreito (0,31µm). O arranjo do complexo centriolar se dá com o centríolo proximal lateral e em ângulo reto com distal. Somente o centríolo proximal encontra-se inserido na fossa nuclear (Figs. 11D e E). O centríolo distal transforma-se em corpúsculo basal e desenvolve um flagelo com o axonema clássico (9+2). O flagelo apresenta duas projeções laterais de comprimento médio (0,28µm). Não ocorre compartimento membranosos no flagelo (Figs. 11K e L).

- Espermatozóide de *Trichomycterus* sp. (Jacutinga) (Figura 12)

O espermatozóide *T. sp.* apresenta cabeça ovóide, peça intermediária assimétrica e um único flagelo lateral ao núcleo (Fig. 12A). Não há vesícula acrossomal. O núcleo de formato arredondado possui comprimento curto (1,67µm) e largura média (1,64µm). A cromatina apresenta-se altamente compactada de maneira homogênea, sendo entremeada por áreas elétron-lúcidas (Figs. 12A-D). A área citoplasmática ao redor do núcleo é ampla no ápice do núcleo e estreita na lateral, não sendo observadas organelas (Figs. 12A e B). A fossa nuclear é rasa (0,30µm), apresentando largura média (0,43µm) e formato em arco único. Sua posição é lateral em relação ao núcleo (Figs. 12B e E). A peça intermediária é média em comprimento (1,34µm) e em largura (1,59µm). Nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária são observadas poucas mitocôndrias de formato alongado, e distribuição aleatória (Figs. 12F, G e I). As mitocôndrias encontram-se separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático (Figs. 12J-L). Uma quantidade moderada de

vesículas é encontrada nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária, podendo estar isoladas ou interconectadas umas às outras formando um compartimento membranoso. A distribuição das vesículas nessas regiões é aleatória (Figs. 12G-L). Na área citoplasmática apical ao núcleo e também da periferia da peça intermediária são observados microtúbulos (Figs. 12D e H). O canal citoplasmático possui comprimento (1,17 μ m) e largura (0,41 μ m) médios. O arranjo do complexo centriolar se dá com o centríolo proximal lateral e em ângulo obtuso ao distal. Somente o centríolo proximal encontra-se inserido na fossa nuclear (Figs. 12E e F). O centríolo distal transforma-se em corpúsculo basal e desenvolve um flagelo com o axonema clássico (9+2). O flagelo apresenta projeções laterais em número variável e de comprimento, em geral, médio (0,33 μ m), além de apresentar compartimento membranoso (Fig. 12M).

- Espermatozóide de *Trichomycterus* sp. (Alambari) (Figura 13)

O espermatozóide *T. sp.* apresenta cabeça esférica, peça intermediária assimétrica e um único flagelo lateral ao núcleo (Fig. 13A e B). Não há vesícula acrossomal. O núcleo de formato arredondado possui comprimento curto (1,73 μ m) e largura média (1,70 μ m). A cromatina apresenta-se altamente compactada de maneira homogênea, sendo entremeada por áreas elétricas-lúcidas. A área citoplasmática ao redor do núcleo é estreita, não sendo observadas organelas (Figs. 13B-D). A fossa nuclear é rasa (0,38 μ m), apresentando largura média (0,47 μ m) e formato em arco único. Sua posição é lateral em relação ao núcleo (Figs. 13B e E). A peça intermediária é média em comprimento (1,60 μ m) e em largura (1,63 μ m). Nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária são observadas poucas mitocôndrias de formato alongado. Nestas regiões as mitocôndrias distribuem-se aleatoriamente (Figs. 13F e G). As mitocôndrias encontram-se separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático (Figs. 13G, H e K). Uma quantidade moderada de vesículas é encontrada nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária, podendo estar isoladas ou interconectadas umas às outras formando um compartimento membranoso. A distribuição das vesículas nessas regiões é aleatória (Figs. 13G-J). O canal citoplasmático possui comprimento (1,47 μ m) e largura (0,38 μ m) médios. O arranjo do complexo centriolar se dá com o centríolo proximal lateral e em ângulo obtuso ao distal.

Somente o centríolo proximal encontra-se inserido na fossa nuclear (Fig. 13E). O centríolo distal transforma-se em corpúsculo basal e desenvolve um flagelo com o axonema clássico (9+2). O flagelo apresenta projeções laterais em número variável e de comprimento, em geral, médio (0,36µm), além de apresentar compartimento membranoso (Figs. 13L-N).

4.1.2. Família Callichthyidae, subfamília Corydoradinae

- Espermiogênese de *Corydoras flaveolus* (Figura 14)

As espermatídes nesta espécie são encontradas na luz do compartimento germinativo juntamente com os espermatozóides, sugerindo que a espermiogênese é semicística (Fig. 14A). No início deste processo, as espermatídes, fora dos cistos, mantêm-se conectadas a superfície apical das células de Sertoli, perifericamente distribuídas em relação ao espaço luminal (Figs. 14A-C). À medida que a espermiogênese progride esta conexão é perdida e as espermatídes mais diferenciadas avançam para o centro do compartimento luminal. Nas espermatídes iniciais, o complexo centriolar situa-se lateralmente ao núcleo, com o centríolo distal ancorado na membrana plasmática. O desenvolvimento flagelar, a partir do centríolo distal, ocorre, portanto, lateralmente ao núcleo (Figs. 14C e D). Ao longo da espermiogênese, não ocorre rotação nuclear e o flagelo assume um posicionamento excêntrico em relação ao núcleo (Fig. 14C). A fossa nuclear se forma e sua posição é excêntrica. O complexo centriolar situa-se totalmente fora da fossa nuclear (Fig. 14D). No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e coaxial em relação ao distal e entre os centríolos observa-se um bastão elétron-denso em posição transversal aos eixos dos centríolos. Em direção a esta estrutura convergem elementos do citoesqueleto oriundos de ambos os centríolos (Fig. 14D inset). O complexo centriolar não se movimenta, permanecendo preso à membrana plasmática (Fig. 14E). O processo de condensação da cromatina ocorre de maneira homogênea. Embora não ocorra o movimento do complexo centriolar, verifica-se a formação do canal citoplasmático (Fig. 14F). A massa citoplasmática migra em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a futura peça intermediária, a qual apresenta mitocôndrias alongadas e vesículas. É possível que a formação do canal citoplasmático ocorra devido a esta projeção da massa citoplasmática da

espermátide tardia em direção à região inicial do flagelo e também da interconexão de vesículas nesta mesma região (Figs. 14E e F). Observa-se também a formação, no citoplasma das espermátides, de uma estrutura esférica com periferia elétron-densa (Fig. 14G). O flagelo apresenta o axonema clássico (9+2) (Fig. 14D inset).

- Espermatozóide de *Corydoras flaveolus* (Figura 15)

O espermatozóide de *C. flaveolus* apresenta cabeça arredondada, peça intermediária assimétrica e um único flagelo excêntrico ao núcleo (Fig. 15A). Não há vesícula acrossomal. O núcleo de formato arredondado possui comprimento curto (1,88µm) e largura média (2,05µm). A cromatina apresenta-se altamente compactada de maneira homogênea e entremeada por áreas elétron-lúcidas. A área citoplasmática ao redor do núcleo é estreita e nela não são encontradas organelas (Figs. 15A-C). A fossa nuclear é muito rasa (0,07µm), apresentando largura média (0,35µm) e formato em arco único. Sua posição é excêntrica em relação ao núcleo (Fig. 15D). A peça intermediária é média tanto em comprimento (1,41µm) quanto em largura (2,05µm). Nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária é observada uma grande quantidade de mitocôndrias alongadas e ramificadas. Essas mitocôndrias preenchem totalmente as regiões apical e medial da peça intermediária e parcialmente a região basal (Figs. 15E-H). Poucas vesículas, não conectadas, são encontradas na região basal da peça intermediária, concentradas próximas ao flagelo. As vesículas preenchem totalmente a região onde elas se localizam (Figs. 15E-G). As mitocôndrias encontram-se separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático e também pelas vesículas (Figs. 15I e J). O canal citoplasmático é curto (0,35µm) e de largura média (0,36µm) (Figs. 15A, D e F). Como nas espermátides, também é observada, na peça intermediária do espermatozóide, a estrutura esférica com a periferia elétron-densa (Figs. 15F e G). O complexo centriolar encontra-se totalmente fora da fossa nuclear e o arranjo entre os centríolos se dá com o centríolo proximal anterior e coaxial ao distal. Entre os centríolos proximal e distal é encontrado o mesmo bastão elétron-denso já verificado nas espermátides (Fig. 15D). O centríolo distal transforma-se em corpúsculo basal e desenvolve um flagelo com o axonema clássico (9+2). Ao longo do flagelo observa-

se um compartimento membranoso. Não ocorrem projeções laterais no flagelo (Figs. 15K-N).

4.1.3. Família Loricariidae, subfamília Loricariinae

- Espermio gênese de *Loricariichthys platymetopon* (Figura 16)

A espermio gênese em *L. platymetopon* ocorre no interior de cistos localizados no compartimento germinativo. Nos cistos, as espermátides iniciais encontram-se interligadas por pontes citoplasmáticas, resultantes de citocineses incompletas durante as divisões celulares (Fig. 16A). Nestas espermátides, o complexo centriolar situa-se medialmente ao núcleo, com o centríolo distal ancorado na membrana plasmática. O desenvolvimento flagelar, a partir do centríolo distal, ocorre, portanto, medialmente ao núcleo (Figs. 16B). Ao longo da espermio gênese, não ocorre rotação nuclear e o flagelo permanece com um posicionamento medial em relação ao núcleo. Não se forma a fossa nuclear (Figs. 16C-E). O complexo centriolar situa-se próximo ao núcleo. No complexo centriolar, o centríolo proximal é anterior e perpendicular em relação ao distal (Figs. 16B, D e E). O complexo centriolar não se movimenta, permanecendo preso à membrana plasmática. O processo de condensação da cromatina ocorre de maneira homogênea (Figs. 16 D e E). Embora não ocorra o movimento do complexo centriolar, verifica-se a formação do canal citoplasmático (Figs. 16E e F). A massa citoplasmática migra em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a futura peça intermediária, a qual apresenta mitocôndrias alongadas e vesículas (Figs. 16 D-F). É possível que a formação do canal citoplasmático ocorra devido a esta projeção da massa citoplasmática da espermátide tardia em direção à região inicial do flagelo e também da interconexão de vesículas nesta mesma região. O flagelo apresenta o axonema clássico de (9+2) (Fig. 16F inset).

- Espermatozóide de *Loricariichthys platymetopon* (Figura 17)

O espermatozóide de *L. platymetopon* apresenta cabeça arredondada, peça intermediária assimétrica e um único flagelo excêntrico ao núcleo (Fig. 17A). Não há vesícula acrossomal. O núcleo de formato arredondado possui comprimento curto (1,92µm)

e largura média (2,02µm). A cromatina apresenta-se altamente compactada de maneira homogênea, sendo entremeada por áreas elétron-lúcidas. A área citoplasmática ao redor do núcleo é estreita e nela não são observadas organelas (Figs. 17B-D). Não há fossa nuclear (Figs. 17D e E). A peça intermediária é média tanto em comprimento (1,06µm) quanto em largura (2,02µm). Nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária são observadas muitas mitocôndrias alongadas. Essas mitocôndrias preenchem totalmente a região apical e parcialmente a região medial da peça intermediária, à exceção da área próxima ao complexo centriolar. Já a região basal da peça intermediária mostra poucas mitocôndrias (Figs. 17F-J). As mitocôndrias encontram-se separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático (Figs. 17M-O). Uma quantidade moderada de vesículas, não conectadas, é encontrada nas regiões medial e basal da peça intermediária, sendo concentrada na basal (Figs. 17K-O). As vesículas encontram-se preenchendo parcialmente a região medial da peça intermediária e totalmente a região basal. O canal citoplasmático é curto (0,25µm) e de largura média (0,41µm) (Figs. 17A, D e E). O complexo centriolar situa-se próximo ao núcleo e o arranjo entre os centríolos se dá com o centríolo proximal anterior e lateral, em ângulo reto, ao distal (Fig. 17E). Este último transforma-se em corpúsculo basal e desenvolve um flagelo com o axonema clássico (9+2). Não ocorrem projeções laterais e nem compartimento membranoso nos flagelos (Figs. 17O inset e P).

4.1.4. Família Cetopsidae, subfamília Cetopsinae

- Espermiogênese em *Cetopsis coecutiens* (Figura 18)

As espermatídes de *C. coecutiens* são encontradas na luz do compartimento germinativo juntamente com os espermatozóides, sugerindo que a espermiogênese é semicística (Figs. 18A e C). As espermatídes iniciais encontram-se agrupadas nas proximidades dos cistos de espermatócitos (Fig. 18B). Ao longo da espermiogênese estas espermatídes se direcionam para a região central da luz do compartimento germinativo, misturando-se, então, com os espermatozóides. Nas espermatídes iniciais, os centríolos situam-se mediantemente ao núcleo e encontram-se ancorados na membrana plasmática. O desenvolvimento dos flagelos, a partir dos dois centríolos, ocorre, portanto, medialmente ao

núcleo (Figs. 18D e E). Durante a espermiogênese, não ocorre rotação nuclear e os flagelos permanecem com um posicionamento medial em relação ao núcleo. A fossa nuclear se forma e sua posição é medial (Figs. 18D, E, G e H). Os centríolos encontram-se totalmente inseridos na fossa nuclear (Fig. 18H). No início da espermiogênese os centríolos assumem uma posição oblíqua um em relação ao outro, mas com o decorrer do processo os centríolos sofrem uma acomodação e passam a adotar uma posição lateral e paralela (Figs. 18 D e E). Os centríolos não se movimentam, permanecendo presos à membrana plasmática. O processo de condensação da cromatina ocorre de maneira heterogênea e inicia-se da base do núcleo até a sua região apical (Figs. 18G e G inset). Embora não ocorra o movimento dos centríolos em direção ao núcleo, verifica-se a formação do canal citoplasmático. A massa citoplasmática migra em direção ao segmento inicial do flagelo, formando a futura peça intermediária, a qual apresenta mitocôndrias alongadas e vesículas (Figs. 18F-H). É possível que a formação do canal citoplasmático ocorra devido a esta projeção da massa citoplasmática da espermatíde tardia em direção à região inicial do flagelo e também da interconexão de vesículas nesta mesma região. Os flagelos apresentam o axonema clássico (9+2) (Figs. 18G e H).

- Espermatozóide de *Cetopsis coecutiens* (Figura 19)

Os espermatozóides de *C. coecutiens* podem ser encontrados na luz do compartimento germinativo, isolados ou em grupos de número variado. Os pontos de interação entre as membranas dos espermatozóides, em geral, mostram-se mais elétrondensos (Figs. 19A-E). Os espermatozóides desta espécie apresentam cabeça semi-ovóide, peça intermediária simétrica e dois flagelos mediais ao núcleo (Figs. 19A, E e F). Não há vesícula acrossomal. O núcleo de formato semi-ovóide possui comprimento curto (1,29µm) e largura média (1,41µm). A cromatina apresenta-se compactada heterogeneamente na forma de filamentos finos justapostos, sendo entremeada por poucas áreas elétron-lúcidas (Figs. 19B, D e E). A área citoplasmática ao redor do núcleo é estreita e nela não são encontradas organelas (Figs. 19A, B e D). A fossa nuclear possui profundidade moderada (0,58µm), largura média (0,47µm), formato em arco único e, posiciona-se medialmente ao núcleo (Figs. 19E e F). A peça intermediária é curta em comprimento (0,47µm) e média em

largura (1,67 μ m). Nas regiões apical e medial da peça intermediária são observadas poucas mitocôndrias arredondadas. Nessas regiões as mitocôndrias distribuem-se perifericamente (Figs. 19E-H). Muitas vesículas são encontradas nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária, estando concentradas principalmente na região basal; estando interconectadas umas às outras formando um compartimento membranoso. Essas vesículas preenchem totalmente todas as regiões onde elas ocorrem (Figs. 19E-J). As mitocôndrias encontram-se separadas da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático e também pelas vesículas (Figs. 19I e J). O canal citoplasmático é curto (0,41 μ m) e possui largura média (0,47 μ m). Os centríolos são laterais e paralelos e, encontram-se totalmente inseridos na fossa nuclear (Figs. 19F e G). Ambos transformam-se em corpúsculos basais e desenvolvem cada um, um flagelo com o axonema clássico (9+2). Ao longo de toda a cauda os axonemas encontram-se individualizados, não compartilhando, portanto, a mesma membrana. Não ocorrem projeções laterais e nem compartimento membranoso nos flagelos (Figs. 19K e L).

FIGURA 7: Espermiogênese de *Trichomycterus aff. iheringi*

Fig. A: Cisto de espermátides. 7.750X, **Figs. B e C:** Espermátides evidenciando a inserção lateral do flagelo (secções longitudinais). 9.750X, 9.750X, **Fig. D:** Espermátide com núcleo com a cromatina em compactação (secção longitudinal). 17.000X, **Fig. E:** Espermátide em etapa final da espermiogênese. 11.700X, **Fig. F:** Região da peça intermediária, exibindo mitocôndrias, vesículas e grânulos de glicogênio (secção transversal). 13.250X, **Fig. F inset:** Flagelo detalhando o axonema clássico (9+2) e a formação de projeções laterais (secção transversal). 42.000X, **Fig. G:** Detalhe da fossa nuclear e da interconexão de vesículas na peça intermediária. 23.000X.

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **CM:** compartimento membranoso, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **S:** célula de Sertoli, **V:** vesícula, **★:** prolongamentos da célula de Sertoli, **⇨:** ponte citoplasmática, **➤:** grânulos de glicogênio, **✱:** mitocôndrias, **➡:** canal citoplasmático, **►:** projeções laterais.

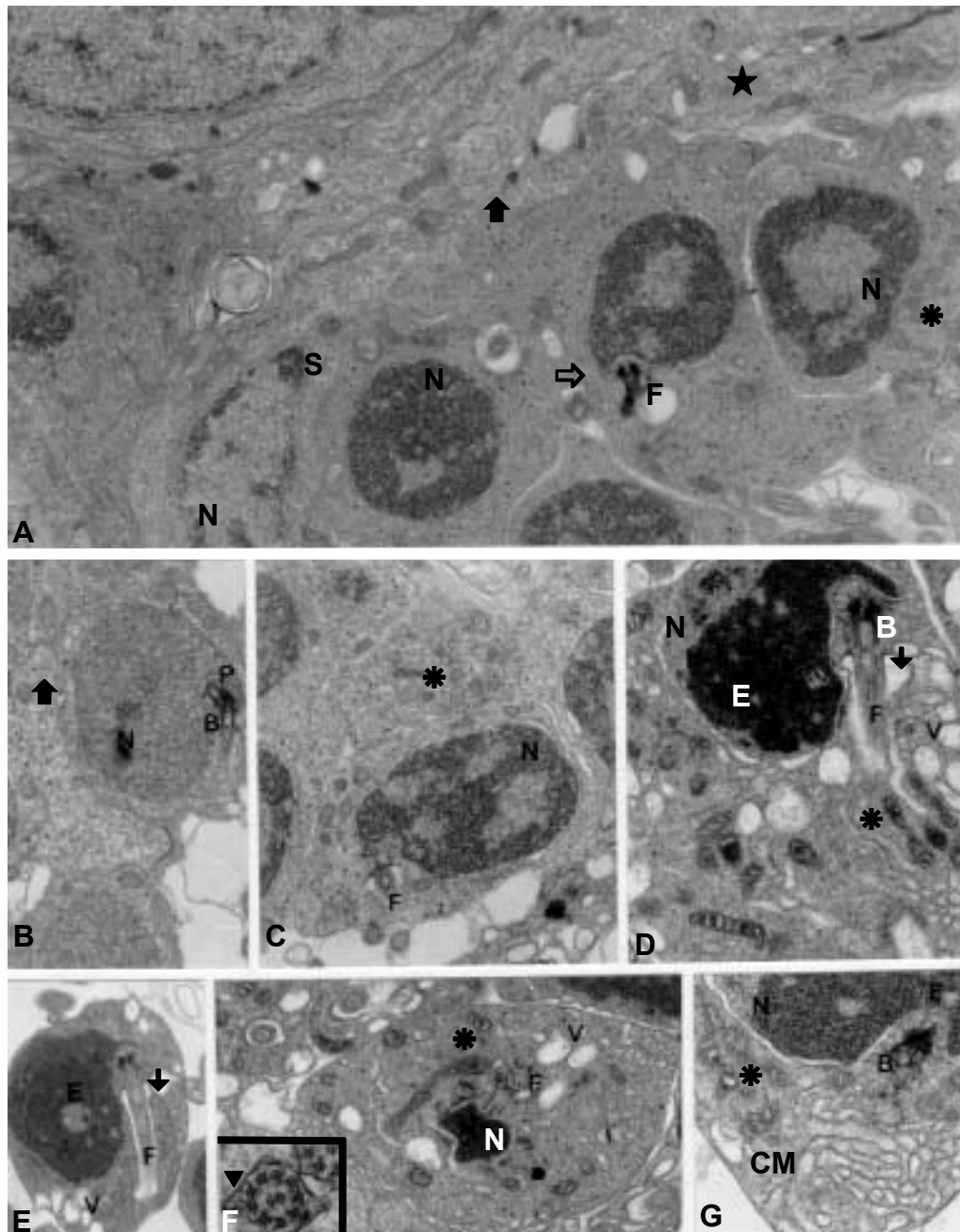


FIGURA 8: Espermiogênese de *Trichomycterus areolatus*

Fig. A: Espermátide evidenciando a inserção lateral do flagelo (secção longitudinal). 13.250X, **Figs. A a C:** Rotação nuclear e a formação do canal citoplasmático (secções longitudinais). 13.250X, 17.000X, 17.000X, **Fig. D:** Detalhe da fossa nuclear e do complexo centriolar (secção longitudinal). 17.000X, **Fig. E:** Região da peça intermediária, exibindo mitocôndrias, vesículas e grânulos de glicogênio (secção transversal). 17.000X, **Fig. F:** Flagelo em secção longitudinal. 15.300X, **Fig. G:** Flagelo em secção transversal detalhando o axonema clássico (9+2) e a formação das projeções laterais. 11.925X.

ABREVIATURAS

D: centríolo distal, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesícula, **■:** grânulos de glicogênio, *****: mitocôndrias, **➤:** canal citoplasmático, **►:** projeções laterais.

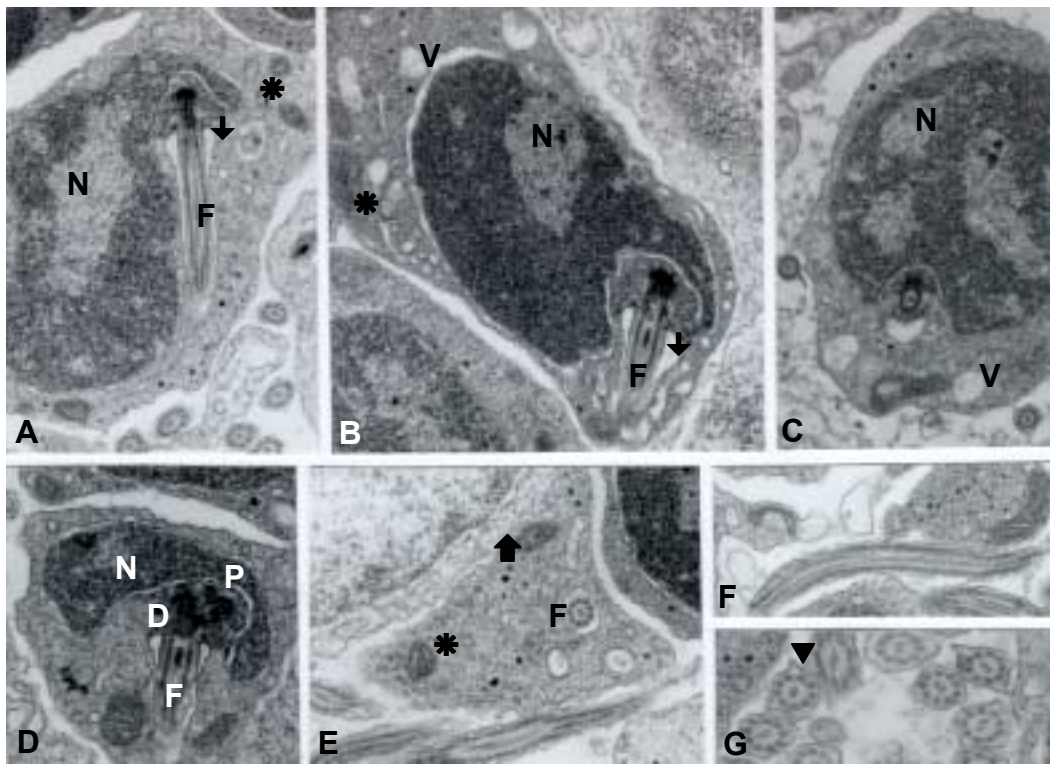


FIGURA 9: Espermiogênese de *Trichomycterus* sp. (Jacutinga)

Fig. A: Espermátide evidenciando a inserção lateral do flagelo (secção longitudinal). 13.600X, **Figs. B e C:** Rotação nuclear e a formação do canal citoplasmático (secções longitudinais). 17.000X, 18.400X, **Figs. D e E:** Região da peça intermediária, exibindo mitocôndrias, vesículas e grânulos de glicogênio (secções transversais). 17.000X, 17.000X, **Fig. F:** Flagelo em secção transversal apresentando o axonema clássico (9+2) e a formação das projeções laterais. 27.600X.

FIGURA 10: Espermiogênese de *Trichomycterus* sp. (Alambari)

Figs. A e B: Espermátides com inserção lateral do flagelo (secções longitudinais). 13.250X, 17.000X, **Fig. C:** Detalhe das mitocôndrias e vesículas. 17.000X, **Fig. D:** Posição do complexo centriolar na fossa nuclear. 13.250X, **Figs. E e F:** Espermátides mostrando o padrão homogêneo de compactação da cromatina. 17.000X, 17.000X. **Figs. G e H:** Flagelos em secções transversais detalhando o axonema clássico (9+2) e a formação das projeções laterais e do compartimento membranoso. 17.000X, 37.400X.

ABREVIATURAS

D: centríolo distal, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesícula, ➡: grânulos de glicogênio, ✱: mitocôndrias, ➤: canal citoplasmático, ►: projeções laterais, ▷: compartimento membranoso.

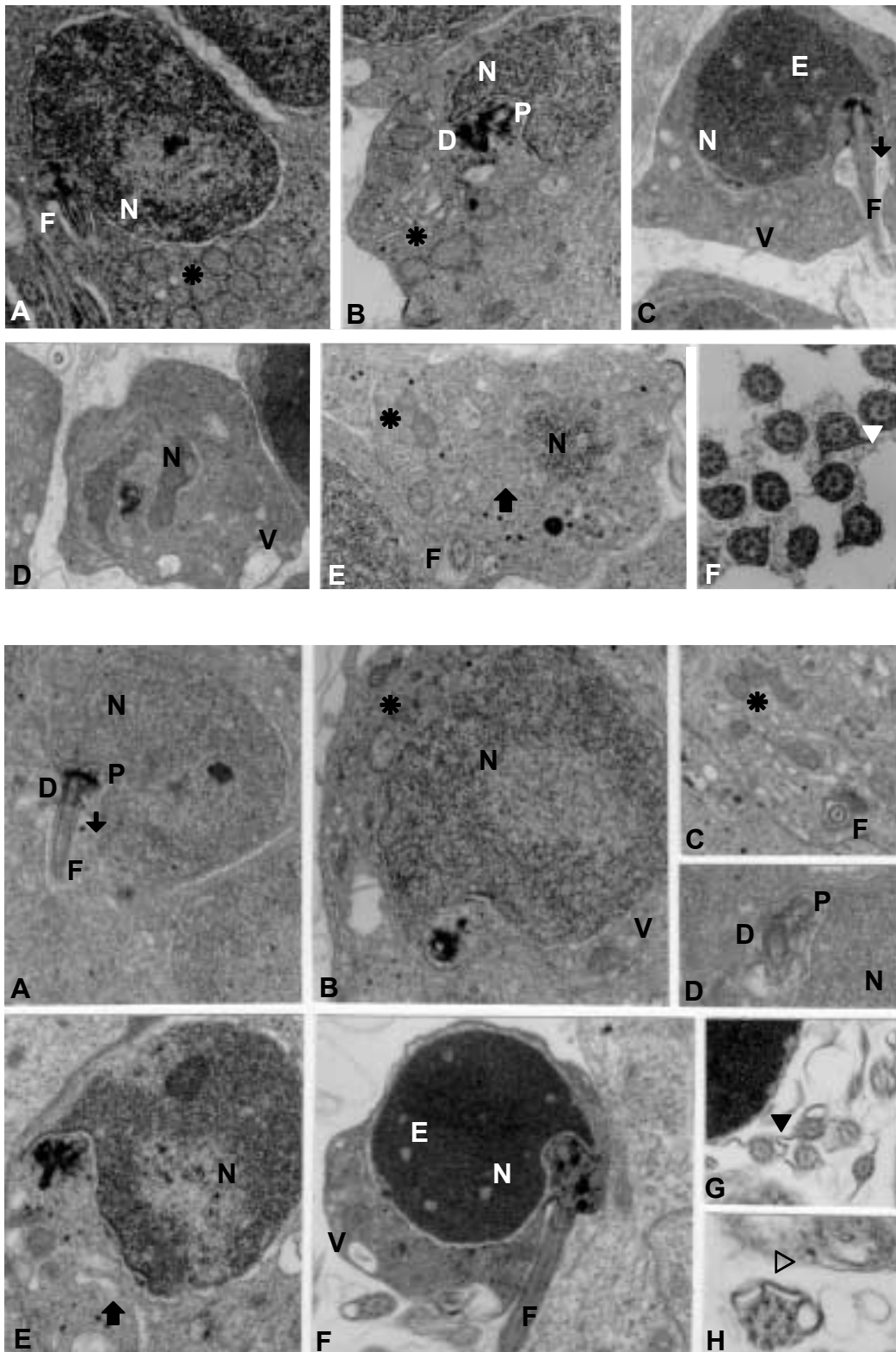


FIGURA 11: Espermatozóide de *Trichomycterus reinhardti*

Fig. A: Espermatozóide evidenciando a posição lateral do flagelo (secção longitudinal). 25.200X, **Figs. B e C:** Secções transversais da região da cabeça. 17.000X, 15.180X, **Figs. D e E:** Detalhe da fossa nuclear e da posição do complexo centriolar. 42.000X, 57.500X, **Fig. F:** Assimetria da peça intermediária (secção longitudinal). 23.800X, **Fig. G:** Detalhe das mitocôndrias na região basolateral ao núcleo. 23.000X, **Figs. H a J:** Canal citoplasmático em diferentes regiões da peça intermediária. 23.000X, 40.250X, 42.000X, **Figs. K e L:** Flagelos com o axonema clássico (9+2) e projeções laterais. 31.500X (secção longitudinal), 42.000X (secção transversal).

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **C:** complexo centriolar, **D:** centríolo distal, **E:** áreas elétronicamente lúcidas, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, *****: mitocôndrias, **➤:** canal citoplasmático, **▶:** projeções laterais.

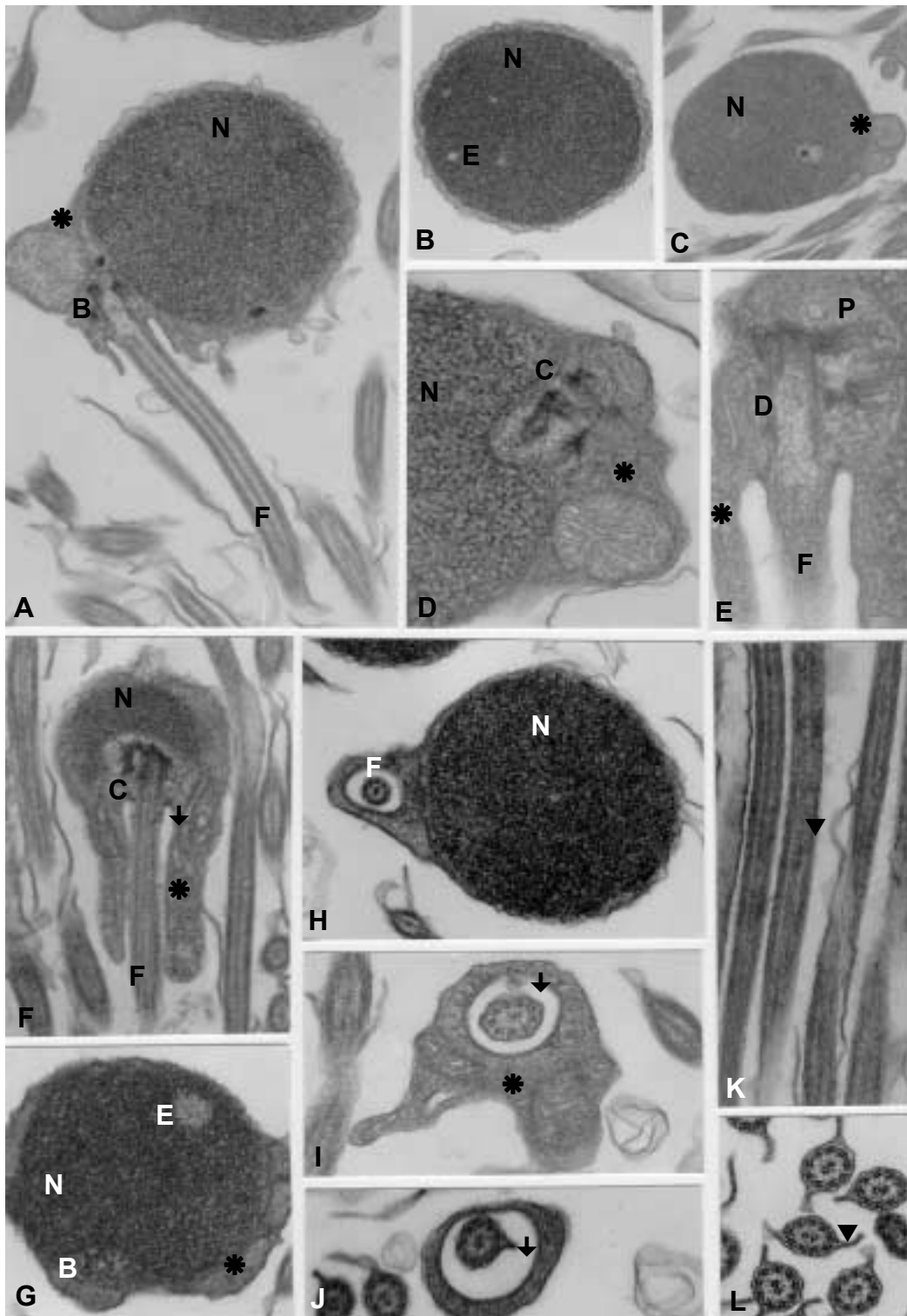


FIGURA 12: Espermatozóide de *Trichomycterus* sp. (Jacutinga)

Figs. A e B: Espermatozóides em secção longitudinal. 23.000X, 18.400X, **Fig. C:** Secção transversal da região da cabeça. 13.800X, **Figs. D e E:** Detalhe da fossa nuclear e da posição do complexo centriolar. 18.400X, 17.000X, **Fig. F:** Assimetria da peça intermediária (secção longitudinal). 23.000X, **Figs. G a J:** Detalhe das mitocôndrias, vesículas e microtúbulos presentes na peça intermediária. 23.000X, 31.500X, 18.400X, 18.400X, **Fig. K:** Peça intermediária evidenciando o compartimento membranoso. 22.050X, **Fig. L:** Peça intermediária evidenciando as vesículas e o canal citoplasmático. 16.100X, **Fig. M:** Flagelo constituído pelo axonema clássico (9+2) e mostrando as projeções laterais e o compartimento membranoso. 23.000X (secções longitudinal e transversal).

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **D:** centríolo distal, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **CM:** compartimento membranoso, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesícula, *****: mitocôndrias, **♦:** microtúbulos, **➤:** canal citoplasmático, **►:** projeções laterais, **▷:** compartimento membranoso.

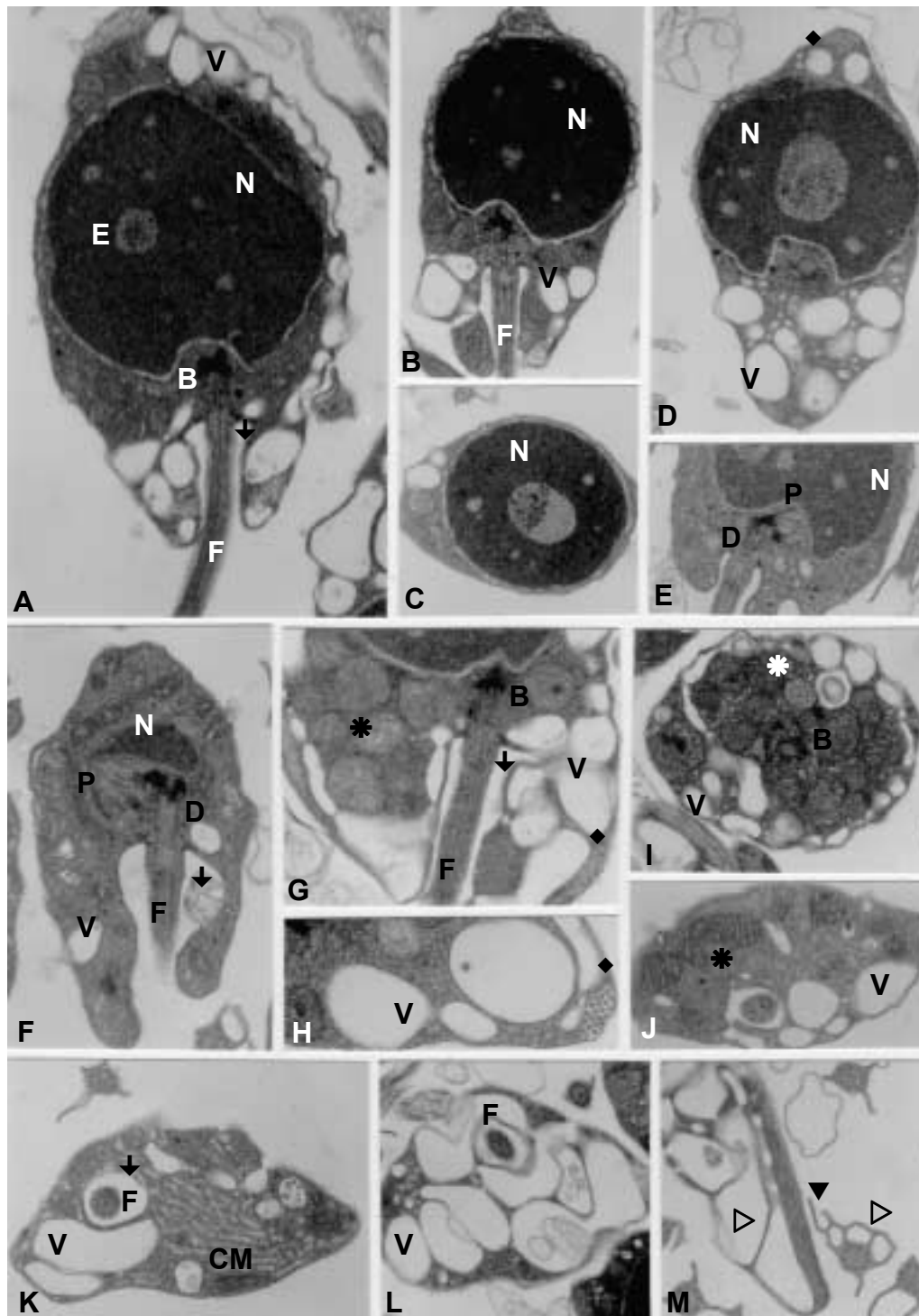


FIGURA 13: Espermatozói de *Trichomycterus* sp. (Alambari)

Figs. A e B: Espermatozóides em secções longitudinais. 23.000X, 17.000X, **Fig. C:** Secção transversal da região da cabeça. 18.400X, **Figs. D e E:** Detalhe do canal citoplasmático e da posição do complexo centriolar na fossa nuclear. 17.000X, 31.500X, **Fig. F:** Assimetria da peça intermediária (secção longitudinal). 31.500X, **Figs. G a K:** Secções em diferentes alturas da peça intermediária mostrando mitocôndrias, vesículas, compartimento membranoso e canal citoplasmático. 18.400X, 18.400X, 31.500X, 25.200X, 23.800X, **Figs. L a N:** Flagelo constituído pelo axonema clássico (9+2) e mostrando as projeções laterais e o compartimento membranoso. 31.500X, 31.500X, 31.500X (secções transversais).

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **D:** centríolo distal, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **CM:** compartimento membranoso, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesícula, *****: mitocôndrias, ➔: canal citoplasmático, ►: projeções laterais, ▷: compartimento membranoso.

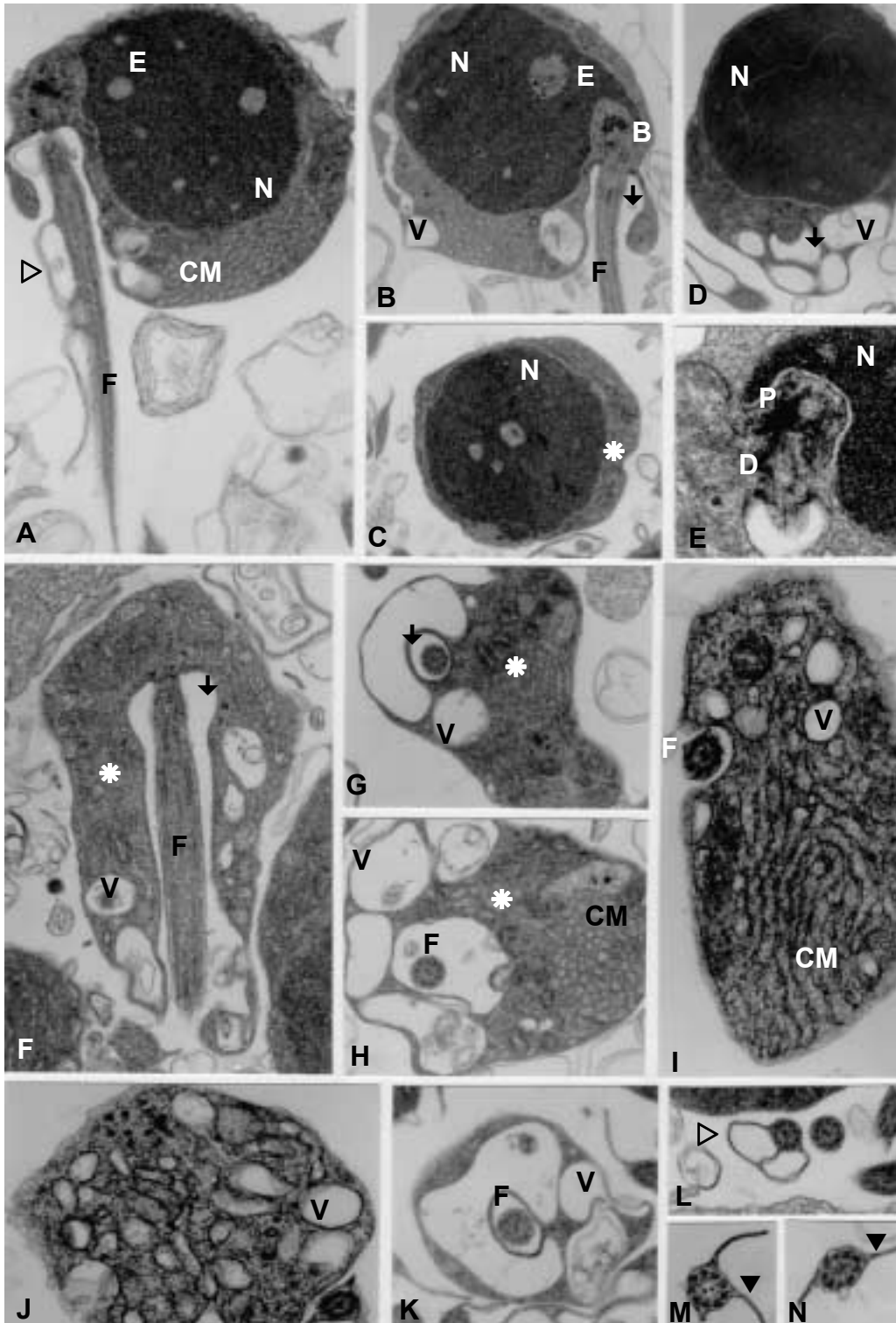


FIGURA 14: Espermiogênese de *Corydoras flaveolus*

Fig. A: Espermátides junto com os espermatozóides na luz do compartimento germinativo. 3.250X, **Fig. B:** Conexão entre a espermátide jovem e a célula de Sertoli. 4.875X, **Fig. C:** Espermátide evidenciando a inserção lateral do flagelo (secção longitudinal). 5.750X, **Fig. D:** Detalhe da fossa nuclear e da posição do complexo centriolar. 13.250X **Fig. D – inset (I):** Complexo centriolar exibindo o bastão elétron-denso entre os centríolos proximal e distal. 17.000X, **Fig. D – inset (II):** Flagelo em secção transversal mostrando o axonema clássico (9+2). 23.850X, **Figs. E e F:** Região da peça intermediária, exibindo mitocôndrias, vesículas e a formação do canal citoplasmático. 9.750X, 9750X, **Fig. G:** Formação, no citoplasma da peça intermediária, da estrutura esférica de periferia elétron-densa. 7.750X.

ABREVIATURAS

C: complexo centriolar, **D:** centríolo distal, **LU:** luz, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **S:** célula de Sertoli, **V:** vesícula, **Z:** espermatozóide, **→:** bastão elétron-denso, *****: mitocôndrias, **➔:** canal citoplasmático, **▶▶:** conexão entre a célula de Sertoli e a espermátide, **◊:** esfera de periferia elétron-densa.

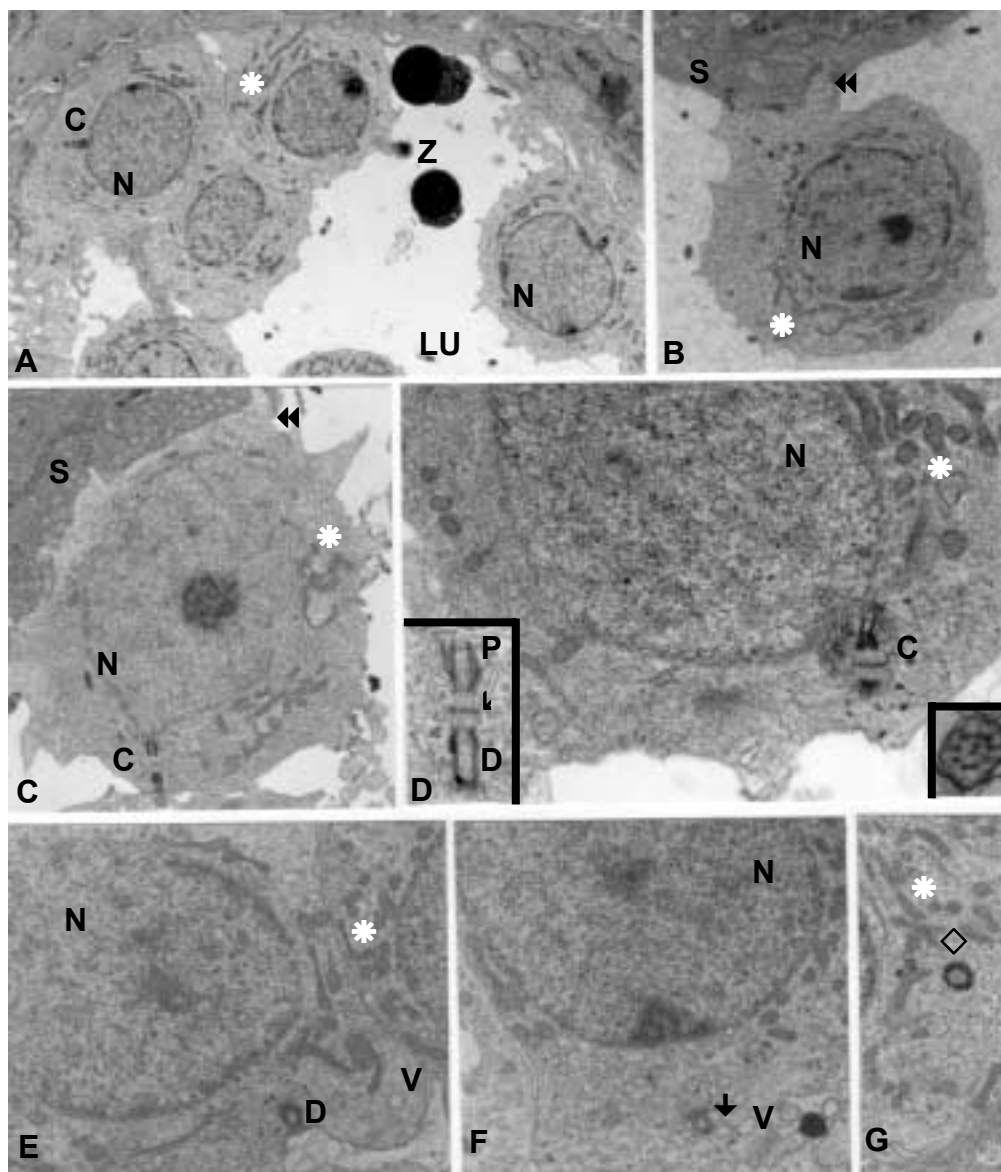


FIGURA 15: Espermatozóide de *Corydoras flaveolus*

Fig. A: Espermatozóide em secção longitudinal. 17.000X, **Figs. B e C:** Secções transversais da região da cabeça. 15.750X, 15.750X, **Fig. D:** Detalhe da fossa nuclear e do complexo centriolar. 28.350X, **Figs. E a H:** Secções da peça intermediária mostrando mitocôndrias, vesículas e a estrutura de periferia elétron-densa. 23.000X, 23.000X, 42.000X, 23.000X, **Figs. I e J:** Detalhe do canal citoplasmático e das vesículas ao redor do flagelo. 18.900X, 25.200X, **Figs. K a N:** Flagelos constituídos pelo axonema clássico (9+2) e mostrando o compartimento membranoso. 25.300X, 31.500X, 42.000X, 31.500X.

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **D:** centríolo distal, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesícula, **→:** bastão elétron-denso, **✱:** mitocôndrias, **➡:** canal citoplasmático, **▷:** compartimento membranoso, **◇:** esfera de periferia elétron-densa.

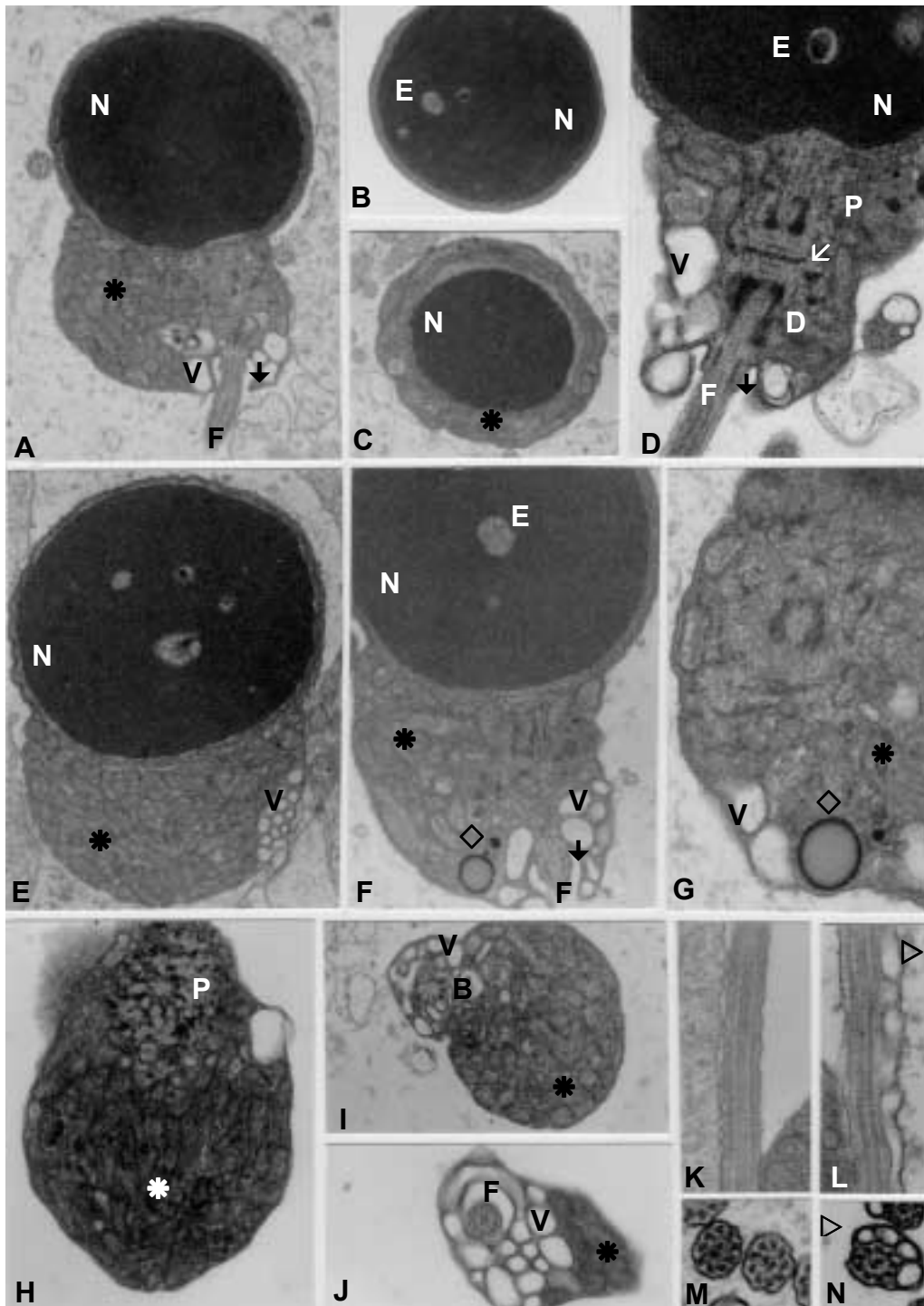


FIGURA 16: Espermiogênese de *Loricariichthys platymetopon*

Fig. A: Cisto de espermatídes. 4.350X, **Figs. B e C:** Espermatídes evidenciando a inserção medial do flagelo (secções longitudinais) e o complexo centriolar. 17.000X, 7.750X, **Figs. D e E:** Peça intermediária com mitocôndriass e vesículas mostrando a formação do canal citoplasmático. 9.750X, 11.925X, **Fig. F:** Detalhe das mitocôndriass, vesículas e canal citoplasmático. 23.000X, **Fig. F – inset:** Axonema clássico (9+2). 29.150X.

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **C:** complexo centriolar, **D:** centríolo distal, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **S:** célula de Sertoli, **V:** vesícula, **★:** prolongamentos da célula de Sertoli, **⇨:** ponte citoplasmática, **✱:** mitocôndrias, **➤:** canal citoplasmático.

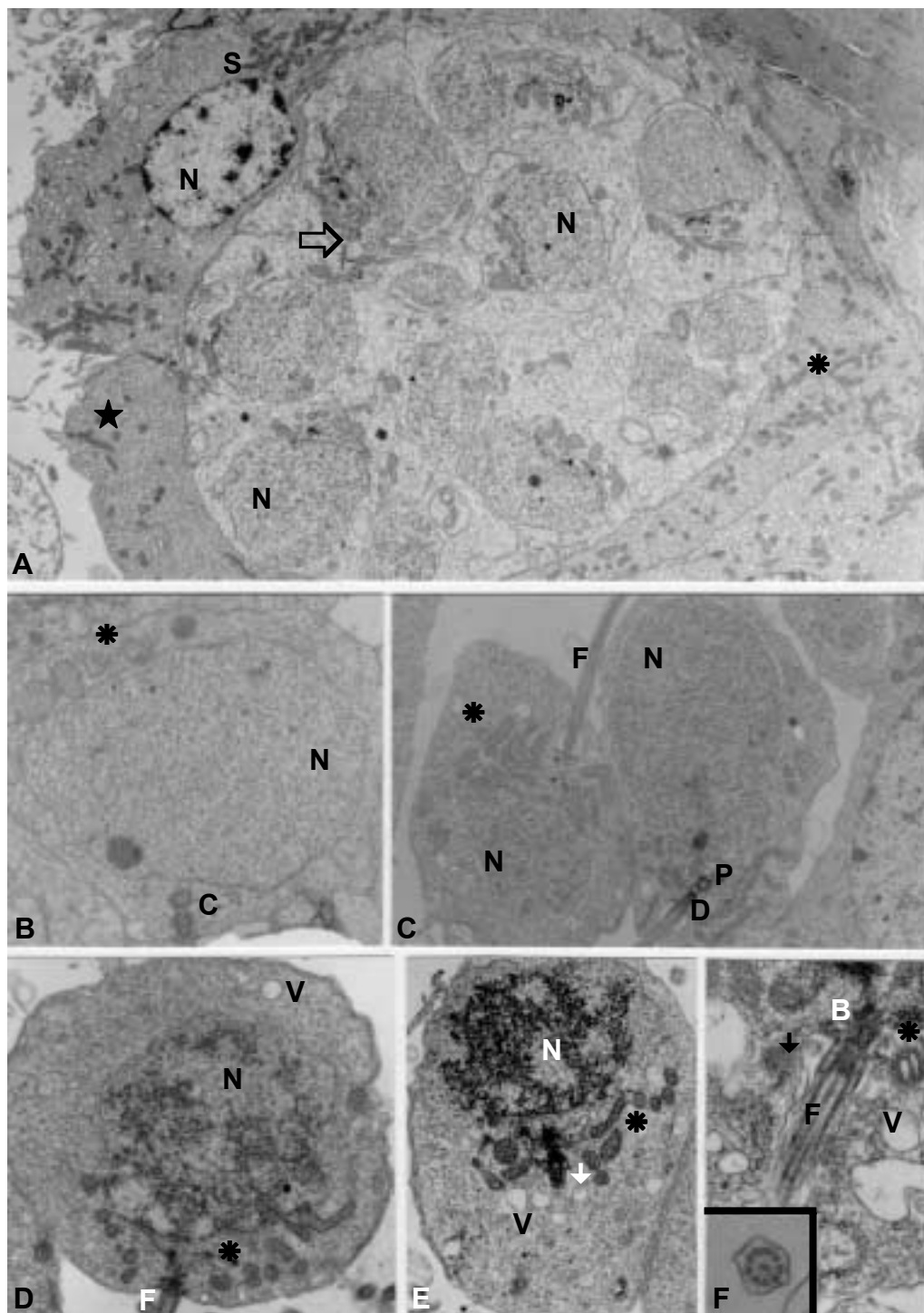


FIGURA 17: Espermatozóide de *Loricariichthys platymetopon*

Fig. A: Espermatozóide em secção longitudinal. 19.780X, **Fig. B:** Secção transversal da região da cabeça. 18.400X, **Figs. C e D:** Espermatozóides evidenciando a região da peça intermediária. 15.300X, 13.250X, **Fig. E:** Detalhe do complexo centriolar. 22.100X, **Figs. F a J:** Peça intermediária mostrando mitocôndrias e vesículas. 20.700X, 23.000X, 31.500X, 9.520X, 20.400X, **Figs. K a O:** Secções transversais em diferentes alturas da região da peça intermediária, mostrando mitocôndrias, vesículas e canal citoplasmático. 11.900X, 28.350X, 6.625X, 17.000X, 17.000X, **Fig. O – inset:** Axonema clássico (9+2). 34.000X, **Fig. P:** Flagelo em secção longitudinal. 37.800X.

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **P:** centríolo proximal, **V:** vesícula, ***:** mitocôndrias, **➔:** canal citoplasmático.

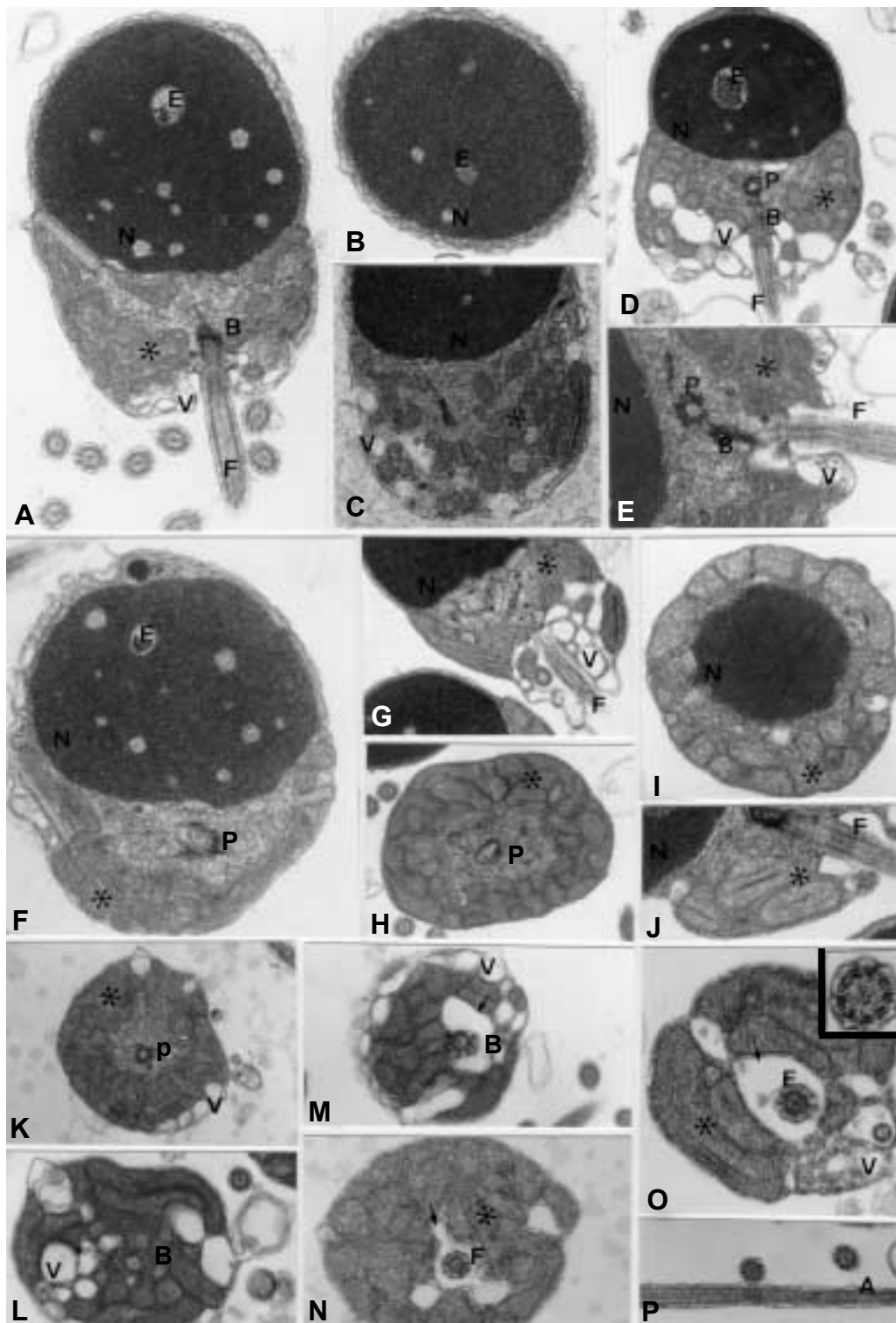


FIGURA 18: Espermiogênese de *Cetopsis coecutiens*

Fig. A: Grupo de espermatídes próximo dos cistos de espermatócitos. 3.306X, **Fig. B:** Detalhe da proximidade entre as espermatídes e os cistos de espermatócitos. 5.425X, **Fig. C:** Espermatídes junto com os espermatozóides na luz do compartimento germinativo. 9.275X, **Figs. D e E:** Detalhe da posição dos centríolos. 13.600X, 17.000X, **Fig. F:** Peça intermediária exibindo mitocôndrias e vesículas. 13.600X, **Figs. G e G – inset:** Processo heterogêneo de compactação da cromatina. 13.600X, 10.600X, **Fig. H:** Espermatíde final. 18.400X.

ABREVIATURAS

B: corpúsculo basal, **CE:** centríolos, **CI:** cisto de espermatócitos, **E:** áreas elétricas, **ES:** grupo de espermatídes, **F:** flagelo, **G:** cisto de espermatogônias, **N:** núcleo, **S:** célula de Sertoli, **V:** vesícula, **Z:** espermatozóide, ***:** mitocôndrias, **➤:** canal citoplasmático.

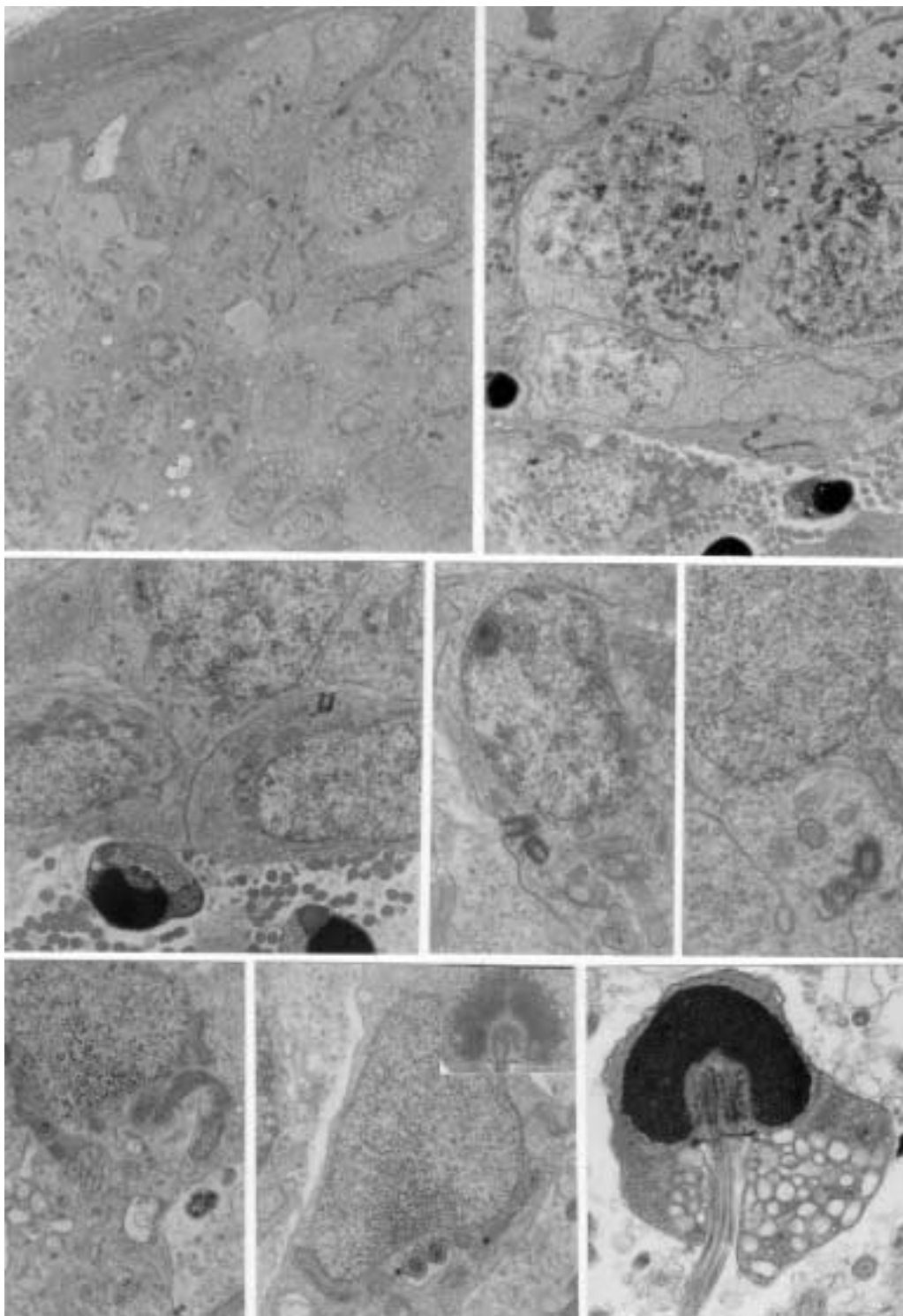
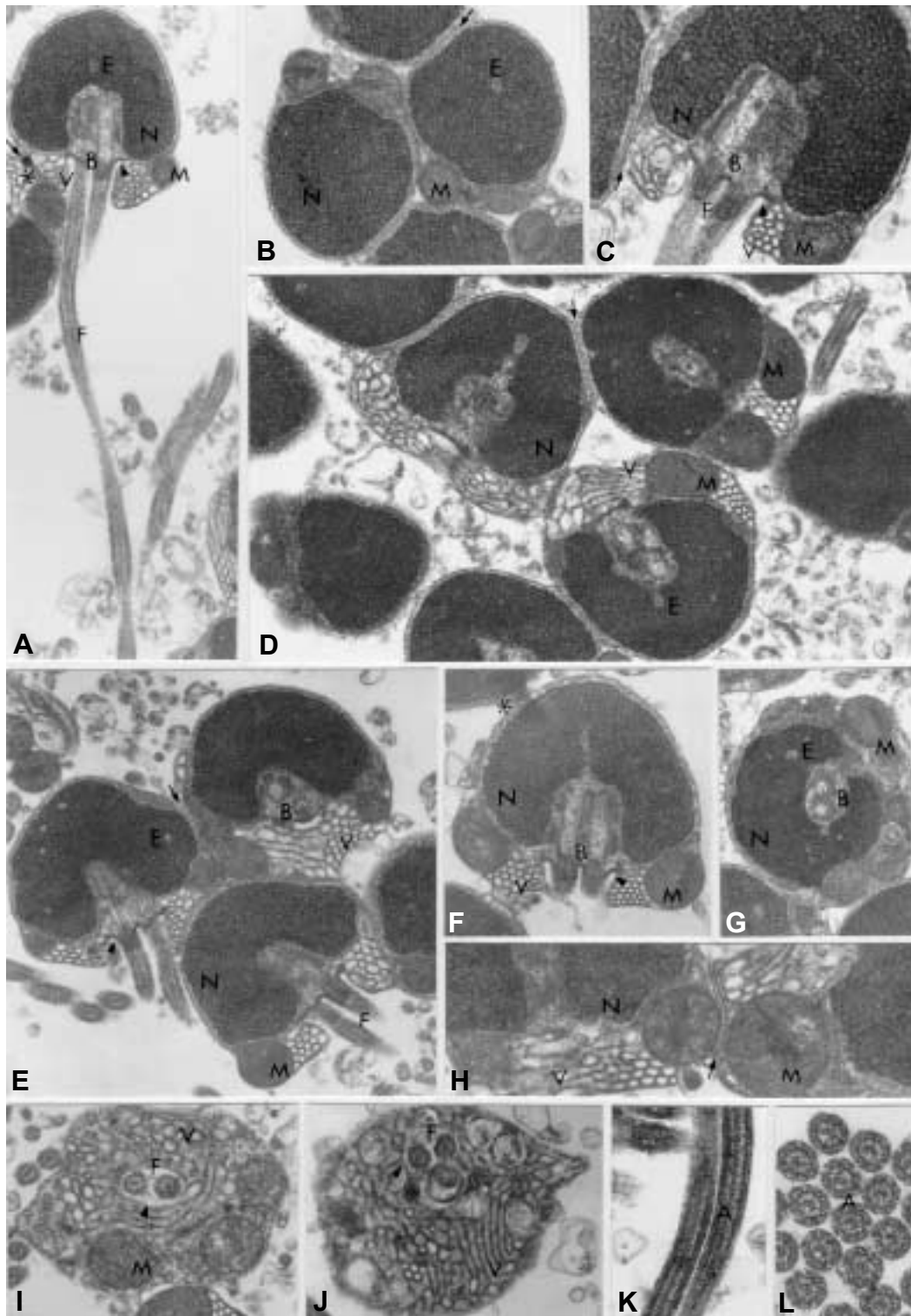


FIGURA 19: Espermatozóide de *Cetopsis coecutiens*

Fig. A: Espermatozóide em secção longitudinal. 17.000X, **Figs. B a E:** Associações entre os espermatozóides. 18.400X, 31.500X, 20.700X, 18.400X, **Fig. F:** Detalhe da fossa nuclear e dos centríolos. 22.050X, **Figs G a J:** Detalhe das mitocôndrias, das vesículas e do canal citoplasmático. 16.100X, 31.500X, 20.400X, 20.400X, **Figs: K e L:** Flagelos com o axonema clássico (9+2). 31.500X, 37.800X.

ABREVIATURAS

A: axonema, **B:** corpúsculo basal, **E:** áreas elétron-lúcidas, **F:** flagelo, **N:** núcleo, **V:** vesícula, **M:** mitocôndrias, **➡:** ponto de interação entre espermatozóides adjacentes, **▶:** canal citoplasmático.



4.2. Análise filogenética

4.2.1. Lista de caracteres

Está apresentada a seguir a lista de 58 caracteres obtida com base na análise da ultraestrutura da espermiogênese e do espermatozóide de diferentes espécies de Siluriformes. Essa lista mostra, portanto, uma relação de caracteres e seus respectivos estados, que ocorrem na ordem Siluriformes. Os caracteres apresentados encontram-se ordenados e para cada estado de caráter é fornecida uma relação dos táxons terminais, 23 espécies da ordem Siluriformes e uma da ordem Characiformes, com as respectivas condições. O ordenamento dos caracteres teve por base a ordem de seu aparecimento nos grupos reconhecidamente mais primitivos.

Para alguns caracteres é apresentado um enunciado com a definição do caráter. Os caracteres de 1 a 10 referem-se às características ultraestruturais observadas nas espermatídes durante o processo de espermiogênese. Os demais caracteres correspondem às características ultraestruturais dos espermatozoides.

Com relação às espécies *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Cetopsis coecutiens*, *Diplomystes mesembrinus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum* e *Sorubim lima*, além dos seus respectivos estados referentes aos caracteres da ultraestrutura dos seus espermatozoides, são apresentados também os estados de cada caráter referente ao processo de espermiogênese, uma vez que para estas espécies há dados sobre a ultraestrutura da espermiogênese. Os dados disponíveis sobre as outras espécies, *Nematogenys inermis*, *T. reinhardti*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Ictalurus punctatus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Iheringichthys labrosus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis* e *Rhamdia quelen*, referem-se a ultraestrutura dos espermatozoides. Assim, para estas espécies são apresentados os respectivos estados apenas para os caracteres referentes à ultraestrutura dos espermatozoides.

Para *Citharinus sp.* também está apresentada somente as condições para os caracteres da ultraestrutura do seu espermatozóide.

1. POSIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO FLAGELO EM RELAÇÃO AO NÚCLEO

Nas espermátides iniciais, o início do desenvolvimento flagelar pode ser:

(0) medial ao núcleo

Cetopsis coecutiens, *Loricariichthys platymetopon*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*.

(1) lateral ao núcleo

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*.

2. MOVIMENTO DO COMPLEXO CENTRIOLAR

Ao longo da espermiogênese, o complexo centriolar, formado pelos centríolos proximal e distal, pode se movimentar ou não em direção ao núcleo. Esse movimento pode estar:

(0) ausente

Cetopsis coecutiens, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*.

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

3. FORMAÇÃO DO CANAL CITOPASMÁTICO

O canal citoplasmático corresponde ao espaço existente entre a membrana plasmática da região basal da peça intermediária e a membrana flagelar. A formação desta estrutura pode estar:

(0) ausente

Pimelodus maculatus, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*.

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*.

4. FORMAÇÃO DO CANAL CITOPLASMÁTICO POR MOVIMENTO DO COMPLEXO CENTRIOLAR

Neste tipo de formação, o complexo centriolar migra em direção núcleo trazendo consigo a membrana plasmática e o segmento inicial do flagelo, em razão do centríolo distal estar ancorado na membrana, resultando na formação do canal citoplasmático. Este tipo de formação pode estar:

(0) ausente

Cetopsis coecutiens, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*.

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

5. FORMAÇÃO DO CANAL CITOPLASMÁTICO POR PROJEÇÃO DA PEÇA INTERMEDIÁRIA EM DIREÇÃO À REGIÃO INICIAL DO FLAGELO E POR INTERCONEXÃO DE VESÍCULAS

Neste tipo de formação, o complexo centriolar não migra, permanecendo preso à membrana plasmática. O canal citoplasmático formar-se, então, pela migração da massa citoplasmática da espermátide tardia em direção ao flagelo, além da interconexão de vesículas, nesta mesma região. Este tipo de formação pode estar:

(0) ausente

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

(1) presente

Cetopsis coecutiens, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*.

6. PERMANÊNCIA DO CANAL CITOPLASMÁTICO

O canal citoplasmático formado durante a espermiogênese pode ou não estar presente no espermatozóide.

(0) não

Diplomystes mesembrinus.

(1) sim

Cetopsis coecutiens, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*.

7. ROTAÇÃO NUCLEAR

Durante a espermiogênese o núcleo da espermatíde pode sofrer ou não uma rotação em relação ao flagelo e em decorrência disso, estabelecer a posição do flagelo. Esta rotação pode estar:

(0) ausente

Cetopsis coecutiens, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*.

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

8. ROTAÇÃO NUCLEAR EM RELAÇÃO AO FLAGELO LATERAL

(0) total

Diplomystes mesembrinus, *T. areolatus*.

(1) parcial

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

9. PROCESSO DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA

(0) heterogêneo

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*.

(1) homogêneo

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*.

10. FORMAÇÃO DA FOSSA NUCLEAR

A fossa nuclear é uma depressão encontrada no contorno nuclear voltado para a peça intermediária, a qual pode apresentar uma profundidade variável.

(0) ausente

Loricariichthys platymetopon, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*.

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*.

11. FORMATO DO NÚCLEO

(0) esférico

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*.

(1) semi-esférico

Liobagrus mediadiposalis.

(2) semi-ovóide

Cetopsis coecutiens, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*.

(3) cônico

Rhamdia quelen, *Trachelyopterus lucenai*, *Citharinus sp.*.

(4) ovóide com o eixo maior no sentido vertical

Pimelodus maculatus, *Pseudoplatystoma fasciatum*.

(5) ovóide com o eixo maior no sentido horizontal

Nematogenys inermis, *T. reinhardti*.

12. COMPRIMENTO DO NÚCLEO

O comprimento foi determinado, em secções longitudinais do núcleo, a partir da base (local onde se encontra a fossa nuclear) até o seu ápice. A partir da figura 20 foram estabelecidos os intervalos de valores dos comprimentos nucleares correspondentes aos diferentes estados deste caráter. A tabela I mostra os valores absolutos dos comprimentos dos núcleos de cada uma das espécies analisadas. O comprimento do núcleo pode ser:

(0) $\leq 2,0 \mu\text{m}$: curto

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*.

(1) $2,0 \mu\text{m} < X \leq 3,0 \mu\text{m}$: médio

Rhamdia quelen, *Citharinus sp.*.

(2) > 3,0 µm: longo

Trachelyopterus lucenai.

13. LARGURA DO NÚCLEO

A largura foi determinada, em secções longitudinais do núcleo, no sentido oposto ao eixo do comprimento do núcleo. A partir da figura 20 foram estabelecidos os intervalos de valores das larguras nucleares correspondentes aos diferentes estados deste carácter. A tabela I mostra os valores absolutos das larguras dos núcleos de cada uma das espécies analisadas.

A largura do núcleo pode ser:

(0) $\leq 1,0$ µm: estreita

Trachelyopterus lucenai.

(1) $1,0 \mu\text{m} < X \leq 2,5 \mu\text{m}$: média

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(2) > 2,5 µm: larga

Nematogenys inermis.

14. PADRÃO DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA

(0) heterogêneo

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *T. reinhardti*, *Clarias gariepinus*, *Citharinus sp.*.

(1) homogêneo

Liobagrus mediadiposalis, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*.

15. ARRANJO DA CROMATINA CONDENSADA HETEROGENEAMENTE

(0) em grumos justapostos

Diplomystes mesembrinus, *Clarias gariepinus*, *Citharinus* sp..

(1) em filamentos finos justapostos com áreas elétron-lúcidas

Cetopsis coecutiens, *T. reinhardti*.

16. ARRANJO DA CROMATINA CONDENSADA HOMOGENEAMENTE

(0) com áreas eletron-lúcidas

Liobagrus mediadiposalis, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Ictalurus punctatus*.

(1) sem áreas eletron-lúcidas

Silurus asotus, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Leiocassis ussuriensis*.

17. DISTRIBUIÇÃO DAS ÁREAS ELETRON-LÚCIDAS NA CROMATINA CONDENSADA HOMOGENEAMENTE

(0) dispersa no núcleo

Liobagrus mediadiposalis, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Pseudobagrus fulvidraco*.

(1) dispersa e na lateral do núcleo

Nematogenys inermis.

(2) dispersa e no ápice do núcleo

Ictalurus punctatus.

18. FAIXA CITOPLASMÁTICA AO REDOR DO NÚCLEO

(0) estreita

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus* sp..

(1) ampla

Trichomycterus aff. *iheringi*.

(2) ampla no ápice do núcleo e estreita na lateral

T. sp. (Jacutinga).

(3) estreita no ápice do núcleo e ampla na lateral

Ictalurus punctatus.

19. POSIÇÃO NUCLEAR EM RELAÇÃO AO FLAGELO

(0) anterior

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *T. areolatus*, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) lateral

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

20. POSIÇÃO DO FLAGELO EM RELAÇÃO AO NÚCLEO ANTERIOR

(0) medial

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) excêntrico

T. areolatus, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Trachelyopterus lucenai*.

21. FOSSA NUCLEAR

(0) ausente

Nematogenys inermis, *Loricariichthys platymetopon*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Rhamdia quelen*.

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Iheringichthys labrosus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

22. FORMATO DA FOSSA NUCLEAR

(0) arco único

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Clarias gariepinus*, *Iheringichthys labrosus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus sp.*.

(1) arco único ramificado

Silurus microdorsalis, *Silurus asotus*.

(2) arco duplo

Liobagrus mediadiposalis, *Ictalurus punctatus*.

23. POSIÇÃO DA FOSSA NUCLEAR EM RELAÇÃO AO NÚCLEO

(0) medial

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Iheringichthys labrosus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) excêntrica

T. areolatus, *Corydoras flaveolus*, *Trachelyopterus lucenai*.

(2) lateral

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

24. PROFUNDIDADE DA FOSSA NUCLEAR

A profundidade foi determinada, em secções longitudinais da fossa nuclear, no sentido do comprimento do núcleo. A partir da figura 21 foram estabelecidos os intervalos de valores das profundidades das fossas nucleares correspondentes aos diferentes estados

deste caráter. A tabela II mostra os valores absolutos das profundidades das fossas nucleares de cada uma das espécies analisadas. A profundidade da fossa nuclear pode ser:

(0) $\leq 0,25 \mu\text{m}$: muito rasa

Corydoras flaveolus, *Iheringichthys labrosus*, *Citharinus* sp..

(1) $0,25 \mu\text{m} < X \leq 0,5 \mu\text{m}$: rasa

Liobagrus mediadiposalis, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Trachelyopterus lucenai*, *Ictalurus punctatus*.

(2) $0,5 \mu\text{m} < X \leq 0,75 \mu\text{m}$: moderada

Cetopsis coecutiens, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *Clarias gariepinus*, *Silurus asotus*.

(3) $> 0,75 \mu\text{m}$: profunda

Diplomystes mesembrinus, *Silurus microdorsalis*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

25. LARGURA DA FOSSA NUCLEAR

A largura foi determinada, em secções longitudinais da fossa nuclear, no sentido oposto ao comprimento do núcleo. A partir da figura 21 foram estabelecidos os intervalos de valores das larguras das fossas nucleares correspondentes aos diferentes estados deste caráter. A tabela II mostra os valores absolutos das larguras das fossas nucleares de cada uma das espécies analisadas. A largura da fossa nuclear pode ser:

(0) $\leq 0,3 \mu\text{m}$: estreita

Diplomystes mesembrinus, *T. reinhardti*, *Clarias gariepinus*, *Iheringichthys labrosus*, *Trachelyopterus lucenai*.

(1) $0,3 \mu\text{m} < X \leq 0,6 \mu\text{m}$: média

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus* sp..

(2) $> 0,6 \mu\text{m}$: larga

T. areolatus, *Ictalurus punctatus*.

26. POSIÇÃO DO COMPLEXO CENTRIOLAR (CC) EM RELAÇÃO À FOSSA NUCLEAR

(0) CC totalmente inserido na fossa nuclear

Diplomystes mesembrinus, *T. areolatus*, *Clarias gariepinus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

(1) centríolo proximal inserido e centríolo distal parcialmente inserido na fossa nuclear
Silurus microdorsalis, *Silurus asotus*, *Trachelyopterus lucenai*.

(2) somente o centríolo proximal inserido na fossa nuclear

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

(3) CC totalmente fora da fossa nuclear

Corydoras flaveolus, *Iheringichthys labrosus*.

(4) somente o centríolo distal parcialmente inserido na fossa nuclear

Citharinus sp..

(5) centríolos ou corpúsculos basais parcialmente inseridos na fossa nuclear

Ictalurus punctatus.

(6) centríolos ou corpúsculos basais totalmente inseridos na fossa nuclear

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*.

27. POSIÇÃO DO COMPLEXO CENTRIOLAR NA AUSÊNCIA DA FOSSA NUCLEAR

(0) distante do núcleo

Nematogenys inermis.

(1) próximo do núcleo

Loricariichthys platymetopon, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Rhamdia quelen*.

28. ARRANJO DOS CENTRÍOLOS UM EM RELAÇÃO AO OUTRO

(0) centríolo proximal (CP) lateral ao centríolo distal (CD)
Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Rhamdia quelen*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) CP anterior ao CD

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

29. ARRANJO DOS CENTRÍOLOS UM EM RELAÇÃO AO OUTRO: CP anterior ao CD

(0) perpendicular

Diplomystes mesembrinus, *Silurus microdorsalis*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Trachelyopterus lucenai*.

(1) lateral em ângulo reto

Loricariichthys platymetopon.

(2) obtuso

Trichomycterus aff. *iheringi*, *Clarias gariepinus*, *Silurus asotus*.

(3) coaxial

Corydoras flaveolus, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

30. ARRANJO DOS CENTRÍOLOS UM EM RELAÇÃO AO OUTRO: CP lateral ao CD

(0) paralelo

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) ângulo reto

T. reinhardti, *Rhamdia quelen*.

(2) obtuso

T. areolatus, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

31. COMPRIMENTO DA PEÇA INTERMEDIÁRIA

O comprimento foi determinado, em secções longitudinais da peça intermediária, a partir da base do núcleo até a extremidade final da peça intermediária. Com base na figura

22 foram estabelecidos os intervalos de valores dos comprimentos das peças intermediárias correspondentes aos diferentes estados deste caráter. A tabela III mostra os valores absolutos dos comprimentos das peças intermediárias de cada uma das espécies analisadas.

O comprimento da peça intermediária pode ser:

(0) $\leq 1,0 \mu\text{m}$: curto

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Clarias gariepinus*, *Silurus asotus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Leiocassis ussuriensis*.

(1) $1,0 \mu\text{m} < X \leq 1,7 \mu\text{m}$: médio

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Pimelodus maculatus*, *Rhamdia quelen*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(2) $> 1,7 \mu\text{m}$: longo

Nematogenys inermis, *Trachelyopterus lucenai*.

32. LARGURA DA PEÇA INTERMEDIÁRIA

A largura foi determinada, em secções longitudinais da peça intermediária, no sentido oposto ao comprimento da peça intermediária. Com base na figura 22 foram estabelecidos os intervalos de valores das larguras das peças intermediárias correspondentes aos diferentes estados deste caráter. A tabela III mostra os valores absolutos das larguras das peças intermediárias de cada uma das espécies analisadas. A largura da peça intermediária pode ser:

(0) $\leq 0,7 \mu\text{m}$: estreita

Trachelyopterus lucenai.

(1) $0,7 \mu\text{m} < X \leq 2,3 \mu\text{m}$: média

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus sp.*.

(2) $> 2,3 \mu\text{m}$: larga

Nematogenys inermis, *Ictalurus punctatus*.

33. SIMETRIA DA PEÇA INTERMEDIÁRIA EM RELAÇÃO AO FLAGELO

(0) simétrica

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus* sp..

(1) assimétrica

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Trachelyopterus lucenai*.

34. LOCALIZAÇÃO DA PEÇA INTERMEDIÁRIA EM RELAÇÃO AO NÚCLEO

(0) basal

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus* sp..

(1) basolateral

T. reinhardti, *Ictalurus punctatus*.

35. CANAL CITOPLASMÁTICO

(0) ausente

Diplomystes mesembrinus, *Clarias gariepinus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*.

(1) presente

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus* sp..

36. NÚMERO DE CANAIS CITOPLASMÁTICOS

(0) um

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus sp.*.

(1) dois

Liobagrus mediadiposalis, *Ictalurus punctatus*.

37. COMPRIMENTO DO CANAL CITOPLASMÁTICO

O comprimento foi determinado, em secções longitudinais do canal citoplasmático, a partir do início do flagelo até a extremidade final da peça intermediária. Com base na figura 23 foram estabelecidos os intervalos de valores dos comprimentos dos canais citoplasmáticos correspondentes aos diferentes estados deste carácter. A tabela IV mostra os valores absolutos dos comprimentos dos canais citoplasmáticos de cada uma das espécies analisadas. O comprimento do canal citoplasmático pode ser:

(0) $\leq 0,70 \mu\text{m}$: curto

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus asotus*.

(1) $0,7 \mu\text{m} < X \leq 1,5 \mu\text{m}$: médio

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Silurus microdorsalis*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(2) $> 1,5 \mu\text{m}$: longo

Trachelyopterus lucenai.

38. LARGURA DO CANAL CITOPLASMÁTICO

A largura foi determinada, em secções longitudinais do canal citoplasmático, no sentido oposto ao comprimento do canal citoplasmático. Com base na figura 23 foram estabelecidos os intervalos de valores das larguras dos canais citoplasmáticos correspondentes aos diferentes estados deste carácter. A tabela IV mostra os valores absolutos das larguras dos canais citoplasmáticos de cada uma das espécies analisadas. A largura do canal citoplasmático pode ser:

(0) $\leq 0,32 \mu\text{m}$: estreita

Liobagrus mediadiposalis, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *Trachelyopterus lucenai*.

(1) $0,32 \mu\text{m} < X \leq 0,6 \mu\text{m}$: média

Cetopsis coecutiens, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(2) $> 0,6 \mu\text{m}$: larga

Nematogenys inermis.

39. LOCALIZAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS

(0) somente na peça intermediária

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) na peça intermediária e ao redor do núcleo

Trichomycterus aff. *iheringi*.

40. POSIÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

(0) região apical

Pimelodus maculatus, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Citharinus sp.*.

(1) regiões apical e medial

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Nematogenys inermis*, *Silurus asotus*, *Rhamdia quelen*.

(2) regiões apical, medial e basal

Liobagrus mediadiposalis, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Iheringichthys labrosus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*.

41. DISTRIBUIÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

(0) por toda a peça intermediária

Diplomystes mesembrinus, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Rhamdia quelen*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus* sp..

(1) aleatória

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Trachelyopterus lucenai*, *Ictalurus punctatus*.

(2) periférica

Cetopsis coecutiens, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*.

42. QUANTIDADE DE MITOCÔNDRIAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

A tabela V mostra a quantidade de mitocôndrias presentes na peça intermediária de cada uma das espécies analisadas.

(0) única

Diplomystes mesembrinus.

(1) poucas

Cetopsis coecutiens, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Clarias gariepinus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus* sp..

(2) moderada

Liobagrus mediadiposalis, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

(3) muitas

Loricariichthys platymetopon.

(4) muitíssimas

Nematogenys inermis, *Corydoras flaveolus*.

43. FORMATO DA MITOCÔNDRIA

(0) arredondada

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Silurus microdorsalis*, *Pseudobagrus fulvidraco*.

(1) alongada

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Loricariichthys platymetopon*, *Sorubim lima*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(2) em forma de C

Diplomystes mesembrinus.

(3) alongada e ramificada

Nematogenys inermis, *Corydoras flaveolus*.

(4) irregular

T. reinhardti, *Clarias gariepinus*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Iheringichthys labrosus*.

44. MITOCÔNDRIAS SEPARADAS DO SEGMENTO INICIAL DO FLAGELO SOMENTE PELO CANAL CITOPLASMÁTICO

(0) não

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Corydoras flaveolus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) sim

Liobagrus mediadiposalis, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Loricariichthys platymetopon*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

45. MITOCÔNDRIAS SEPARADAS DO SEGMENTO INICIAL DO FLAGELO PELAS VESÍCULAS E PELO CANAL CITOPLASMÁTICO

(0) sim

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Corydoras flaveolus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

(1) não

Liobagrus mediadiposalis, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Loricariichthys platymetopon*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

46. VESÍCULAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

(0) ausente

Diplomystes mesembrinus, *Liobagrus mediadiposalis*, *T. reinhardti*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

(1) presente

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*.

47. POSIÇÃO DAS VESÍCULAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

(0) região basal

Nematogenys inermis, *Corydoras flaveolus*.

(1) regiões medial e basal

Loricariichthys platymetopon, *Silurus asotus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Rhamdia quelen*, *Citharinus sp.*.

(2) regiões apical, medial e basal

Cetopsis coecutiens, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Pimelodus maculatus*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Ictalurus punctatus*.

48. DISTRIBUIÇÃO DAS VESÍCULAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

(0) por toda a peça intermediária

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Citharinus sp.*.

(1) aleatória

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Loricariichthys platymetopon*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Ictalurus punctatus*.

(2) periférica

Corydoras flaveolus, *Clarias gariepinus*, *Rhamdia quelen*.

49. QUANTIDADE DE VESÍCULAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

A tabela V mostra a quantidade de vesículas presentes na peça intermediária de cada uma das espécies analisadas.

(0) poucas

T. areolatus, *Corydoras flaveolus*, *Clarias gariepinus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*.

(1) moderada

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Loricariichthys platymetopon*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Sorubim lima*, *Ictalurus punctatus*.

(2) muitas

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Citharinus sp.*.

50. ORGANIZAÇÃO DAS VESÍCULAS NA PEÇA INTERMEDIÁRIA

(0) não conectadas

T. areolatus, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Citharinus sp.*.

(1) não conectadas e conectadas

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Silurus microdorsalis*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Ictalurus punctatus*.

(2) conectadas

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Silurus asotus*, *Rhamdia quelen*.

51. MODO DE CONEXÃO DAS VESÍCULAS

(0) somente umas com as outras

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Silurus asotus*, *Rhamdia quelen*.

(1) umas com as outras e com a membrana plasmática

Silurus microdorsalis, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Ictalurus punctatus*.

52. NÚMERO DE FLAGELOS

(0) um

Diplomystes mesembrinus, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Citharinus sp.*

(1) dois

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Ictalurus punctatus*, *Nematogenys inermis*.

53. NÚMERO DE AXONEMAS POR FLAGELO

(0) um

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus sp.*

(1) um no segmento inicial da cauda e dois no segmento final

Nematogenys inermis.

54. SEPARAÇÃO DOS AXONEMAS NOS ESPERMATOZÓIDES BIFLAGELADOS

(0) totalmente separados por membranas individuais

Cetopsis coecutiens, *Liobagrus mediadiposalis*, *Ictalurus punctatus*.

(1) separados por membranas individuais somente no segmento inicial do flagelo

Nematogenys inermis.

55. COMPARTIMENTO MEMBRANOSO NO FLAGELO

O compartimento membranoso presente no flagelo consiste de vesículas alongadas, entremeadas por uma estreita faixa citoplasmática. Esta estrutura pode estar:

(0) ausente

Diplomystes mesembrinus, *Cetopsis coecutiens*, *Liobagrus mediadiposalis*, *Nematogenys inermis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus* sp..

(1) presente

T. sp. (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Corydoras flaveolus*.

56. PROJEÇÕES LATERAIS NO FLAGELO

As projeções laterais correspondem a expansões da membrana flagelar.

(0) ausente

Cetopsis coecutiens, *Nematogenys inermis*, *Corydoras flaveolus*, *Loricariichthys platymetopon*, *Clarias gariepinus*, *Silurus microdorsalis*, *Silurus asotus*, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim lima*, *Iheringichthys labrosus*, *Rhamdia quelen*, *Trachelyopterus lucenai*, *Ictalurus punctatus*, *Citharinus* sp...

(1) presente

Diplomystes mesembrinus, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

57. NÚMERO DE PROJEÇÕES LATERAIS NO FLAGELO

(0) duas

Diplomystes mesembrinus, *Liobagrus mediadiposalis*, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Leiocassis ussuriensis*.

(1) variável

Trichomycterus aff. *iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari).

58. COMPRIMENTO DAS PROJEÇÕES LATERAIS

O comprimento foi determinado em seções transversais do flagelo. A partir da figura 24 foram estabelecidos os intervalos de valores dos comprimentos das projeções laterais correspondentes aos diferentes estados deste caráter. A tabela VI mostra os valores

absolutos dos comprimentos das projeções laterais de cada uma das espécies analisadas. O comprimento das projeções laterais pode ser:

(0) $\leq 0,2 \mu\text{m}$: curto

Diplomystes mesembrinus, *Liobagrus mediadiposalis*, *Trichomycterus* aff. *iheringi*.

(1) $0,2 \mu\text{m} < X \leq 0,4 \mu\text{m}$: médio

T. areolatus, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *Pseudobagrus fulvidraco*.

(2) $> 0,4 \mu\text{m}$: longo

Leiocassis ussuriensis.

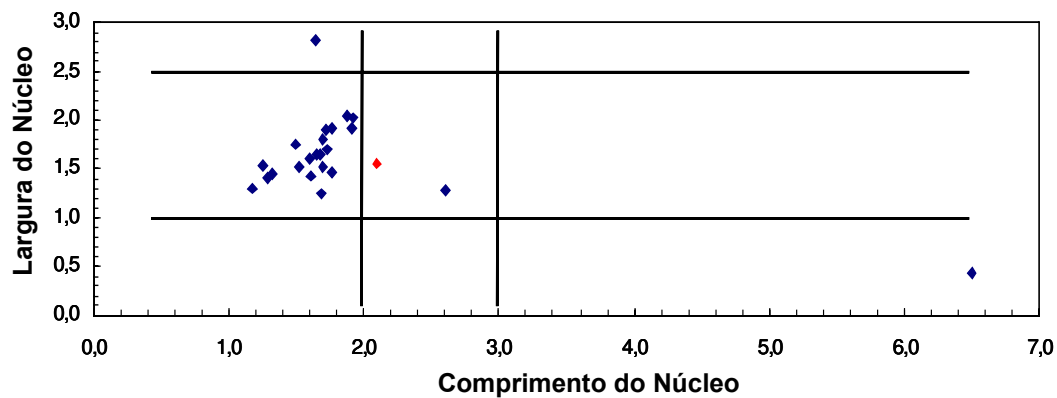


Figura 20. Relação entre os caracteres quantitativos: comprimento e largura do núcleo. As barras pretas, verticais para o comprimento e horizontais para a largura, indicam os intervalos de valores, em micrômetros, para cada estado destes caracteres. Os losangos azuis indicam as espécies da ordem Siluriformes e o vermelho da ordem Characiformes.

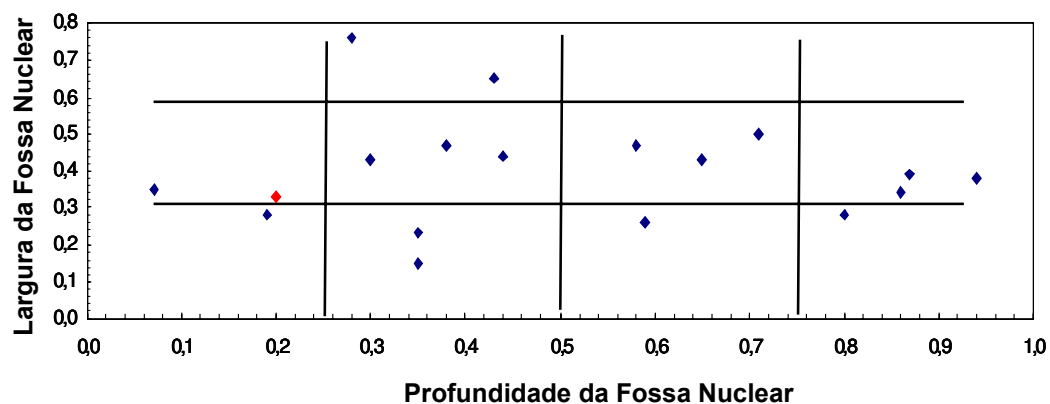


Figura 21. Relação entre os caracteres quantitativos: profundidade e largura da fossa nuclear. As barras pretas, verticais para a profundidade e horizontais para a largura, indicam os intervalos de valores, em micrômetros, para cada estado destes caracteres. Os losangos azuis indicam as espécies da ordem Siluriformes e o vermelho da ordem Characiformes.

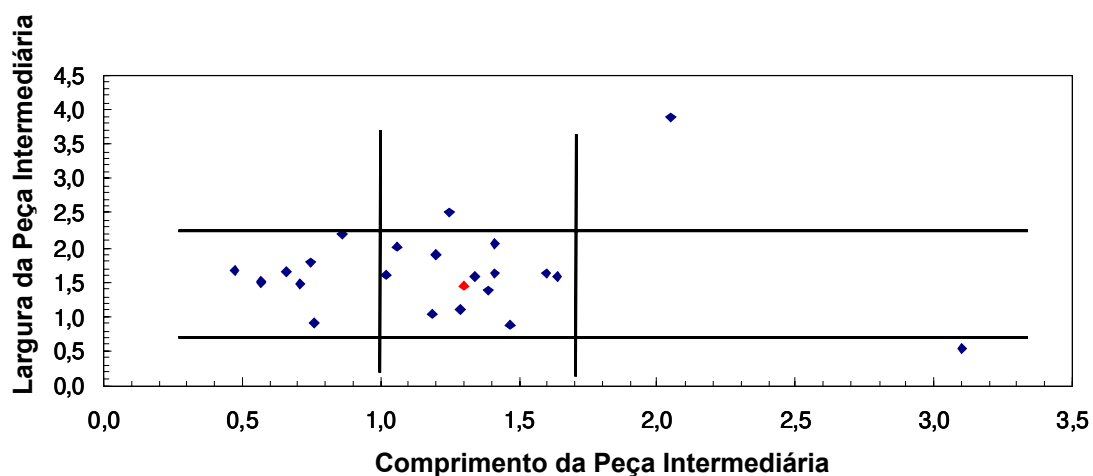


Figura 22. Relação entre os caracteres quantitativos: comprimento e largura da peça intermediária. As barras pretas, verticais para o comprimento e horizontais para a largura, indicam os intervalos de valores, em micrômetros, para cada estado destes caracteres. Os losangos azuis indicam as espécies da ordem Siluriformes e o vermelho da ordem Characiformes.

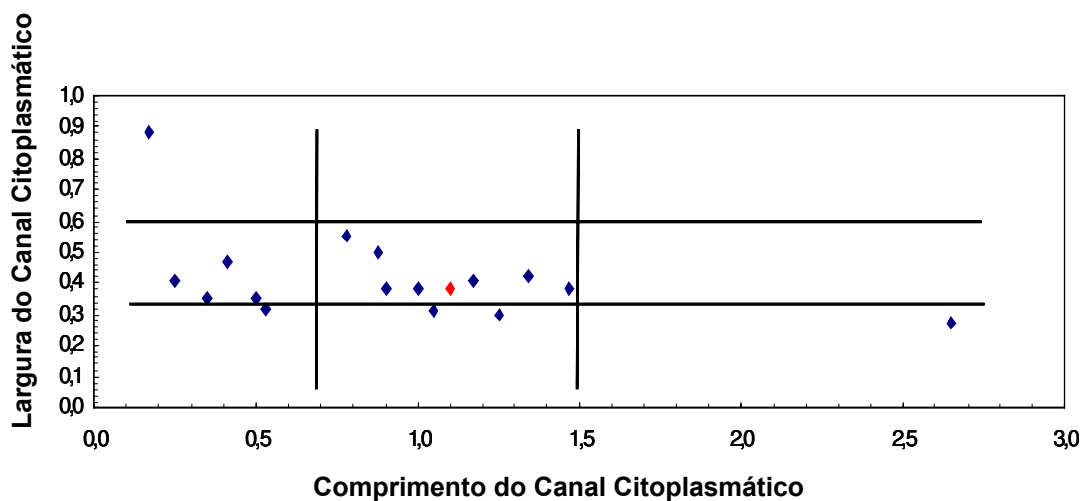


Figura 23. Relação entre os caracteres quantitativos: comprimento e largura do canal citoplasmático. As barras pretas, verticais para o comprimento e horizontais para a largura, indicam os intervalos de valores, em micrômetros, para cada estado destes caracteres. Os losangos azuis indicam as espécies da ordem Siluriformes e o vermelho da ordem Characiformes.

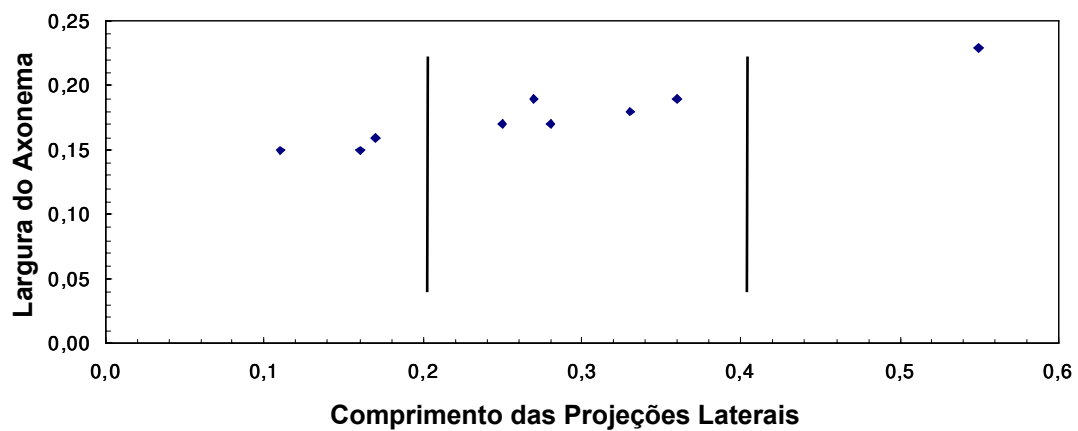


Figura 24. Relação entre os caracteres quantitativos: comprimento das projeções laterais e largura do axonema. As barras pretas indicam os intervalos de valores, em micrômetros, para cada estado do caráter comprimento das projeções laterais. Os losangos azuis indicam as espécies da ordem Siluriformes.

Tabela I. Medidas, em valores absolutos, referentes ao comprimento e à largura do núcleo dos espermatozoides das diferentes espécies de Siluriformes e de uma espécie da ordem Characiformes (sublinhado). Média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo das medidas referentes aos espermatozoides da ordem Siluriformes também são apresentados. Unidade de medida: micrômetro (μm).

Famílias/Espécies	Comprimento do Núcleo	Largura do Núcleo
Diplomystidae		
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	1,32 (n = 2*)	1,45 (n = 2)
Cetopsidae		
<i>Cetopsis coecutiens</i>	1,29 (n = 15)	1,41 (n = 15)
Amblycipitidae		
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	1,50 (n = 3)	1,75 (n = 3)
Nematogenyidae		
<i>Nematogenys inermis</i>	1,64 (n = 6)	2,82 (n = 6)
Trichomycteridae		
<i>Trichomycterus aff. iheringi</i>	1,52 (n = 15)	1,52 (n = 15)
<i>Trichomycterus areolatus</i>	1,65 (n = 12)	1,64 (n = 12)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	1,73 (n = 12)	1,70 (n = 12)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	1,67 (n = 7)	1,64 (n = 7)
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	1,76 (n = 15)	1,46 (n = 15)
Callichthyidae		
<i>Corydoras flaveolus</i>	1,88 (n = 16)	2,05 (n = 16)
Loricariidae		
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	1,92 (n = 15)	2,02 (n = 15)
Clariidae		
<i>Clarias gariepinus</i>	1,18 (n = 1)	1,30 (n = 2)
Siluridae		
<i>Silurus microdorsalis</i>	1,72 (n = 4)	1,89 (n = 5)
<i>Silurus asotus</i>	1,60 (n = 1)	1,60 (n = 1)
Ictaluridae		
<i>Ictalurus punctatus</i>	1,25 (n = 1)	1,53 (n = 1)
Heptapteridae		
<i>Rhamdia quelen</i>	2,61 (n = 6)	1,28 (n = 6)
Auchenipteridae		
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	6,50 (n = 1)	0,44 (n = 2)
Pimelodidae		
<i>Pimelodus maculatus</i>	1,70 (n = 1)	1,52 (n = 1)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	1,69 (n = 2)	1,25 (n = 2)
<i>Sorubim lima</i>	1,61 (n = 3)	1,42 (n = 3)
<i>Iheringichthys labrosus</i>	1,91 (n = 3)	1,91 (n = 3)
Bagridae		
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	1,76 (n = 3)	1,91 (n = 3)
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	1,70 (n = 2)	1,81 (n = 2)
Citharinidae		
<u><i>Citharinus</i> sp.</u>	2,10 (n = 1)	1,55 (n = 1)
Média	1,87	1,62
Desvio Padrão	1,05	0,43
Valor Máximo	6,50	2,82
Valor Mínimo	1,18	0,44

*: indica o número de estruturas medidas.

Tabela II. Medidas, em valores absolutos, referentes à profundidade e à largura da fossa nuclear presente nos núcleos dos espermatozoides das diferentes espécies de Siluriformes e de uma espécie da ordem Characiformes (sublinhado). Média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo das medidas referentes aos espermatozoides da ordem Siluriformes também são apresentados. Unidade de medida: micrômetro (μm).

Famílias/Espécies	Profundidade da Fossa Nuclear	Largura da Fossa Nuclear
Diplomystidae		
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	0,80 (n = 1*)	0,28 (n = 1)
Cetopsidae		
<i>Cetopsis coecutiens</i>	0,58 (n = 15)	0,47 (n = 15)
Amblycipitidae		
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	0,44 (n = 4)	0,44 (n = 4)
Nematogenyidae		
<i>Nematogenys inermis</i>	Ausente	Ausente
Trichomycteridae		
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	0,65 (n = 15)	0,43 (n = 15)
<i>Trichomycterus areolatus</i>	0,43 (n = 12)	0,65 (n = 12)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	0,38 (n = 12)	0,47 (n = 12)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	0,30 (n = 7)	0,43 (n = 7)
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	0,35 (n = 6)	0,23 (n = 6)
Callichthyidae		
<i>Corydoras flaveolus</i>	0,07 (n = 10)	0,35 (n = 10)
Loricariidae		
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Ausente	Ausente
Clariidae		
<i>Clarias gariepinus</i>	0,59 (n = 1)	0,26 (n = 2)
Siluridae		
<i>Silurus microdorsalis</i>	0,86 (n = 5)	0,34 (n = 5)
<i>Silurus asotus</i>	0,71 (n = 1)	0,50 (n = 1)
Ictaluridae		
<i>Ictalurus punctatus</i>	0,28 (n = 1)	0,76 (n = 1)
Heptapteridae		
<i>Rhamdia quelen</i>	Ausente	Ausente
Auchenipteridae		
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	0,35 (n = 1)	0,15 (n = 2)
Pimelodidae		
<i>Pimelodus maculatus</i>	Ausente	Ausente
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Ausente	Ausente
<i>Sorubim lima</i>	Ausente	Ausente
<i>Iheringichthys labrosus</i>	0,19 (n = 1)	0,28 (n = 1)
Bagridae		
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	0,94 (n = 3)	0,38 (n = 3)
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	0,87 (n = 2)	0,39 (n = 2)
Citharinidae		
<i>Citharinus</i> sp.	0,20 (n = 1)	0,33 (n = 1)
Média	0,52	0,41
Desvio Padrão	0,26	0,15
Valor Máximo	0,94	0,76
Valor Mínimo	0,07	0,15

*: indica o número de estruturas medidas.

Tabela III. Medidas, em valores absolutos, referentes ao comprimento e à largura da peça intermediária dos espermatozóides das diferentes espécies de Siluriformes e de uma espécie da ordem Characiformes (sublinhado). Média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo das medidas referentes aos espermatozóides da ordem Siluriformes também são apresentados. Unidade de medida: micrômetro (μm).

Famílias/Espécies	Comprimento da Peça Intermediária	Largura da Peça Intermediária
Diplomystidae		
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	1,19 (n = 1*)	1,05 (n = 1)
Cetopsidae		
<i>Cetopsis coecutiens</i>	0,47 (n = 15)	1,67 (n = 15)
Amblycipitidae		
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	0,57 (n = 5)	1,50 (n = 5)
Nematogenyidae		
<i>Nematogenys inermis</i>	2,05 (n = 5)	3,90 (n = 5)
Trichomycteridae		
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	1,41 (n = 12)	1,62 (n = 12)
<i>Trichomycterus areolatus</i>	1,64 (n = 10)	1,58 (n = 10)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	1,60 (n = 7)	1,63 (n = 7)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	1,34 (n = 9)	1,59 (n = 9)
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	1,47 (n = 7)	0,88 (n = 7)
Callichthyidae		
<i>Corydoras flaveolus</i>	1,41 (n = 16)	2,05 (n = 16)
Loricariidae		
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	1,06 (n = 13)	2,02 (n = 13)
Clariidae		
<i>Clarias gariepinus</i>	0,76 (n = 3)	0,90 (n = 3)
Siluridae		
<i>Silurus microdorsalis</i>	1,20 (n = 3)	1,89 (n = 3)
<i>Silurus asotus</i>	0,66 (n = 1)	1,66 (n = 1)
Ictaluridae		
<i>Ictalurus punctatus</i>	1,25 (n = 1)	2,50 (n = 1)
Heptapteridae		
<i>Rhamdia quelen</i>	1,29 (n = 4)	1,11 (n = 4)
Auchenipteridae		
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	3,10 (n = 2)	0,55 (n = 2)
Pimelodidae		
<i>Pimelodus maculatus</i>	1,39 (n = 2)	1,39 (n = 2)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0,75 (n = 1)	1,78 (n = 1)
<i>Sorubim lima</i>	0,71 (n = 3)	1,47 (n = 3)
<i>Iheringichthys labrosus</i>	0,86 (n = 1)	2,19 (n = 1)
Bagridae		
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	1,02 (n = 2)	1,61 (n = 2)
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	0,57 (n = 2)	1,51 (n = 2)
Citharinidae		
<u><i>Citharinus</i> sp.</u>	1,30 (n = 2)	1,45 (n = 2)
Média	1,21	1,65
Desvio Padrão	0,58	0,66
Valor Máximo	3,10	3,90
Valor Mínimo	0,47	0,55

*: indica o número de estruturas medidas.

Tabela IV. Medidas, em valores absolutos, referentes ao comprimento e à largura do canal citoplasmático dos espermatozoides das diferentes espécies de Siluriformes e de uma espécie da ordem Characiformes (sublinhado). Média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo das medidas referentes aos espermatozoides da ordem Siluriformes também são apresentados. Unidade de medida: micrômetro (μm).

Famílias/Espécies	Comprimento do Canal Citoplasmático	Largura do Canal Citoplasmático
Diplomystidae		
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	Ausente	Ausente
Cetopsidae		
<i>Cetopsis coecutiens</i>	0,41 (n = 15*)	0,47 (n = 15)
Amblycipitidae		
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	0,53 (n = 5)	0,32 (n = 5)
Nematogenyidae		
<i>Nematogenys inermis</i>	0,17 (n = 5)	0,88 (n = 5)
Trichomycteridae		
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	1,34 (n = 12)	0,42 (n = 12)
<i>Trichomycterus areolatus</i>	1,25 (n = 10)	0,30 (n = 10)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	1,47 (n = 7)	0,38 (n = 7)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	1,17 (n = 8)	0,41 (n = 8)
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	1,05 (n = 7)	0,31 (n = 7)
Callichthyidae		
<i>Corydoras flaveolus</i>	0,35 (n = 16)	0,36 (n = 16)
Loricariidae		
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	0,25 (n = 13)	0,41 (n = 13)
Clariidae		
<i>Clarias gariepinus</i>	Ausente	Ausente
Siluridae		
<i>Silurus microdorsalis</i>	0,90 (n = 3)	0,38 (n = 3)
<i>Silurus asotus</i>	0,50 (n = 1)	0,35 (n = 1)
Ictaluridae		
<i>Ictalurus punctatus</i>	1,00 (n = 1)	0,38 (n = 1)
Heptapteridae		
<i>Rhamdia quelen</i>	Ausente	Ausente
Auchenipteridae		
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	2,65 (n = 2)	0,27 (n = 2)
Pimelodidae		
<i>Pimelodus maculatus</i>	Ausente	Ausente
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Ausente	Ausente
<i>Sorubim lima</i>	Ausente	Ausente
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Ausente	Ausente
Bagridae		
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	0,88 (n = 2)	0,50 (n = 2)
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	0,78 (n = 2)	0,55 (n = 2)
Citharinidae		
<u><i>Citharinus</i> sp.</u>	1,10 (n = 1)	0,41 (n = 1)
Média	0,92	0,42
Desvio Padrão	0,61	0,14
Valor Máximo	2,65	0,88
Valor Mínimo	0,17	0,27

*: indica o número de estruturas medidas.

Tabela V. Comparação entre os espermatozóides de diferentes espécies de Siluriformes e de uma espécie da ordem Characiformes (sublinhado) quanto à quantidade de mitocôndrias e de vesículas presentes na peça intermediária.

Famílias/Espécies	Quantidade de Mitocôndrias	Quantidade de Vesículas
Diplomystidae		
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	Única	Ausente
Cetopsidae		
<i>Cetopsis coecutiens</i>	Poucas	Muitas
Amblycipitidae		
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	Moderada	Ausente
Nematogenyidae		
<i>Nematogenys inermis</i>	Muitíssimas	Muitas
Trichomycteridae		
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	Poucas	Moderada
<i>Trichomycterus areolatus</i>	Poucas	Poucas
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	Poucas	Moderada
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	Poucas	Moderada
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	Poucas	Ausente
Callichthyidae		
<i>Corydoras flaveolus</i>	Muitíssimas	Poucas
Loricariidae		
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Muitas	Moderada
Clariidae		
<i>Clarias gariepinus</i>	Poucas	Poucas
Siluridae		
<i>Silurus microdorsalis</i>	Moderada	Moderada
<i>Silurus asotus</i>	Moderada	Moderada
Ictaluridae		
<i>Ictalurus punctatus</i>	Poucas	Moderada
Heptapteridae		
<i>Rhamdia quelen</i>	Poucas	Poucas
Auchenipteridae		
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	Moderada	Ausente
Pimelodidae		
<i>Pimelodus maculatus</i>	Poucas	Moderada
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Poucas	Poucas
<i>Sorubim lima</i>	Poucas	Moderada
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Poucas	Poucas
Bagridae		
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	Moderada	Ausente
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	Moderada	Ausente
Citharinidae		
<u><i>Citharinus</i> sp.</u>	Poucas	Muitas

Tabela VI. Medidas, em valores absolutos, referentes ao comprimento das projeções laterais presentes nos flagelos dos espermatozóides das diferentes espécies de Siluriformes. A espécie da ordem Characiformes está sublinhada. Média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo das medidas também são apresentados. Unidade de medida: micrômetro (μm).

Famílias/Espécies	Comprimento das Projeções Laterais
Diplomystidae	
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	0,11 (n = 3*)
Cetopsidae	
<i>Cetopsis coecutiens</i>	Ausente
Amblycipitidae	
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	0,16 (n = 2)
Nematogenyidae	
<i>Nematogenys inermis</i>	Ausente
Trichomycteridae	
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	0,17 (n = 20)
<i>Trichomycterus areolatus</i>	0,25 (n = 20)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	0,36 (n = 20)
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	0,33 (n = 20)
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	0,28 (n = 20)
Callichthyidae	
<i>Corydoras flaveolus</i>	Ausente
Loricariidae	
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	Ausente
Clariidae	
<i>Clarias gariepinus</i>	Ausente
Siluridae	
<i>Silurus microdorsalis</i>	Ausente
<i>Silurus asotus</i>	Ausente
Ictaluridae	
<i>Ictalurus punctatus</i>	Ausente
Heptapteridae	
<i>Rhamdia quelen</i>	Ausente
Auchenipteridae	
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	Ausente
Pimelodidae	
<i>Pimelodus maculatus</i>	Ausente
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Ausente
<i>Sorubim lima</i>	Ausente
<i>Iheringichthys labrosus</i>	Ausente
Bagridae	
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	0,27 (n = 2)
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	0,55 (n = 1)
Citharinidae	
<u><i>Citharinus</i> sp.</u>	Ausente
Média	0,28
Desvio Padrão	0,13
Valor Máximo	0,55
Valor Mínimo	0,11

Tabela VII. Matriz de dados, com 58 caracteres e 24 táxons, gerada a partir dos dados da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides, para as análises das relações filogenéticas dos Loricarioidea e destes com os outros Siluriformes. O último táxon corresponde ao representante da ordem Characiformes. A numeração dos caracteres segue aquela da lista de caracteres. Os símbolos “?” indicam os caracteres para os quais não se têm dados e os “-” indicam os caracteres não comparáveis.

ESPÉCIES	CARACTERES																																																											
	0									1									2									3									4									5														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8												
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	1	1	1	-	1	0	-	0	0	0	0	0	1	-	-	-	0	1	0	1	1	-	-	1	-	-	-	-	0	0	-	0	1	0	0			
<i>Cetopsis coecutiens</i>	1	1	0	1	1	1	1	-	0	0	2	1	0	0	1	-	-	0	0	0	0	0	2	0	2	-	0	-	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	-	-	
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	3	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	2	-	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	2	0	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	1	0	0
<i>Nematogenys inermis</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	4	1	1	1	-	0	1	0	0	0	0	1	-	-	-	-	0	0	-	0	2	1	0	0	0	0	1	2	0	1	0	3	3	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	-	-	
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>iheringi</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	-	0	0	1	1	-	0	0	1	2	0	3	-	1	1	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	-	0	1	1	0
<i>Trichomycterus areolatus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	1	0	0	2	3	2	1	-	0	-	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	1	1	0	1	1	1	0	-	0	0	-	0	1	0	1	
<i>Trichomycterus</i> sp. (Jacutinga)	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	-	0	0	2	1	-	0	0	1	3	0	3	-	0	-	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	-	1	1	1	1	
<i>Trichomycterus</i> sp. (Alambari)	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	-	0	0	0	1	-	0	0	1	3	0	3	-	0	-	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	-	1	1	1	1		
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	4	1	0	0	1	-	-	0	1	-	0	0	1	3	1	3	-	0	-	2	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	2	0	4	1	1	1	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0	1	0	1
<i>Corydoras flaveolus</i>	0	1	0	1	1	1	1	-	1	0	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	4	-	1	2	-	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	3	3	0	0	0	0	2	2	2	0	-	0	0	-	1	0	-	-
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	1	1	0	1	1	1	1	-	1	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	1	-	-	-	-	-	1	1	3	-	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	4	0	1	1	0	0	0	1	1	0	-	0	0	-	0	-	-	
<i>Clarias gariepinus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	2	1	1	-	1	1	-	1	0	0	0	1	-	-	-	0	2	0	0	4	-	-	0	1	2	2	0	-	0	0	-	0	0	-	-		
<i>Silurus microdorsalis</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	6	-	1	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	1	0	1	2	1	0	0	-	0	0	-	-	
<i>Silurus asotus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	0	1	-	1	-	0	0	0	0	2	0	2	0	6	-	1	1	-	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	-	0	0	-	-	
<i>Ictalurus punctatus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2	1	0	1	-	0	2	3	0	0	0	1	0	3	2	5	-	0	-	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	1	1	1	2	2	1	1	0	0	0	-	-	
<i>Pimelodus maculatus</i>	1	1	1	-	-	-	1	-	1	1	5	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-	1	1	0	-	0	0	0	0	1	-	-	-	0	0	1	0	4	-	-	0	1	0	1	2	1	0	0	-	0	0	-	-	
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	1	1	1	-	-	-	1	-	1	1	5	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-	1	1	0	-	1	0	0	0	1	-	-	-	0	0	1	0	4	-	-	0	0	0	2	2	1	0	0	-	0	0	-	-	
<i>Sorubim lima</i>	1	1	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-	1	1	0	-	1	0	0	0	1	-	-	-	0	0	1	0	0	-	-	0	1	1	1	2	1	0	0	-	0	0	-	-	
<i>Iheringichthys labrosus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	-	1	0	-	1	0	0	0	1	-	-	-	0	2	1	0	4	-	-	0	1	1	2	2	1	0	0	-	0	0	-	-		
<i>Trachelyopterus lucenai</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	2	2	1	-	1	-	0	0	1	0	0	2	3	1	6	-	1	0	-	2	2	1	0	0	0	2	1	0	2	2	2	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0	0	-	-
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-	1	2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0	1	0	1
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2	1	0	1	-	1	-	0	0	0	0	0	1	0	1	-	1	2	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0	1	0	2
<i>Rhamdia quelen</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	-	1	-	0	0	0	1	-	-	-	-	1	0	-	2	0	0	0	0	1	-	-	-	0	1	0	0	0	-	-	0	0	2	2	1	0	0	0	-	0	0	-	-		
<i>Citharinus</i> sp.	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-	-

4.2.2. Cladogramas

As análises filogenéticas realizadas resultaram em uma série de cladogramas que exprimem hipóteses de relacionamentos entre os membros constituintes de Loricarioidea analisados até o momento, bem como entre estes e os outros grupos de Siluriformes para os quais há dados na literatura.

As análises iniciais que resultaram nos cladogramas apresentados nas figuras de 25 a 28 foram conduzidas com os dados sobre a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides, de forma a testar as relações entre os Loricarioidea e os grupos considerados mais próximos a esta superfamília, com base na hipótese atual de Britto (2003). Já as topologias apresentadas nas figuras de 29 a 31 foram derivadas das análises com os dados sobre a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides dos membros de Loricarioidea analisados neste estudo e também com todos os dados disponíveis na literatura para as outras famílias de Siluriformes, tanto as mais quanto as menos relacionadas aos Loricarioidea.

A figura 32 mostra o cladograma derivado da análise combinada dos dados, enquanto que na figura 33 está apresentada a topologia que mostra o índice de decaimento que suporta cada ramo, tanto para os dados combinados quanto para apenas os caracteres osteológicos e de morfologia externa. Seguem, então, os cladogramas obtidos:

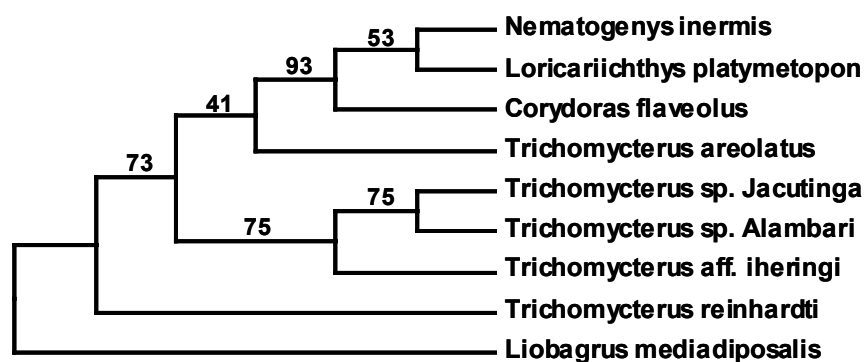


Figura 25. Árvore de consenso obtida entre 2.975 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 9 táxons e 58 caracteres de peso igual e não ordenados. Grupo externo utilizado: *Liobagrus mediadiposalis*. Número de passos = 109, índice de consistência = 0,8349 e índice de retenção = 0,7000. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

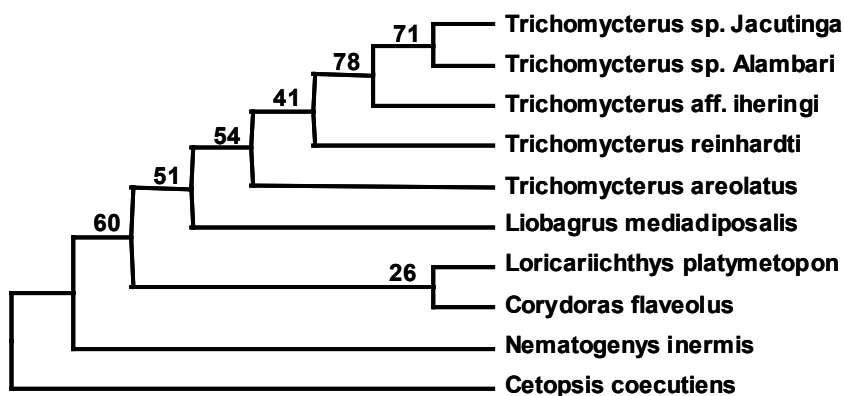


Figura 26. Árvore de consenso obtida entre 3.002 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 10 táxons e 58 caracteres de peso igual e não ordenados. Grupo externo utilizado: *Cetopsis coecutiens*. Número de passos = 127, índice de consistência = 0,7402 e índice de retenção = 0,6333. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

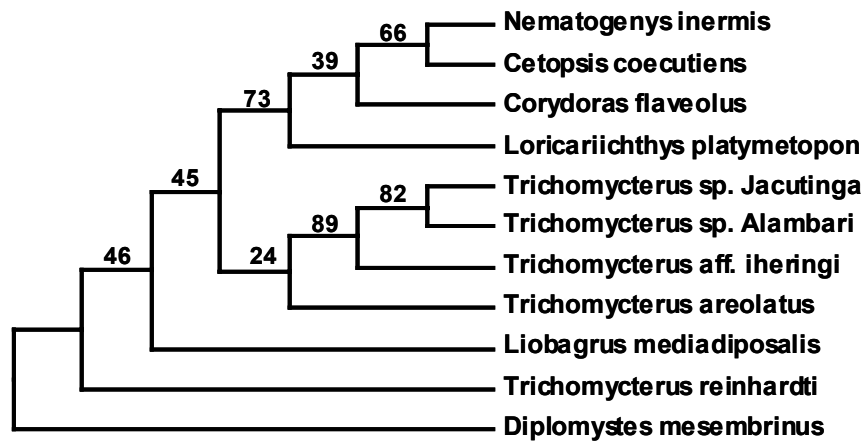


Figura 27. Árvore de consenso obtida entre 2.704 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 11 táxons e 58 caracteres de peso igual e não ordenados. Grupo externo utilizado: *Diplomystes mesembrinus*. Número de passos = 147, índice de consistência = 0,7211 e índice de retenção = 0,6273. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

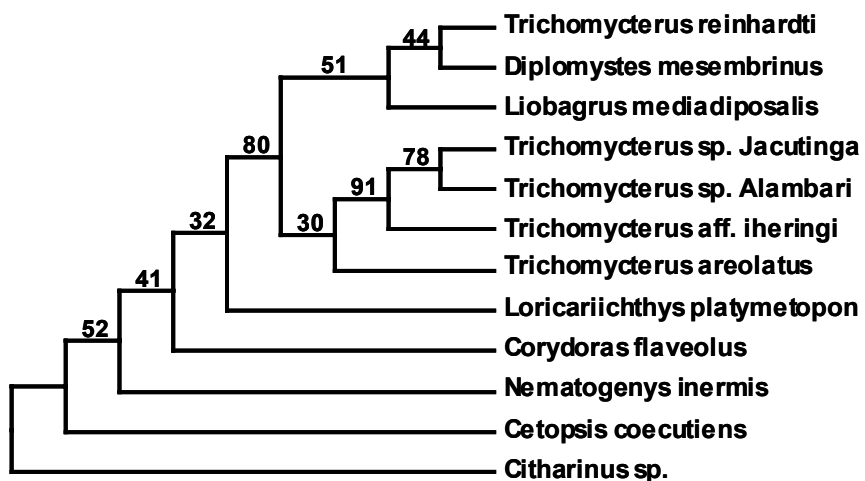


Figura 28. Árvore de consenso obtida entre 3.965 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 12 táxons e 58 caracteres de peso igual e não ordenados. Grupo externo utilizado: *Citharinus* sp.. Número de passos = 159, índice de consistência = 0,6981 e índice de retenção = 0,6129. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

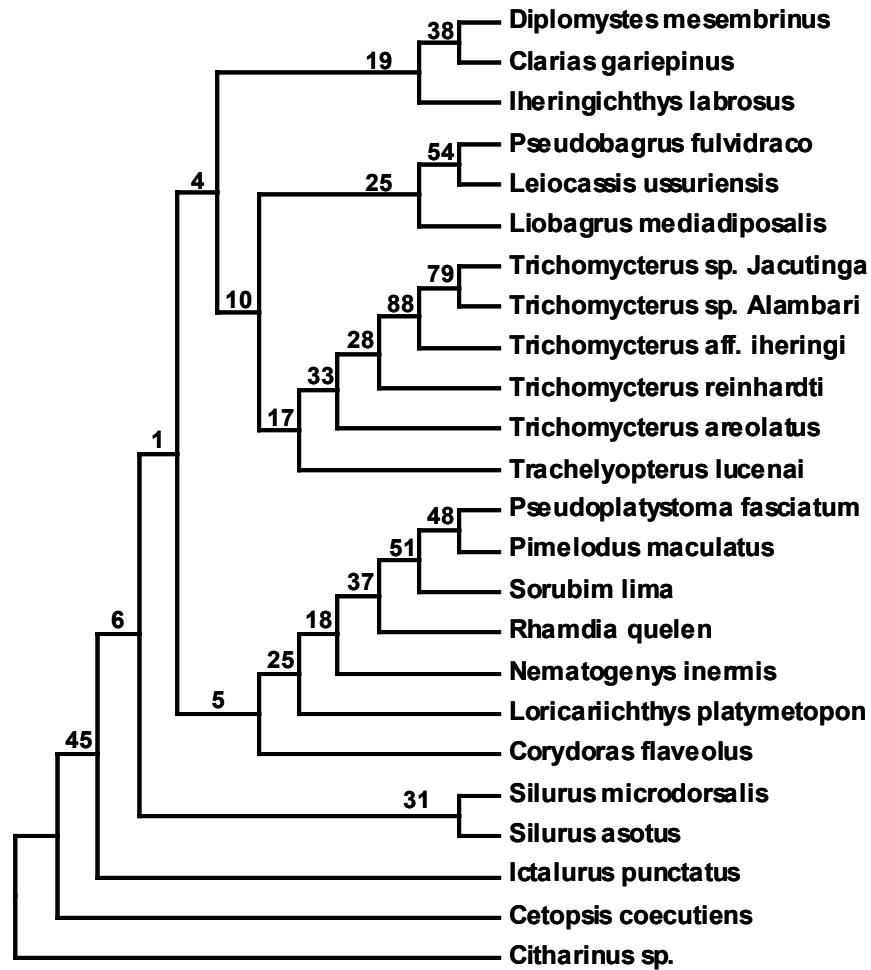


Figura 29. Árvore de consenso obtida entre 25.892 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 24 táxons e 58 caracteres de peso igual e não ordenados. Grupo externo utilizado: *Citharinus sp.*. Número de passos = 269, índice de consistência = 0,4758 e índice de retenção = 0,5983. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

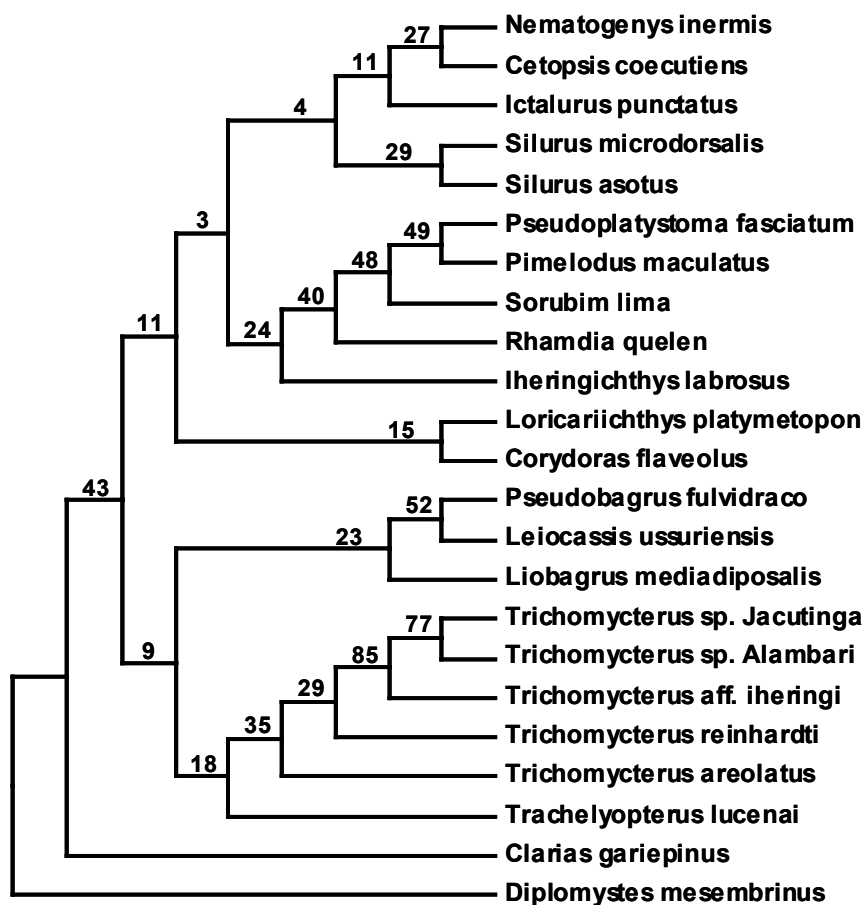


Figura 30. Árvore de consenso obtida entre 22.832 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 23 táxons e 58 caracteres de peso igual e não ordenados. Grupo externo utilizado: *Diplomystes mesembrinus*. Número de passos = 258, índice de consistência = 0,4884 e índice de retenção = 0,6060. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

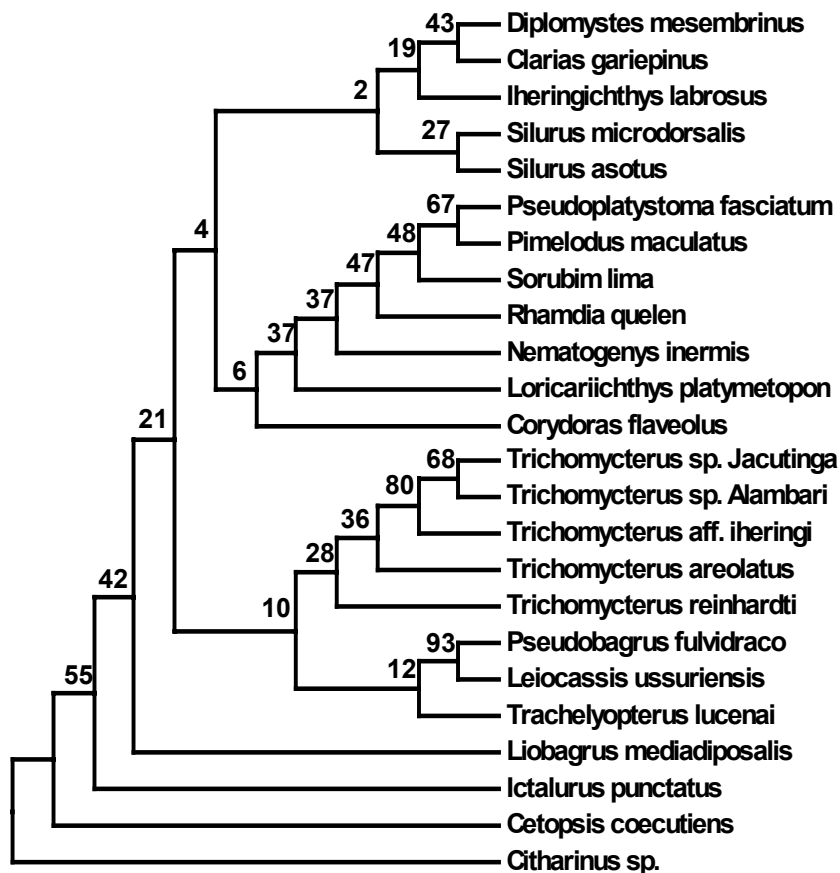


Figura 31. Árvore de consenso obtida entre 7.191 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise de 24 táxons e 58 caracteres de peso igual e ordenados. Grupo externo utilizado: *Citharinus sp.*. Número de passos = 346, índice de consistência = 0,3642 e índice de retenção = 0,6007. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

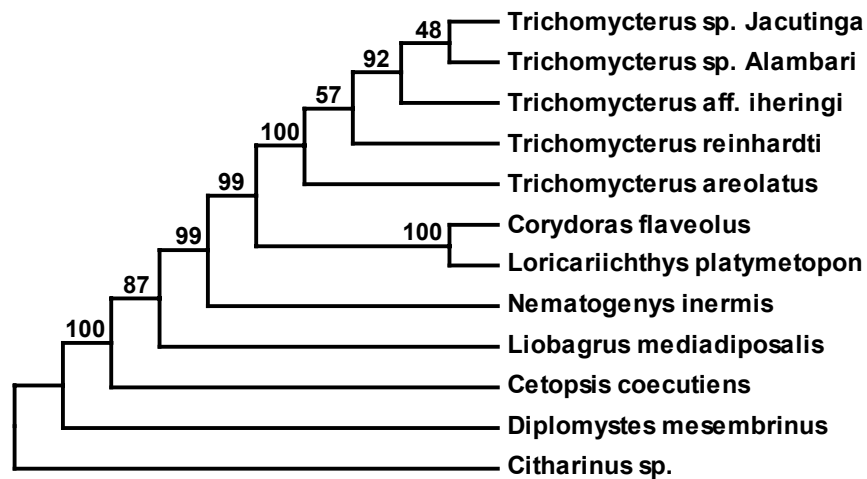


Figura 32. Árvore de consenso obtida entre 1.518 árvores igualmente parcimoniosas correspondente à análise da matriz de dados combinados, com 12 táxons e 389 caracteres ordenados, sendo 58 da ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides e 331 caracteres osteológicos e de morfologia externa. Grupos-externos utilizados: *Citharinus* sp. (dados de espermatozóide) e *H. machadoi* (outros dados morfológicos). Número de passos = 540, índice de consistência = 0,6574 e índice de retenção = 0,6766. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

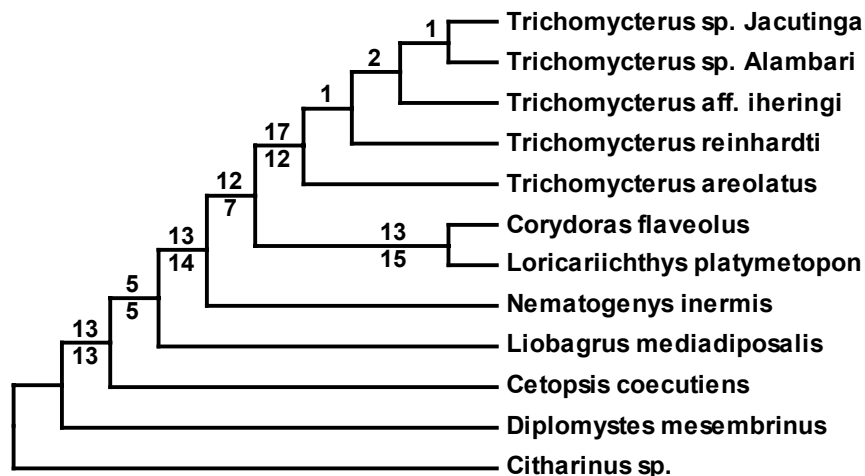


Figura 33. Árvore de consenso obtida entre 581 árvores testadas correspondente à análise da matriz de dados combinados, com 12 táxons e 389 caracteres ordenados. Número de passos = 480. Os números acima dos ramos indicam os valores do índice de decaimento referentes à análise dos caracteres combinados e os valores abaixo dos ramos são correspondentes ao índice de decaimento apenas dos caracteres osteológicos e de morfologia externa.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise ultraestrutural

As espermátides em Trichomycteridae e Loricariidae encontram-se no interior de cistos, formados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli. A abertura desses cistos ocorre ao término do processo de espermiogênese, sugerindo que a espermatogênese nessas famílias seja do tipo cística. Esse tipo de espermatogênese ocorre na maioria dos teleósteos (Mattei, 1993) e entre os Siluriformes nas famílias Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) e Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido).

Nas famílias Cetopsidae e Callichthyidae as espermátides são encontradas junto com os espermatozóides, na luz do compartimento germinativo, sugerindo que os cistos se abrem antes da diferenciação final das células germinativas. Assim, a espermatogênese nessas famílias deve ser do tipo semi-cística. Esse tipo de espermatogênese é menos comum entre os Teleostei, tendo sido observado em *Ophidion* sp., família Ophidiidae (Mattei, 1993) e em *Scorpaena notata*, família Scorpaenidae (Muñoz *et al.*, 2002).

Com relação aos processos de espermiogênese analisados em Loricarioidea, a que mais se aproxima da do tipo I de Mattei (1970) é a que ocorre no Trichomycteridae, *T. areolatus*. Nesta espécie, o desenvolvimento do flagelo nas espermátides iniciais é lateral e a rotação nuclear é praticamente completa; entretanto, o flagelo não assume uma posição perpendicular em relação ao núcleo, mas sim excêntrica. Nas outras espécies de Trichomycteridae analisadas, o desenvolvimento inicial do flagelo também ocorre lateralmente ao núcleo, porém a rotação nuclear é parcial, o que resulta na permanência do flagelo em posição lateral ao núcleo nos espermatozóides. Em todos os Trichomycteridae o canal citoplasmático se forma pela migração do complexo centriolar em direção ao núcleo.

Segundo Mattei (1970), os eventos iniciais que ocorrem no processo de espermiogênese, como o início do desenvolvimento flagelar lateral ao núcleo e a formação do canal citoplasmático pelo movimento do complexo centriolar em direção ao núcleo, verificados em alguns Siluriformes, é algo que também ocorre, na maioria dos membros de

Teleostei com fertilização externa. A ocorrência de rotação nuclear corresponde também a um padrão para a maioria dos teleósteos, enquanto que a ausência de rotação nuclear até então considerada uma característica da ordem Perciformes, também é encontrada em *Acestrorhynchus falcatus*, da ordem Characiformes (Matos, 2000). Em ambos os casos o desenvolvimento do flagelo é lateral ao núcleo. Nas famílias de Loricarioidea, Callichthyidae e Loricariidae e também em Cetopsidae, a não observância destes eventos, sugere que devam ser propostas adequações nos tipos de espermiogênese já definidos ou sejam propostas novas definições. Como exemplo entre Siluriformes, tem-se a espermiogênese observada na família Pimelodidae que foi descrita e classificada como do tipo III por Quagio-Grassiotto e Oliveira (manuscrito submetido) nas espécies *Pimelodus maculatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum*, por diferir consideravelmente dos tipos I e II de Mattei (1970).

A espermiogênese nos Loricarioidea, *C. flaveolus* (Callichthyidae) e *L. platymetopon* (Loricariidae), apresentam algumas similaridades com a espermiogênese do tipo III, no que diz respeito à permanência do complexo centriolar preso à membrana plasmática e, como consequência, a sua não migração e a ausência de rotação nuclear. Entretanto, são verificadas algumas particularidades, principalmente com relação à formação do canal citoplasmático, sendo possível que essa estrutura, nos espermatozóides de *C. flaveolus* e de *L. platymetopon*, seja resultante da projeção da massa citoplasmática da espermatíde tardia em direção à região inicial do flagelo além da interconexão, nessa mesma região, de vesículas presentes no citoplasma da futura peça intermediária.

Em *C. coecutiens*, da família Cetopsidae, considerada grupo-irmão de todos os outros Siluriformes, exceto Diplomystidae (de Pinna, 1998; Britto, 2003), a espermiogênese corresponde à observada em *L. platymetopon*.

A generalização da proposta de Mattei (1970) conduz à suposição de que nos Siluriformes a espermiogênese seria do tipo I. O mesmo autor chama, no entanto, a atenção para a existência de processos intermediários de espermiogênese que levariam a um posicionamento excêntrico do flagelo. Entre as espécies de Siluriformes para as quais há dados sobre a ultraestrutura da espermiogênese, somente a espermiogênese do siluriforme mais basal, *D. mesembrinus*, Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) corresponde

exatamente à do tipo I de Mattei (1970), com o desenvolvimento lateral do flagelo, formação do canal citoplasmático pela migração do complexo centriolar em direção ao núcleo, ocorrência de rotação nuclear completa em relação ao flagelo e posição perpendicular do flagelo no espermatozóide. No estudo sobre a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da ordem Characiformes, família Characidae, realizado por Gusmão-Pompiani (2003), a maioria das espécies analisadas apresenta espermiogênese do tipo I de Mattei (1970), porém com rotação nuclear, às vezes parcial; mostrando que este tipo de espermiogênese pode ser encontrado em outros Otophysi. Além disso, os resultados apresentados por esta autora indicam que há pelo menos dois padrões relativamente bem definidos de espermiogênese em Characidae; não ocorrendo o mesmo em Siluriformes, que apresenta processos de espermiogênese consideravelmente variáveis.

Em termos comparativos, é possível estabelecer relações, entre as espécies de Siluriformes, no que diz respeito a espermiogênese. Assim, o desenvolvimento inicial do flagelo é medial em Loricariidae e também em Cetopsidae, sendo o mesmo compartilhado por Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido). O desenvolvimento é lateral em Trichomycteridae e Callichthyidae, como também em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001). A presença do movimento do complexo centriolar em Trichomycteridae, também é observado em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001). Em Callichthyidae e Loricariidae, e também em Cetopsidae, o complexo centriolar não migra em direção ao núcleo, o que é observado em Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido). Apenas nas espécies da família Pimelodidae, a formação do canal citoplasmático não ocorre. Nas espécies em que ocorre a formação do canal citoplasmático, esta formação se dá pela migração do complexo centriolar, como observado em Trichomycteridae e em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), enquanto que em Callichthyidae, Loricariidae e Cetopsidae, é possível que a formação do canal citoplasmático ocorra pela migração da massa citoplasmática em direção ao flagelo e pela interconexão de vesículas. Entre os Loricarioidea, somente em Trichomycteridae é observada a ocorrência de rotação nuclear, o mesmo ocorrendo em Diplomystidae (Quagio-

Grassiotto *et al.*, 2001). Outro processo que ocorre durante a espermiogênese é a formação da fossa nuclear, como observada em Trichomycteridae, Callichthyidae, Cetopsidae e Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001).

Quanto aos caracteres ultraestruturais dos espermatozóides das diferentes espécies de Siluriformes, verifica-se que estas células apresentam cabeça sem vesícula acrossomal, peça intermediária e flagelo. A ausência da vesícula acrossomal nestes espermatozóides é considerada uma característica apomórfica dos Neopterygii (Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

O núcleo do espermatozóide dos Loricarioidea, Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *T. areolatus*, Callichthyidae e Loricariidae, apresenta formato arredondado, o que também é observado em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2000) e nos Pimelodidae, *S. lima* (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000) e *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001). No Trichomycteridae, *T. reinhardti* o núcleo é ovóide com o seu maior eixo na horizontal. Apesar do formato do núcleo do espermatozóide em Nematogenyidae ter sido definido também por esse formato, o seu eixo maior corresponde à largura do núcleo, enquanto que em *T. reinhardti*, o eixo maior corresponde ao comprimento do núcleo. Núcleos de formato ovóide também são observados nos Pimelodidae, *Pimelodus maculatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* (Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), porém o eixo maior desses núcleos é no sentido vertical. Em Cetopsidae, os núcleos possuem formato semi-ovóide, sendo o mesmo observado em Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000) e em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982). Em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) o núcleo é semi-arredondado. Os espermatozóides de *R. quelen*, da família Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001), de *T. lucenai*, da família Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) e do caraciforme, *Citharinus* sp. (Mattei, 1995) apresentam núcleos com o formato cônico. Com base no exposto, observa-se que nos espermatozóides de Siluriformes ocorre uma variação considerável no formato dos núcleos.

As medidas realizadas mostram que o comprimento dos núcleos dos espermatozóides dos Siluriformes analisados, em média, é de $1,87 \pm 1,05 \mu\text{m}$. Todas as espécies de Loricarioidea analisadas apresentam núcleos de comprimento curto, com menos de $2,0 \mu\text{m}$; característica que é compartilhada pela grande maioria dos Siluriformes

observados. Variações neste comprimento são observadas em *R. quelen*, da família Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001) e em *Citharinus* sp. (Mattei, 1995), que apresentam núcleos de comprimento médio, variando entre 2,0 e 3,0µm. Já em *T. lucenai*, da família Auchenipteridae, o núcleo é longo, apresentando 6,5µm em comprimento (Burns *et al.*, 2002).

Quanto à largura dos núcleos dos Siluriformes, tem-se que em média, eles apresentam $1,62 \pm 0,43 \mu\text{m}$. Núcleos com largura média, entre 1,0 e 2,5µm são observados em Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae e em grande parte das outras famílias de Siluriformes. Os núcleos dos espermatozóides de Nematogenyidae diferem dos demais Loricarioidea, uma vez que são largos, com 2,82µm. Em Auchenipteridae os núcleos são estreitos, medindo 0,44µm em largura. Com base em suas análises, Jamieson (1991) propôs que os núcleos dos espermatozóides dos peixes teleósteos de fertilização externa, em geral, apresentam um diâmetro aproximado de 2,0 µm.

Na ordem Siluriformes o padrão de compactação da cromatina mostra-se de duas formas: homogêneo ou heterogêneo. O homogêneo, no qual a cromatina é compactada uniformemente ao longo da espermiogênese, observado em Nematogenyidae, na maioria dos Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae, é compartilhado com outras famílias de Siluriformes: Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2000), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto, manuscrito submetido), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982), Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) e Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Em Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae, essa cromatina encontra-se entremeada por áreas elétron-lúcidas, da mesma forma que em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), no Siluridae, *S. microdorsalis* (Lee e Kim, 2000), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e no Bagridae, *P. fulvidraco* (Lee, 1998). O padrão de compactação da cromatina observado no Trichomycteridae, *T. reinhardti* difere dos demais Loricarioidea analisados; apresentando-se heterogêneo, na forma de filamentos finos justapostos com áreas eletron-

lúcidas. Esta característica também está presente em *C. coecutiens*, da família Cetopsidae. Em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) e no caraciforme, *Citharinus* sp. (Mattei, 1995), o padrão de compactação da cromatina apesar de ser heterogêneo, se apresenta na forma de grumos justapostos. Apesar de ter sido observado, nestas espécies da ordem Siluriformes, o padrão heterogêneo de compactação da cromatina, Jamieson (1991) e Mattei (1991) descrevem que, em geral, o núcleo dos espermatozóides da maioria dos Otophysi apresenta cromatina altamente compactada de forma homogênea.

A fossa nuclear, uma depressão encontrada no contorno nuclear voltado para o flagelo, pode ou não estar presente nos espermatozóides dos teleósteos (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Dentre as famílias de Loricarioidea, a fossa nuclear está ausente em Nematogenyidae e Loricariidae. Essa condição também é observada em outras famílias de Siluriformes, como Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). Nas famílias em que a fossa nuclear está presente, esta estrutura pode apresentar formato, profundidade e largura variáveis. Em Trichomycteridae, Callichthyidae e Cetopsidae, a fossa nuclear possui formato de arco único, o que é compartilhado por Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), no Pimelodidae, *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002), Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000) e *Citharinus* sp. (Mattei, 1995). A família Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2000) apresenta fossa nuclear em arco único ramificado. Fossa nuclear em arco duplo é encontrada em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) e em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982).

Em média, a profundidade da fossa nuclear encontrada nos núcleos dos espermatozóides dos Siluriformes é de $0,52 \pm 0,26 \mu\text{m}$. A profundidade da fossa nuclear é muito rasa, com menos de $0,25 \mu\text{m}$, em Callichthyidae, o mesmo ocorrendo no Pimelodidae, *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001) e no characiforme *Citharinus* sp. (Mattei, 1995). Na maioria das espécies de Trichomycteridae analisadas, a fossa nuclear é rasa, variando entre $0,25$ e $0,5 \mu\text{m}$, da mesma forma que em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) e em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982).

Espermatozóides com fossa nuclear de profundidade moderada, de 0,5 a 0,75 μm , são encontrados em *T. aff. Iheringi*, da família Trichomycteridae e em Cetopsidae. Esta mesma profundidade é observada nas famílias Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) e Siluridae para *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998). Fossa nuclear profunda com mais de 0,75 μm está presente em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), no Siluridae, *S. microdorsalis* (Lee e Kim, 2000) e em Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Lee e Kim (2001) afirmam que a presença de uma fossa nuclear profunda nos espermatozóides pode representar uma sinapomorfia que unifica os Siluriformes, enquanto que espermatozóides com uma fossa nuclear rasa ocorrem em outros grupos de Otophysi como Cypriniformes e Characiformes. Os dados obtidos e os disponíveis na literatura sobre a ultraestrutura dos espermatozóides em Siluriformes mostram que a profundidade da fossa nuclear, quando esta existe, é extremamente variável.

Com base nas medidas realizadas, a largura da fossa nuclear em Siluriformes, em média, é de $0,41 \pm 0,15 \mu\text{m}$. Ela se mostra estreita, com menos de 0,3 μm , no Trichomycteridae, *T. reinhardti*, ocorrendo o mesmo para Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), no Pimelodidae, *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001) e em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). Já no Trichomycteridae, *T. areolatus* a fossa nuclear é larga, com mais de 0,6 μm em largura, o que também é verificado para Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982). Os outros Trichomycteridae, Nematogenyidae, Callichthyidae e Loricariidae apresentam fossa nuclear com largura média, variando entre 0,3 e 0,6 μm ; o que é compartilhado por outras famílias de Siluriformes. Com base no exposto, observa-se que a largura da fossa nuclear em Trichomycteridae é variável, uma vez que as espécies analisadas apresentam esta estrutura com larguras estreita, média e larga.

A fossa nuclear é lateral em quase todos os Trichomycteridae, enquanto é excêntrica em *T. areolatus* e também em Callichthyidae. Fossa nuclear excêntrica é encontrada também em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). Na maioria das espécies de Siluriformes, incluindo a família Cetopsidae, a fossa nuclear assume uma posição medial em relação ao núcleo.

A posição do complexo centriolar, constituído pelo centríolo proximal e pelo centríolo distal, em relação ao núcleo está associada com a existência, ao formato e à profundidade da fossa nuclear. Desta forma, nas famílias em que a fossa nuclear está ausente, o complexo centriolar posiciona-se distante do núcleo, como em Nematogenyidae, enquanto que em Loricariidae, outro Loricarioidea que não possui fossa nuclear, o complexo centriolar situa-se junto ao núcleo, como em Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). Nas outras famílias de Siluriformes, em que a fossa nuclear está presente, o complexo centriolar encontra-se totalmente fora da mesma em Callichthyidae, como observado no Pimelodidae, *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001). Apesar de na maioria das espécies de Trichomycteridae analisadas, somente o centríolo proximal se encontrar inserido na fossa nuclear, no Trichomycteridae, *T. areolatus*, o complexo centriolar encontra-se totalmente inserido na fossa nuclear. O mesmo é observado em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) e Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Fossa nuclear com centríolo proximal totalmente inserido e centríolo distal parcialmente inserido é observada em Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2000) e Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). No caraciforme *Citharinus* sp. somente o centríolo distal encontra-se inserido na fossa nuclear (Mattei, 1995).

De acordo com Mattei (1988), nos espermatozóides biflagelados, os centríolos não são referidos como complexo centriolar, e, portanto, não diferenciados em centríolo proximal e distal, uma vez que cada um dos centríolos transforma-se em corpúsculo basal e dá origem a um flagelo. Nas espécies em que os espermatozóides são biflagelados, é a posição dos centríolos ou corpúsculos basais que está relacionada com a fossa nuclear e não o complexo centriolar. Assim, em Cetopsidae os corpúsculos basais encontram-se totalmente inseridos na fossa nuclear, o que é compartilhado por Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999). Entretanto, em Ictaluridae, os corpúsculos basais encontram-se parcialmente inseridos na fossa nuclear (Poirier e Nicholson, 1982).

Quanto ao arranjo dos centríolos proximal e distal ou dos corpúsculos basais, um em relação ao outro, observa-se que os centríolos são laterais em Nematogenyidae, nos

Trichomycteridae, *T. areolatus*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), *T. reinhardti* e em Cetopsidae, o que também é evidenciado em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e *Citharinus sp.* (Mattei, 1995). As demais espécies de Loricarioidea analisadas apresentam centríolo proximal anterior em relação ao distal; sendo esta característica também compartilhada pelas outras famílias de Siluriformes analisadas.

Segundo Kwon e colaboradores (1998), os centríolos proximal e distal ou os corpúsculos basais variam consideravelmente suas posições relativas nos espermatozóides dos teleósteos, podendo ser paralelos, co-axiais ou formarem, entre si, ângulos: reto, obtuso ou agudo. Centríolo proximal formando um ângulo obtuso com o distal é observado na maioria dos Trichomycteridae analisados, o mesmo ocorrendo em Clariidae (Mansour *et al.* 2002) e no Siluridae, *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998). Já o Trichomycteridae, *T. reinhardti* possui centríolo proximal em ângulo reto com o distal, o que também ocorre em *R. quelen*, da família Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). Em Callichthyidae o centríolo proximal é coaxial ao distal, sendo esta característica compartilhada pelas espécies da família Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Em Loricariidae o centríolo proximal é lateral e em ângulo reto em relação ao distal, não sendo observada, até o momento em Siluriformes, posicionamento semelhante. Os centríolos ou corpúsculos basais são paralelos nos espermatozóides de Nematogenyidae e Cetopsidae, como também em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e no characiforme, *Citharinus sp.*. Em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) o centríolo proximal é perpendicular ao distal, como em *S. microdorsalis*, da família Siluridae (Lee e Kim, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). Entre estes possíveis arranjos, Jamieson (1991) considera que o arranjo em que centríolo proximal é perpendicular em relação ao distal seja uma característica plesiomórfica para os espermatozóides de peixes. Os resultados obtidos demonstram a diversidade de posição relativa entre os centríolos encontrada na superfamília Loricarioidea, bem como nos outros Siluriformes.

Na grande maioria das espécies de Loricarioidea analisadas, a peça intermediária apresenta uma localização basal em relação ao núcleo. Esta característica é compartilhada por quase todas as outras famílias de Siluriformes para quais há dados disponíveis. Jamieson (1991) e Mattei (1991) mostram que esta localização é realmente a mais encontrada entre os Teleostei. Entretanto, nos espermatozóides do Trichomycteridae, *T. reinhardti* a peça intermediária é basolateral, sendo o mesmo observado em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982). Apesar da localização ser similar em Ictaluridae e no Trichomycteridae, *T. reinhardti*, o citoplasma da peça intermediária em Ictaluridae distribui-se simetricamente.

Quanto à simetria da peça intermediária, observa-se que nos Loricarioidea analisados a peça intermediária é simétrica apenas em Nematogenyidae. O mesmo ocorre em Cetopsidae e em grande parte das outras famílias de Siluriformes, como em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001), Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e em *Citharinus* sp.. Os outros Loricarioidea: Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae apresentam peça intermediária assimétrica, da mesma forma que em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002).

O comprimento, em média, da peça intermediária das espécies de Siluriformes analisadas é de $1,21 \pm 0,58 \mu\text{m}$. Entre os Loricarioidea, as famílias Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae possuem espermatozóides cuja peça intermediária apresenta comprimento médio, entre $1,0 \mu\text{m}$ e $1,7 \mu\text{m}$. Isto também é observado em *S. microdorsalis*, da família Siluridae (Lee e Kim, 2001), *Pimelodus maculatus*, da família Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001), no Bagridae, *Pseudobagrus fulvidraco* (Lee, 1998), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e em *Citharinus* sp.. No Loricarioidea, *N. inermis*, da família Nematogenyidae, a peça intermediária é longa, apresentando mais de $1,7 \mu\text{m}$ em comprimento, à semelhança de *T. lucenai*, da família Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). Já a família Cetopsidae apresenta peça intermediária curta, com menos de $1,0 \mu\text{m}$, o que está presente também em

Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), no Siluridae, *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998), nos Pimelodidae, *P. fasciatum*, *S. lima* e *I. labrosus* (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e no Bagridae, *L. ussuriensis* (Kim e Lee, 2000).

As medidas da largura da peça intermediária mostram que esta apresenta, em média, $1,65 \pm 0,66 \mu\text{m}$. Na maioria dos Loricarioidea analisados, a peça intermediária tem largura média variando de 0,7 a 2,3 μm , o que ocorre também nos espermatozóides das demais espécies de Siluriformes observadas. Uma exceção em Loricarioidea é *N. inermis*, da família Nematogenyidae, que possui peça intermediária larga, com 3,90 μm em largura. Peça intermediária larga, como encontrada em Nematogenyidae, é observada também em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982). Por outro lado, o espermatozóide de *T. lucenai*, da família Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) apresenta peça intermediária estreita, com largura de 0,55 μm .

Todas as famílias de Loricarioidea analisadas têm canal citoplasmático, sendo que esta característica é compartilhada por Cetopsidae e por outras famílias de Siluriformes. Entre os Siluriformes analisados, há famílias em que o canal citoplasmático está ausente nos espermatozóides, como em Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido), Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). Em Diplomystidae, o canal citoplasmático formado durante a espermiogênese, em *D. mesembrinus*, não se mantém no espermatozóide (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001). Nos grupos em que o canal citoplasmático está presente, esta estrutura pode variar em número. O canal citoplasmático é único nas espécies de Loricarioidea e em Cetopsidae e na maioria dos espermatozóides das outras famílias da ordem analisadas. Já os espermatozóides biflagelados de *L. mediadiposalis*, da família Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) e de *I. punctatus*, da família Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) apresentam dois canais citoplasmáticos, sendo um canal citoplasmático para cada flagelo. Com base nos resultados obtidos, a presença de dois flagelos no espermatozóide não é condição para a presença de dois canais citoplasmáticos, uma vez que os espermatozóides biflagelados de Nematogenyidae e Cetopsidae apresentam apenas um canal citoplasmático compartilhado pelos dois flagelos.

O canal citoplasmático em Siluriformes apresenta um comprimento, em média, de $0,92 \pm 0,61 \mu\text{m}$. Em Nematogenyidae, Callichthyidae e Loricariidae, o canal citoplasmático é curto, medindo menos que $0,70 \mu\text{m}$. Esta condição também é encontrada em Cetopsidae e em outras famílias de Siluriformes, como Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) e Siluridae, para *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998). A família Trichomycteridae possui canal citoplasmático com comprimento médio, entre $0,7$ e $1,5 \mu\text{m}$, sendo que o mesmo ocorre no Siluridae, *S. microdorsalis* (Lee e Kim, 2001), Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e no characiforme *Citharinus* sp.. Canal citoplasmático longo, com $2,65 \mu\text{m}$ de comprimento, é observado em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002).

Em média, a largura do canal citoplasmático nos espermatozóides dos Siluriformes é de $0,42 \pm 0,14 \mu\text{m}$. A maioria dos espermatozóides dos Siluriformes analisados, incluindo Callichthyidae, Loricariidae e os Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, *T. sp* (Jacutinga) e *T. sp* (Alambari), apresentam canal citoplasmático de largura média, variando entre $0,32$ a $0,6 \mu\text{m}$. Entretanto, os espermatozóides dos Trichomycteridae, *T. areolatus* e *T. reinhadti*, apresentam canal citoplasmático estreito, com menos de $0,32 \mu\text{m}$, o que também ocorre nas espécies *L. mediadiposalis*, Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) e *T. lucenai*, Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). Já o Loricarioidea, *N. inermis*, Nematogenyidae, apresenta canal citoplasmático largo, com $0,88 \mu\text{m}$.

As mitocôndrias presentes nos espermatozóides dos Otophysi variam em quantidade e forma, além de variar também quanto à posição e distribuição na peça intermediária (Jamieson, 1991; Mattei, 1988, 1991). As espécies de Trichomycteridae analisadas possuem poucas mitocôndrias na peça intermediária. Entre os demais Siluriformes, a maioria das espécies apresenta uma quantidade similar de mitocôndrias na peça intermediária. Com relação às outras famílias de Loricarioidea, a peça intermediária, em Nematogenyidae e em Callichthyidae, contém uma grande quantidade de mitocôndrias. Embora a família Loricariidae apresente muitas mitocôndrias na peça intermediária, essa quantidade não atinge aquela observada na peça intermediária das famílias Nematogenyidae e Callichthyidae. No siluriforme mais basal, *D. mesembrinus*, família Diplomystidae, uma única mitocôndria é encontrada na peça intermediária (Quagio-

Grassiotto *et al.*, 2001). A peça intermediária dos espermatozóides em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2001), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) e Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000) apresenta uma quantidade moderada de mitocôndrias. Baccetti e colaboradores (1984), consideram o número de mitocôndrias uma característica espécie-específica, representando um bom caráter em estudos filogenéticos inter-específicos.

Com relação ao formato das mitocôndrias encontradas na peça intermediária, tem-se que em Nematogenyidae e Callichthyidae, as mitocôndrias são alongadas e ramificadas, enquanto que na maioria dos Trichomycteridae e em Loricariidae, as mitocôndrias são alongadas; condição observada em grande parte das outras famílias de Siluriformes analisadas. No Trichomycteridae, *T. reinhardti* são encontradas mitocôndrias com formato irregular. Este formato está presente ainda em Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), no Siluridae, *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998) e nos Pimelodidae, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum* e *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido). Mitocôndrias arredondadas ocorrem em Cetopsidae e também em Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), no Siluridae, *S. microdorsalis* (Lee e Kim, 2001) e no Bagridae, *P. fulvidraco* (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Em Diplomystidae, a única mitocôndria possui formato em C (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001).

Entre os Loricarioidea, as famílias Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae apresentam mitocôndrias posicionadas nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária. Esta posição é compartilhada pela maioria das outras espécies de Siluriformes. Em Nematogenyidae e também em Cetopsidae, as mitocôndrias encontram-se posicionadas nas regiões apical e medial na peça intermediária, como em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), no Siluridae, *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998) e em Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). As mitocôndrias posicionam-se na região apical da peça intermediária nos Pimelodidae, *Pimelodus maculatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum* e *S. lima* (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e no characiforme *Citharinus* sp. (Mattei, 1995).

Quanto à distribuição das mitocôndrias, observa-se que, em geral, as mitocôndrias distribuem-se central e perifericamente na peça intermediária da maioria dos

espermatozóides dos Siluriformes analisados, incluindo os Loricarioidea das famílias Nematogenyidae, Callichthyidae e Loricariidae. Em Trichomycteridae, as mitocôndrias distribuem-se aleatoriamente na peça intermediária, diferindo do observado para os outros Loricarioidea; contudo, esta distribuição também ocorre em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) e Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982). Mitocôndrias distribuídas apenas na periferia da peça intermediária são observadas em Cetopsidae e Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido).

Como na maioria das espécies de Siluriformes analisadas, nas famílias Trichomycteridae e Loricariidae, as mitocôndrias presentes na peça intermediária encontram-se isoladas do segmento inicial do flagelo apenas pelo canal citoplasmático. No entanto, nas outras espécies de Loricarioidea, das famílias Nematogenyidae e Callichthyidae, as mitocôndrias estão separadas do flagelo não só pelo canal citoplasmático, mas também por vesículas. Esta mesma característica está presente em Cetopsidae, bem como em Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2001), Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982) e no caraciforme *Citharinus* sp. (Mattei, 1995).

As vesículas encontradas na peça intermediária dos espermatozóides dos Siluriformes podem variar em quantidade, posição e distribuição e podem ainda estar interconectadas umas às outras e/ou com a membrana plasmática formando compartimentos membranosos. Entre os Loricarioidea analisados apenas o Trichomycteridae, *T. reinhardti*, não apresenta vesículas na peça intermediária, sendo esta ausência compartilhada pelos espermatozóides de Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) e Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Nos espermatozóides das outras famílias de Loricarioidea, bem como de outros Siluriformes existem vesículas na peça intermediária. A presença de vesículas na peça intermediária também é compartilhada por outros grupos de Otophysi, como Cypriniformes (Baccetti *et al.*, 1984; Jamieson, 1991) e Characiformes (Mattei *et al.*, 1995; Gusmão-Pompiani, 2003; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003). Isto sugere uma condição plesiomórfica do caráter em questão, embora não observado em Diplomystidae, considerada a família mais basal dentro de Siluriformes.

Entre os Siluriformes analisados, a maioria das espécies apresenta uma quantidade de vesículas na peça intermediária que varia entre pequena e moderada. Com relação aos Loricarioidea, o Trichomycteridae, *T. areolatus* e o Callichthyidae, *C. flaveolus*, possuem poucas vesículas na peça intermediária, enquanto que nos outros Trichomycteridae e Loricariidae, a quantidade de vesículas é moderada. Já a peça intermediária do espermatozóide de *N. inermis*, da família Nematogenyidae contém muitas vesículas, sendo o mesmo observado nos espermatozoides de Cetopsidae e de *Citharinus* sp. (Mattei, 1995).

As vesículas posicionam-se nas regiões medial e basal da peça intermediária dos espermatozoides em Loricariidae e também em Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001), no Siluridae, *S. asotus* (Kwon *et al.*, 1998), no Pimelodidae, *P. fasciatum* (Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e no caraciforme *Citharinus* sp. (Mattei, 1995). Em Nematogenyidae e em Callichthyidae as vesículas encontram-se posicionadas apenas na região basal da peça intermediária. Nos outros Siluriformes, incluindo as espécies da família Trichomycteridae, as vesículas são encontradas nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária.

Quanto à distribuição das vesículas, observa-se que em Callichthyidae, as vesículas distribuem-se na periferia da peça intermediária, o que é observado também em Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) e Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). Em Nematogenyidae e em Cetopsidae, as vesículas distribuem-se central e perifericamente na peça intermediária. Esta distribuição é encontrada também em Siluridae (Kwon *et al.*, 1998; Lee e Kim, 2001), nos Pimelodidae, *Pimelodus maculatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* (Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e no caraciforme *Citharinus* sp. (Mattei, 1995). Vesículas distribuídas aleatoriamente na peça intermediária ocorrem em Trichomycteridae e Loricariidae, sendo isto compartilhado pelos Pimelodidae, *S. lima* e *I. labrosus* (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001) e Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982).

As vesículas encontram-se, na peça intermediária dos espermatozoides do Trichomycteridae, *T. areolatus*, Callichthyidae e de Loricariidae, isoladas. Esta característica está presente também em Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) e em *Citharinus* sp. (Mattei, 1995). Já em Nematogenyidae e Cetopsidae as vesículas encontram-se conectadas, sendo que o mesmo ocorre em *S. asotus*, Siluridae (Kwon *et al.*, 1998) e Heptapteridae

(Quagio-Grassiotto, 2001). Vesículas tanto isoladas quanto conectadas são observadas na peça intermediária dos espermatozóides da maioria dos Trichomycteridae, bem como no Siluridae, *S. microdorsalis* (Lee e Kim, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982).

As vesículas presentes na peça intermediária dos espermatozóides de Nematogenyidae e Trichomycteridae mostram-se conectadas umas com as outras, o mesmo ocorrendo em Cetopsidae e para outras famílias de Siluriformes, como em *S. asotus*, Siluridae (Kwon *et al.*, 1998) e em Heptapteridae (Quagio-Grassiotto, 2001). No Siluridae, *S. microdorsalis* (Lee e Kim, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto e Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001; Quagio-Grassiotto e Oliveira, manuscrito submetido) e em Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982), as vesículas além de se conectarem umas com as outras, também se conectam com a membrana plasmática.

Na maioria dos Otophysi, o espermatozóide apresenta um único flagelo, constituído pelo axonema clássico (9+2) (Jamieson, 1991; Mattei, 1988, 1991). Em algumas espécies os flagelos podem apresentar um compartimento membranoso e ainda, expansões laterais de número e tamanho variados, denominadas de projeções laterais ou “fins” (Mattei, 1988). Entre os Loricarioidea, as famílias Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae apresentam espermatozóides uniflagelados, como o que ocorre para a maioria das espécies de Siluriformes analisadas. No entanto, os espermatozóides da família Nematogenyidae e também Cetopsidae são biflagelados, sendo esta condição compartilhada por Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) e Ictaluridae (Poirier e Nicholson, 1982). Para Mattei (1991) a ocorrência de espermatozóides biflagelados não possui implicações filogenéticas, com o caráter surgindo várias vezes nos diferentes grupos de peixes. Porém, a alta incidência de espermatozóides biflagelados em Siluriformes sugere que seja necessária uma reavaliação das possíveis implicações filogenéticas do caráter.

Como em Nematogenyidae e também em Cetopsidae, na maioria dos espermatozóides das espécies observadas, os flagelos assumem uma posição medial em relação ao núcleo. A maioria dos Trichomycteridae apresenta flagelo lateral em relação ao núcleo, enquanto que em Trichomycteridae, *T. areolatus*, Callichthyidae e Loricariidae o

flagelo é excêntrico ao núcleo, sendo que o mesmo ocorre em Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002).

Entre as famílias de Loricarioidea analisadas, apenas na família Trichomycteridae ocorrem projeções laterais nos flagelos, característica esta compartilhada por Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999), e Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Quanto ao número, as espécies de Trichomycteridae, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, apresentam duas projeções laterais nos flagelos, o mesmo ocorrendo em *D. mesembrinus*, Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), *L. mediadiposalis*, Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999) e *P. fulvidraco* e *L. ussuriensis*, Bagridae (Lee, 1998; Kim e Lee, 2000). Já as outras espécies de Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari) possuem flagelos com número variável de projeções laterais, em geral, entre uma e quatro. Jamieson (1991) sugere que Otophysi é unificado por uma possível sinapomorfia que seria a perda das projeções laterais. Porém, os dados disponíveis sobre a ultraestrutura dos espermatozóides em Siluriformes mostram que esse caráter é bastante variável no grupo. Além disso, várias espécies da família Characidae, ordem Characiformes estudadas por Gusmão-Pompiani (2003) também apresentam projeções laterais nos flagelos.

As medidas realizadas mostram que o comprimento médio das projeções laterais encontradas nos flagelos das espécies de Siluriformes analisadas é de $0,28 \pm 0,13 \mu\text{m}$. As projeções laterais presentes nos flagelos do Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, são curtas, com menos de $0,2 \mu\text{m}$ em comprimento, sendo o mesmo observado em Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) e Amblycipitidae (Lee e Kim, 1999). Projeções laterais com comprimento médio, variando entre $0,2$ e $0,4 \mu\text{m}$, são encontradas nos flagelos dos espermatozóides da maioria dos Trichomycteridae, *T. areolatus*, *T. reinhardti*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari) e também no Bagridae, *P. fulvidraco* (Lee, 1998). Já no Bagridae, *L. ussuriensis* (Kim e Lee, 2000), as projeções laterais são longas, com mais de $0,4 \mu\text{m}$.

Nos espermatozóides dos Trichomycteridae das espécies *T. sp.* (Jacutinga) e *T. sp.* (Alambari), além das projeções laterais, os flagelos também apresentam um compartimento membranoso, o que não é encontrado nos demais Trichomycteridae. Entre os outros

Loricarioidea, apenas os espermatozóides de *C. flaveolus*, da família Callichthyidae, apresentam nos flagelos o mesmo tipo de compartimento membranoso. Flagelos com esta estrutura também foram observados por Gusmão-Pompiani (2003) e Quagio-Grassiotto e colaboradores (2003) nos espermatozóides de várias espécies das famílias Characidae e Curimatidae, que pertencem à ordem Characiformes.

5.2. Análise filogenética

Entre os cladogramas obtidos a partir das diferentes análises filogenéticas, foi difícil estabelecer qual deles poderia expressar a hipótese mais provável de relacionamento entre os táxons analisados. Assim, as características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides compartilhadas pelos táxons que se mostraram agrupados, foram apresentadas independente de tratarem-se de caracteres plesiomórficos ou apomórficos, uma vez que estas condições podem ser alteradas em função do cladograma produzido.

No cladograma apresentado na figura 25 observa-se uma tricotomia formada por Amblycipitidae, por *T. reinhardti*, da família Trichomycteridae e pelo restante dos membros de Loricarioidea. No clado formado pela maioria dos Loricarioidea verifica-se que *N. inermis*, *L. platymetopon*, *C. flaveolus* é grupo-irmão do Trichomycteridae, *T. areolatus*, com suporte baixo (41%) e; este conjunto como grupo-irmão de *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), apresentando um bom suporte (73%). Na análise filogenética que derivou este cladograma, dos 58 caracteres utilizados, 34 eram informativos para parcimônia, 5 eram constantes e 19 eram homoplasias ou autapomorfias.

Entre as características ultraestruturais dos espermatozóides compartilhadas pelo clado formado por *N. inermis*, *L. platymetopon* e *C. flaveolus* (valor de *bootstrap* = 93%), está a presença de um canal citoplasmático de comprimento curto, a distribuição central e periférica das mitocôndrias na peça intermediária e a ausência de projeções laterais nos flagelos. A hipótese de que *N. inermis* e *L. platymetopon* sejam considerados grupos-irmãos tem por base principalmente a ausência de fossa nuclear em seus espermatozóides. No entanto, o suporte para esta relação é relativamente baixo (53%).

Os caracteres compartilhados por *C. flaveolus* e *N. inermis* correspondem à presença de grande quantidade de mitocôndrias na peça intermediária, ao formato alongado e ramificado das mitocôndrias, à presença de vesículas apenas na região basal da peça intermediária e à separação das mitocôndrias do segmento inicial do flagelo pelas vesículas e pelo canal citoplasmático. Já *C. flaveolus* e *L. platymetopon* apresentam em comum a posição excêntrica do flagelo em relação ao núcleo, a assimetria da peça intermediária e a presença de vesículas não conectadas na peça intermediária.

A maioria dos espermatozóides das espécies do gênero *Trichomycterus* compartilha inúmeras características como a posição lateral do flagelo em relação ao núcleo, a presença de fossa nuclear e de canal citoplasmático, poucas mitocôndrias na peça intermediária e a presença de projeções laterais nos flagelos e; como consequência disto, encontram-se bem relacionadas (valor de *bootstrap* = 75%). Com relação às espécies *T. areolatus* e *T. reinhardti* observa-se que elas estão pouco relacionadas com o grupo formado pelos outros *Trichomycterus*. Isto é decorrente da diferença encontrada nas características ultraestruturais dos seus espermatozóides quando comparados com os das outras espécies de *Trichomycterus*. As diferenças com relação ao espermatozóide de *T. areolatus* baseiam-se principalmente na variação do processo de espermiogênese encontrado nesta espécie, na posição anterior do núcleo em relação ao flagelo e na presença de fossa nuclear larga. Com relação à *T. reinhardti*, as diferenças estão presentes no formato ovóide do núcleo, no padrão heterogêneo de compactação da cromatina, na localização basolateral da peça intermediária em relação ao núcleo e na ausência de vesículas na peça intermediária.

A topologia apresentada na figura 26 mostra também uma tricotomia, a qual é formada pela família Cetopsidae, pela família Nematogenyidae e pelo grupo constituído por Amblycipitidae e Trichomycteridae como grupo-irmão de Callichthyidae mais Loricariidae. Nesta análise, que foi conduzida com 58 caracteres, 43 eram informativos para a parcimônia, 4 eram constantes e 11 eram homoplasias ou autapomorfias. Novamente as espécies *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari) encontram-se formando um grupo bem suportado (78%), com *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari) como grupos-irmãos (valor de *bootstrap* = 71%). *T. reinhardti* e *T. areolatus* mostram-se, neste cladograma, relacionados com o clado descrito. O grupo formado pelos *Trichomycterus* apresenta como

grupo-irmão o Amblycipitidae, *L. mediadiposalis*, porém esta relação tem um suporte relativamente baixo (51%). Estas espécies compartilham os caracteres ultraestruturais como fossa nuclear rasa e a presença de projeções laterais nos flagelos. As famílias Callichthyidae e Loricariidae agora se apresentam como grupos-irmãos, porém essa relação é pouco suportada (26%). A hipótese de que o clado mencionado é grupo-irmão de Trichomycteridae mais Amblycipitidae (valor de *bootstrap* = 60%) tem por base os caracteres: padrão homogêneo de compactação da cromatina (com exceção de *T. reinhardti*), presença de canal citoplasmático e a posição das mitocôndrias nas regiões apical, medial e basal da peça intermediária.

A figura 27 mostra o cladograma no qual a tricotomia observada é formada pela família Diplomystidae, pelo Trichomycteridae, *T. reinhardti* e pelo clado Cetopsidae, Nematogenyidae, Callichthyidae e Loricariidae como grupo-irmão de Trichomycteridae (valor de *bootstrap* = 45%) e todo este conjunto como grupo-irmão de Amblycipitidae (valor de *bootstrap* = 46%). Dos 58 caracteres utilizados nesta análise, 44 eram informativos, 2 eram constantes e 12 eram homoplasias ou autapomorfias. Com a inserção da família Cetopsidae na análise, observa-se que ela relaciona-se com Nematogenyidae (valor de *bootstrap* = 66%). Vários são os caracteres compartilhados por estas famílias, como o arranjo lateral e paralelo dos centríolos ou corpúsculos basais, a presença de apenas um canal citoplasmático, o qual exibe comprimento curto, a posição das mitocôndrias nas regiões apical e medial da peça intermediária, a grande quantidade de vesículas na peça intermediária, a presença de dois flagelos e a ausência de projeções laterais nos flagelos. O coeso grupo formado por *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari) se mantém com um bom suporte (89%) e agora se mostra relacionado com *T. areolatus*, porém esta relação é pouco suportada (24%). Nesta topologia, *T. reinhardti* encontra-se fora deste grupo.

Na figura 28 está apresentado o cladograma no qual verifica-se a formação do grupo composto por *Citharinus sp.*, por Cetopsidae e por um grande clado contendo os membros da superfamília Loricarioidea e as famílias Diplomystidae e Amblycipitidae. Neste clado, o Trichomycteridae, *T. reinhardti* mostra-se mais aparentado com *D. mesembrinus* (valor de *bootstrap* = 44%). Entre as características dos seus espermatozóides que são comuns estão

o padrão heterogêneo de compactação da cromatina e ausência de vesículas na peça intermediária. O clado formado pelas outras espécies de *Trichomycterus* se mantém, inclusive a relação de *T. areolatus* como grupo-irmão de *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari), apesar de que para esta, o suporte é baixo (30%). Já o suporte da relação entre estes Trichomycteridae e o conjunto formado por Amblycipitidae, *T. reinhardti* e Diplomystidae, é alto (80%). Um dos caracteres que os espermatozóides destas espécies compartilham é a presença de projeções laterais nos flagelos. Os outros Loricarioidea encontram-se relacionados com este clado, mas com suporte dos ramos baixo. Nesta análise, entre os 58 caracteres utilizados, 44 eram informativos para parcimônia, um era constante e 13 eram homoplasias ou autapomorfias.

Observa-se, nas topologias exibidas nas figuras de 29 a 31, que as relações entre as famílias de Loricarioidea, bem como entre estas e as outras famílias de Siluriformes, mostram-se consideravelmente incongruentes com a hipótese de relacionamento proposta recentemente por Britto (2003). Além disso, grande parte das relações obtidas apresenta valores de *bootstrap* muito baixos.

No cladograma apresentado na figura 29 nota-se que *Citharinus sp.* e *C. coecutiens* encontram-se em uma tricotomia com o restante das espécies de Siluriformes. Dos 58 caracteres utilizados nesta análise, 54 eram informativos e 4 eram homoplasias ou autapomorfias. Com relação aos Loricarioidea, nota-se que os membros de Trichomycteridae encontram-se relacionados com *T. lucenai*, da família Auchenipteridae, sendo esta relação pouco suportada (17%). Embora o espermatozóide de *T. lucenai* apresente características que refletem o tipo de fertilização interna encontrado nesta espécie, como por exemplo, o alongamento do núcleo e da peça intermediária; outras características encontradas em seu espermatozóide são compartilhadas também pelos membros de Trichomycteridae, como, por exemplo, fossa nuclear rasa, peça intermediária assimétrica e distribuição aleatória de mitocôndrias na peça intermediária. A família Nematogenyidae mostra-se agora diretamente relacionada com as espécies das famílias Pimelodidae e Heptapteridae (valor de *bootstrap* = 18%). Entre os caracteres que os espermatozóides destas espécies compartilham está a ausência de fossa nuclear e de projeções laterais nos flagelos. Os outros grupos de Loricarioidea, Loricariidae e

Callichthyidae, encontram-se aparentados com este clado formado por Nematogenyidae, Pimelodidae e Heptapteridae, porém com suportes muito baixos (25% e 5%, respectivamente). Diplomystidae, a família considerada mais basal dentro de Siluriformes mostra-se neste cladograma, como grupo-irmão de Clariidae, sendo esta relação pouco suportada (38%). Algumas características compartilhadas pelos espermatozóides destas famílias correspondem à presença de núcleo arredondado, ao padrão heterogêneo de compactação da cromatina, à ausência de canal citoplasmático e de vesículas na peça intermediária.

No cladograma apresentado na figura 30, obtido a partir de uma análise conduzida apenas com as espécies de Siluriformes, observa-se que as famílias Diplomystidae e Clariidae formam uma tricotomia com um grande clado composto pelo restante das espécies. Para esta análise, dos 58 caracteres utilizados, 53 eram informativos para parcimônia e 5 eram homoplasias ou autapomorfias. A família Trichomycteridae permanece relacionada com *T. lucenai*, da família Auchenipteridae e o suporte deste agrupamento se mantém baixo (18%). As famílias Callichthyidae e Loricariidae mostram-se como grupos-irmãos (valor de *bootstrap* = 15%) e relacionadas com um grande clado formado por Cetopsidae, Nematogenyidae, Ictaluridae, Siluridae, Pimelodidae e Heptapteridae, porém com suporte baixo (11%). Nesta topologia, Nematogenyidae encontra-se como grupo-irmão de Cetopsidae (valor de *bootstrap* = 27%) e este par aparentado com Ictaluridae. A ocorrência de centríolos ou corpúsculos basais laterais e paralelos um em relação ao outro e de dois flagelos sem projeções laterais são exemplos de características compartilhadas pelos espermatozóides destas famílias.

Na topologia apresentada na figura 31 observa-se que as famílias de Loricarioidea sofrem um considerável rearranjo. Na análise que resultou nesta topologia, foram utilizados 48 caracteres e destes 46 eram informativos para parcimônia e dois eram homoplasias ou autapomorfias. Embora com pouco suporte (35%), a maioria dos representantes da família Trichomycteridae encontra-se agora relacionada com a família Ictaluridae. Ambas mostram-se aparentadas com o clado formado por Diplomystidae, pelo Trichomycteridae, *T. reinhardti*, Auchenipteridae, Amblycipitidae e Bagridae (valor de *bootstrap* = 12%). A família Nematogenyidae encontra-se como grupo-irmão do clado composto por

Loricariidae, Heptapteridae e Pimelodidae (valor de *bootstrap* = 36%). Apesar do suporte baixo (9%), a família Callichthyidae apresenta-se como grupo-irmão de Siluridae, com os seus espermatozóides compartilhando, por exemplo, o formato arredondado do núcleo e a separação das mitocôndrias da região inicial do flagelo pelo canal citoplasmático e pelas vesículas. A utilização de *Citharinus* sp. como grupo externo, nesta análise em que os caracteres foram tratados como ordenados, revelou, que a família Diplomystidae não permanece na condição basal dentro da ordem, ou seja, os espermatozóides desta família não apresentam características que concordam ou se aproximam das encontradas no grupo externo a ponto de mantê-la como grupo-irmão de todos os outros Siluriformes.

Na filogenia derivada a partir da combinação dos caracteres da ultraestrutura dos espermatozóides com os osteológicos e de morfologia externa apresentada na figura 32, *Citharinus* sp. e *D. mesembrinus* encontram-se em uma tricotomia com o clado formado por Cetopsidae, Amblycipitidae e Loricarioidea. Para esta análise foram utilizados 389 caracteres e destes 177 eram informativos, 126 eram constantes e 86 eram homoplasias ou autapomorfias. Esta topologia combinada mostra grandes áreas de congruências com a hipótese de relacionamento entre as famílias da ordem Siluriformes proposta com base em apenas caracteres de morfologia externa e osteológica (Britto, 2003), sendo suportadas por altos valores de *bootstrap*. Apenas a relação que considera *T. reinhardti* como grupo-irmão dos outros Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, *T. sp.* (Jacutinga), *T. sp.* (Alambari) e a que mostra *T. sp.* (Jacutinga) como grupo-irmão de *T. sp.* (Alambari), apresentam, relativamente, pouco suporte (57%, 48%, respectivamente). No entanto, o cladograma derivado do conjunto de dados combinados revela que as relações entre as famílias de Loricarioidea mostram-se divergentes no que se refere à posição da família Nematogenyidae. Nesta topologia, verifica-se que a família Nematogenyidae encontra-se como grupo-irmão do clado formado pelo restante da superfamília, com suporte de 99%, enquanto que na hipótese de relacionamento entre as famílias de Loricarioidea proposta por Britto (2003), a família Nematogenyidae é grupo-irmão apenas de Trichomycteridae.

A análise comparativa dos índices de decaimento apresentados na figura 33 revela que a combinação entre os dados da ultraestrutura dos espermatozóides com os outros dados morfológicos tem como consequência a manutenção do suporte em algumas áreas do

cladograma, como a que exprime a relação entre Cetopsidae e o clado formado por Amblycipitidae mais Loricarioidea (13→13) e a relação entre Amblycipitidae e Loricarioidea (5→5). Em outras áreas do cladograma observa-se uma redução do suporte, como na relação entre Nematogenyidae e Loricarioidea (14→13) e na relação entre Callichthyidae e Loricariidae (15→13). Entretanto, a combinação dos dados promove a ampliação do suporte em outras áreas do cladograma, como a relação entre Callichthyidae mais Loricariidae e Trichomycteridae (7→12) e a relação entre *T. areolatus* e os outros Trichomycteridae (12→17).

As topologias obtidas revelam que vários grupos encontram-se relacionados em decorrência das características ultraestruturais dos espermatozóides serem similares. No entanto, estas características na maior parte das vezes não são aparentemente exclusivas do grupo que se mostra relacionado, sendo também compartilhadas por outras espécies. Dessa maneira, o uso dos caracteres de ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides nos estudos filogenéticos da ordem Siluriformes pode ser considerado ainda incipiente. A obtenção de dados adicionais de novas espécies e principalmente de novas famílias de Siluriformes deve auxiliar no entendimento do padrão de relacionamento dentro dessa ordem e no entendimento do significado evolutivo dessa classe de caracteres.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comparação geral dos dados obtidos sobre as características ultraestruturais da espermiogênese em Loricarioidea para as famílias Trichomycteridae, Callichthyidae e Loricariidae, e para a família Cetopsidae, com as disponíveis na literatura para outras famílias de Siluriformes, revelam que o processo de espermiogênese é bastante variável no grupo. Dentro de Loricarioidea a espermiogênese observada no gênero *Trichomycterus*, da família Trichomycteridae, difere consideravelmente da descrita para os outros membros da superfamília analisados no presente estudo, mostrando-se em alguns aspectos bastante similar a espermiogênese de Diplomystidae.

Com relação a Callichthyidae e Loricariidae, observa-se que grande parte dos eventos que ocorrem, ao longo da espermiogênese, nas espécies destas famílias, são similares. Parte destes eventos também é compartilhada por Cetopsidae. Quando esses eventos são comparados com os de outros Siluriformes nota-se que eles são mais similares aos observados em Pimelodidae.

Tendo em vista as considerações feitas pode-se concluir que há, pelo menos dois tipos ou variações dos tipos I, II e III de espermiogênese já descritos, em Loricarioidea, um ocorrendo em Trichomycteridae e outro em Callichthyidae e Loricariidae.

Com relação aos dados obtidos sobre a ultraestrutura dos espermatozóides e sua comparação com os disponíveis na literatura para outras famílias de Siluriformes, observa-se que alguns caracteres dos espermatozóides apresentam altos níveis de variabilidade, até mesmo entre espécies de uma mesma família, como por exemplo, o formato do núcleo, a posição do complexo centriolar em relação à fossa nuclear, o arranjo relativo dos centríolos e o formato das mitocôndrias. No entanto, há caracteres conservados em diversos grupos como a ausência de fossa nuclear, do canal citoplasmático e de vesículas na peça intermediária e a presença de projeções laterais e compartimento membranoso nos flagelos. Como exemplo, a ausência de fossa nuclear é uma característica compartilhada por Nematogenyidae, Loricariidae, Pimelodidae e Heptapteridae. Já a ausência de vesículas na peça intermediária é uma característica do Trichomycteridae, *T. reinhardti*, e de *D. mesembrinus*, da família Diplomystidae, além de membros de outras famílias, como

Amblycipitidae, Auchenipteridae e Bagridae. A presença de projeções laterais nos flagelos é uma característica presente em todos os Trichomycteridae. A presença de flagelos com compartimento membranoso foi encontrada nos Trichomycteridae, *T. sp.* (Jacutinga) e *T. sp.* (Alambari), e no Callichthyidae, *C. flaveolus*.

De um modo geral, as descrições dos espermatozóides dos Loricarioidea somadas aos dados disponíveis na literatura para as outras famílias de Siluriformes revelam a existência de pouca similaridade, quando grupos pertencentes à famílias diferentes são comparados. Assim, entre os Loricarioidea, os espermatozóides descritos para as espécies de Trichomycteridae apresentam uma morfologia bastante peculiar. Esta morfologia difere bastante da observada na família Nematogenyidae, considerada grupo-irmão da família Trichomycteridae; como também da encontrada nos espermatozóides das famílias Callichthyidae e Loricariidae. Assim, várias características ultraestruturais encontradas nos espermatozóides dos Loricarioidea são compartilhadas pelas famílias Nematogenyidae, Callichthyidae e Loricariidae, mas não pela família Trichomycteridae, que diverge deste grupo.

Grandes similaridades são observadas quando espermatozóides de espécies de uma mesma família, pertencentes a um mesmo gênero ou até a gênero diferentes, são comparados entre si. Com relação aos Loricarioidea, isto é facilmente observado entre as espécies do gênero *Trichomycterus*, as quais compartilham muitos caracteres. Estes resultados estão de acordo com os de Baccetti *et al.* (1984) que, com base na ultraestrutura dos espermatozóides de sete espécies pertencentes à seis gêneros da família Cyprinidae (*Leuciscus*, *Rutilus*, *Alburnus*, *Chondrostoma*, *Barbus* e *Carassius*), da ordem Cypriniformes, sugeriram que a estrutura dos espermatozóides é conservada entre as espécies de uma mesma família.

Ainda que o número de descrições dos espermatozóides seja pequeno em relação ao grande número de espécies presentes na superfamília Loricarioidea, não foram reconhecidos, até o momento, caracteres exclusivos de Loricarioidea, uma vez que as características ultraestruturais encontradas nos espermatozóides dos representantes desta superfamília são compartilhadas por outros Siluriformes e também por membros da ordem Characiformes, outro grupo de Otophysi, para o qual há dados disponíveis.

As análises filogenéticas realizadas, com base neste novo conjunto de caracteres morfológicos, revelam que à medida que vão sendo somadas espécies à análise, ou seja, que se aumenta a complexidade, surgem nas topologias obtidas, áreas cada vez mais incongruentes com a hipótese atual de relacionamentos da ordem Siluriformes proposta por Britto (2003). Isto é claramente observado pelos valores do índice de consistência e de *bootstrap*, os quais diminuem consideravelmente com o aumento do número de táxons terminais presentes nas análises. Isto também é refletido no crescimento do número de cladogramas igualmente parcimoniosos obtidos nas análises. Desta forma, os caracteres que representavam sinapomorfias e conseqüentemente definiam grupos, podem ter se tornado homoplasias com o aumento da complexidade da análise, o que resultou em “ruídos” na análise filogenética, interferindo na definição das relações entre os grupos e produzindo hipóteses mal resolvidas. Além disso, a falta de uma quantidade maior de dados sobre a ultraestrutura dos espermatozóides tanto das espécies pertencentes a Loricarioidea quanto dos outros grupos de Siluriformes formam grandes lacunas de dados durante a análise, o que afeta as reconstruções filogenéticas. É possível também que a redução da acuidade nas filogenias obtidas seja decorrente das diferentes taxas de evolução encontradas entre os caracteres da ultraestrutura dos espermatozóides.

O cladograma derivado da matriz de dados combinados indica que os diferentes conjuntos de caracteres morfológicos podem ser satisfatoriamente combinados nas análises filogenéticas, uma vez que a topologia obtida é bastante congruente com a derivada apenas a partir dos caracteres osteológicos e de morfologia externa. Entretanto, a família Nematogenyidae mostra-se, neste cladograma, como grupo-irmão dos demais Loricarioidea analisados e esta relação apresenta-se bem resolvida. Tal relação entra em conflito com a hipótese mais recentemente proposta, na qual considera que Nematogenyidae é grupo-irmão de Trichomycteridae e essas duas famílias, grupo-irmão do restante dos membros da superfamília. Contudo, as características ultraestruturais do espermatozóide de *N. inermis* diferem consideravelmente das presentes nos espermatozóides dos membros de Trichomycteridae, o que é condizente com a relação verificada na filogenia de dados combinados.

Com base na comparação dos valores do índice de decaimento obtidos com os dados combinados e com os dados osteológicos e de morfologia externa apenas, observa-se que o índice de decaimento apresentou-se reduzido em alguns nós, o que indica que houve uma redução do número de transformações suportando o clado, sugerindo, portanto, a ocorrência de homoplasias. Em outros nós o índice de decaimento manteve-se com o mesmo valor, indicando que não houve alteração no número trnasformações de caracteres suportando o clado. Já em outros nós o índice de decaimento apresentou-se ampliado, mostrando que os caracteres de ultraestrutura reforçaram o suporte para esses clados. Embora tenha sido observada a redução do número de transformações que suportam alguns nós, os resultados obtidos sugerem que em análises filogenéticas, a utilização dos caracteres da ultraestrutura dos espermatozóides combinados a outros morfológicos pode promover uma melhora no suporte de relações previamente propostas ou ainda na resolução de hipóteses pouco esclarecidas de relações de parentesco entre diferentes grupos.

Assim, os estudos filogenéticos realizados com base na ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides revelam que é possível que este novo conjunto de caracteres morfológicos possa ser satisfatoriamente utilizado nos estudos das relações de parentesco entre os grupos de Siluriformes. No entanto, para melhorar a resolução das reconstruções filogenéticas conduzidas com este tipo de dado, é preciso que um número maior de espécies da superfamília Loricarioidea tenha seus espermatozóides descritos, bem como de outras espécies da ordem Siluriformes. Assim, será possível conhecer a real extensão da variabilidade da estrutura dos espermatozóides entre os Siluriformes e o quanto esta reflete as relações entre os constituintes de Loricarioidea, bem como entre estes e os Siluriformes como um todo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R.M. Structure and function in catfish. **J. Zool.**, v.148, p.88-152, 1965.

AMANZE, D.; YVENGAR, A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. **Development**, v.109, p.495-500, 1900.

AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 2002. 156p.

ARRATIA, G. *et al.* **Catfishes**. 2 volumes, Plymouth: Science Publishers, 2003. 844 p.

BACCETTI, B. *et al.* Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. **Gamete Research**, v.10, p. 373-96, 1984.

BRITTO, M.R. **Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi)**. 2003. 512p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

BURGESS, W.E. **An Atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of Siluriformes**. United States: T.F.H. Publications, 1989. 784p.

BURNS, J.R. *et al.* Sperm modifications in inseminating Ostariophysan fishes, with new documentation of inseminating species. In: 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 2000. **Proceedings** ... Bergen, 2000. p. 255.

BURNS, J.R. *et al.* Sperm and spermatocyte ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae). **Copeia**, v.1, p. 173-79, 2002.

DIOGO, R. Higher-level phylogeny of Siluriformes – an overview. In: ARRATIA, G. *et al.* (Eds). **Catfishes**. 2 volumes, Plymouth: Science Publishers, 2003. 844 p.

EMEL'YANOVA, N.G.; MAKEYEVA, A.P. Morphology of the gametes of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Voprosy Ikhtiologii**, v.31, n.1, p.143-48, 1991.

EMEL'YANOVA, N.G.; MAKEYEVA, A.P. Ultrastructure of spermatozooids of some representative catfishes. **Journal of Ichthyology**, v.32, n.4, p.127-34, 1992.

ESCHMEYER, W.N. **Catalog of fishes**. v. 3. California: Academy of Science, 1998. 2905p.

FÁVARO, L.F.; CHAVES, P.T.C. Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus* cf. *tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó I (Londrina, PR, Brasil). **Acta Biol. Par.**, v.28, n.1-4, p.125-39, 1999.

FERRARIS, C. J. Catfishes and knifefishes. In: Paxton, J.R.; Eschmeyer, W.N. (Eds). **Encyclopedia of fishes**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 106-12.

FERRARIS, C. J.; de PINNA, M.C. Higher-level names for catfishes (Actinopterygii: Ostariophysi: Siluriformes). **Proc. Calif. Acad. Sci.**, v.51, p.1-17, 1999.

FERRARIS, C. J. Family Loricariidae: subfamily Neoplecostominae (armored catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003a. p.319-20.

FERRARIS, C. J. Family Loricariidae: subfamily Loricariinae (armored catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003b. p.330-50.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zool. J. Linn. Soc. Lond.**, v.72, n. 297-353, 1981.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: STIASSNY, M.L.J.; PARENTI, L.R.; JOHNSON, G.D. (Eds). **Interrelationships of fishes**. San Diego: Academic Press, 1996. p.209-49.

FISCH-MULLER, S. Family Loricariidae: subfamily Ancistrinae (armored catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.373-400.

FRANZÈN, Å. (1970). Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. In: Baccetti, B. (Ed). **Comparative Spermatology**. New York: Academic Press, 1970. p. 29-45.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética – CNPq, 1992. 631p.

GRIER, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Amer. Zool.**, v.21, p.345-57, 1981.

GRIER, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Eds). **The Sertoli cell**. Clearwater: Cache River Press, 1993. p.704-39.

GRIER, H.J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: 53rd Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2002. **Proceedings ...** Mississippi, 2002. p. 539-52.

GUSMÃO-POMPIANI, P. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da ordem Characiformes, família Characidae (Teleostei, Ostariophysi): uma abordagem filogenética**. 2003. 86p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, São Paulo.

HENNIG, W. (1966). **Phylogenetics systematics**. Illinois: University of Illinois Press, 1966. 263p.

JAMIESON, B.G.M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 319p.

KIM, K.H.; LEE, Y.H. The ultrastructure of spermatozoa of ussurian bullhead, *Leiocassis ussuriensis* (Teleostei, Siluriformes, Bagridae). **Korean J. of Limnol.**, v. 33, n.4, p.405-12, 2000.

KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **J. Morphol.**, v.254, p.292-311, 2002.

KWON, A.S.; KIM, K.H.; LEE, Y.H. Ultrastructure of spermatozoa in the catfish, *Silurus asotus*. **Development Reproduction**, v.2, n.1, p.75-80, 1998.

LAUDER, G.V.; LIEM, K.F. The evolution and interrelationships of the Actinopterygian fishes. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, v. 150,n.3, p.95-197, 1983.

LE GAC, F; LOIR, M. Male Reproductive System , Fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press. 1999. p.20-30.

LEE, Y. H.; KIM, K.H. Ultrastructure of the south torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis* (Teleostei, Siluriformes, Ambloplitidae) spermatozoon. **Korean J. Limnol.**, v.32, n.3, p.271-80, 1999.

LEE, Y. H. Ultrastructure of spermatozoa in the bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* (Teleostei, Siluriformes, Bagridae). **Korean J. Electron Microsc.**, v.28, n.1, p.39-48, 1998.

LEE, Y. H.; KIM, K.H. The ultrastructure of spermatozoa of the slender catfish, *Silurus microdorsalis* (Teleostei, Siluriformes, Siluridae). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.33, n.3, p.329-36, 2001.

LO NOSTRO, F.L. *et al.* Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**, v.35, p.121-32, 2003.

LUNDBERG, J.G.; LITTMANN, M.W. Family Pimelodidae (long-whiskered catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.432-46.

MACHADO, F.A.; SAZIMA, I. Comportamento alimentar do peixe hematófago *Branchioica bertonii* (Siluriformes, Trichomycteridae). **Ciência e Cultura**, v.35, n.3, p.344-48, 1982.

- MAGGESE, M.C.; CUKIER, M.; CUSSAC, V.E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae). Sperm induced by media of different salinities. **Rev. Bras. Biol.**, v.44, p.541-46, 1984.
- MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A. The spermatozoon of the african catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. **J. Fish Biol.**, v.60, p.545-60, 2002.
- MATOS, E. *et al.* Estrutura fina do espermatozóide *Acestrorhynchus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. **Rev. Brasil. Zool.**, v.17, p.747-52, 2000.
- MATTEI, X. The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biol. Cell**, v.63, p.151-58, 1988.
- MATTEI, X. Spermiogénese comparé des poisson. In: Baccetti, B. (Ed). **Comparative Spermatology**. New York: Academic Press, 1970. p. 57-72.
- MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.**, v.69, p.3038-55, 1991.
- MATTEI, X. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. **J. Fish Biol.**, v.43, p.931-37, 1993.

MATTEI, X. Unusual midpiece in the spermatozoon of a teleost fish, *Citharinus* sp.. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.27, n.2, p.189-91, 1995.

MENEZES, R.S. Incubação labial de ovos pelo macho de *Loricaria typus* Bleeker, da Lagoa do Peixe, Piauí, Brasil (Actinopterygii, Loricariidae, Loricariinae). **Rev. Bras. Biol.**, v.9, n.3, p.381-87, 1949.

MIURA, T. Spermatogenetic cycle in fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press. 1999. p.571-78.

MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. Testicular structure and semicystic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). **Acta Zool.**, v.83, p.213-19, 2002.

NAKATANI, K. *et al.* **Ovos e larvas de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333p.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 600p.

de PINNA, M.C.C.. **Higher-level phylogeny of Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi), with a new classification of the order.** 1993. 482p. Unpublished Ph.D. Dissertation. University of New York, New York.

de PINNA, M.C.C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L.R. *et al.* (Eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 279-330.

de PINNA, M.C.C. Family Nematogenyidae (mountain catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.268-69.

de PINNA, M.C. C.; WOSIACKI, W. Family Trichomycteridae (pencil or parasitic catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.270-90.

POIRIER, G.R.; NICHOLSON, N. Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **J. Ultrastr. Res.**, v.80, p.104-10, 1982.

PRUZSINSZKY, I.; LADICH, F. Sound production and reproductive behaviour of the armoured catfish *Corydoras paleatus* (Callichthyidae). **Env. Biol. of Fishes**, v.53, p.183-91, 1998.

PUDNEY, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Eds). **The Sertoli cell**. Clearwater: Cache River Press, 1993. p.612-57.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v.32, p.459-97, 1995.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CARVALHO, E. D. Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.32, p.654-59, 2000.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermatozoa ultrastructure in Heptapteridae (Teleostei, Siluriformes). In: XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, 2001. **Proceedings ...** Águas de Lindóia, 2001. p.231.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C.; GOSZTONYI, A.E. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. **J. Fish Biol.**, v.58, p.1623-32, 2001.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I. *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, n.1 p.35-45, 2003.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Spermatozoa ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae (Siluriformes, Ostariophysi). **J. Fish Biol.** (submetido).

REIS, R.E. Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: a review of the available data. In: MALABARBA, L.R. *et al.* (Eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 351-62.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742p.

REIS, R.E. Family Callichthyidae (armored catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742p.

ROMÁN-VALENCIA, C. Ecología trófica y reproductiva de *Trichomycterus caliense* y *Astroblepus cyclopus* (Pisces: Siluriformes) em el río Quindio, Alto Cauca, Colômbia. **Rev. Biol. Trop.**, v.49, n.2, p.657-66, 2001.

SABAJ, M.H.; ARMBRUSTER, J.W.; PAGE, L.M. Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v.10, n.3, p.217-29, 1999.

SALISBURY, B.A. **SEPAL - Strongest Evidence and Parsimony Analyzer**. Version 1.4. Department of Ecology and Evolutionary Biology, Yale University, New Haven. Distributed by the author, 2001.

- SANTOS, J.E. *et al.* Morphofuntional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). **Tissue & Cell**, v.33, n.5, p.533-40, 2001.
- SAVAGE, J.M. Systematics and the biodiversity crisis. **BioScience**, v.45, p.673-79, 1995.
- SAZIMA, I.; MACHADO, F.A.; ZUANON, J. Natural history of *Scoloplax empousa* (Scoloplacidae), a minute spiny catfish from the Pantanal wetlands in western Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v.11, n.1, p.89-95, 2000.
- SCHAEFER, S.A.; WEITZMAN, S. H.; BRITSKI, H. A. Review of the neotropical catfish genus *Scoloplax* (Pisces: Loricarioidea: Scoloplacidae) with comments on reductive characters in phylogenetic analysis. **Proc. Academy Natural Sciences Philadelphia**, v.141, p.181-211, 1989.
- SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 375-400.
- SCHAEFER, S.A. Family Scoloplacidae (spiny dwarf catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003a. p.310-11.

SCHAEFER, S.A. Family Astroblepidae (naked sucker-mouth catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003b. p.312-17.

SCHAEFER, S.A. Family Loricariidae: subfamily Hypoptopomatinae (armored catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003c. p.321-29.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética. Um guia prático**. 2.ed. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 114p.

SWOFFORD, D.L. *et al.* Phylogenetic inference. In: Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K. (Eds). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p.407-514.

SWOFFORD, D.L. **PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Version 4.0b10. Massachusetts: Sinauer Associates. 2002.

TEIXEIRA, R.D. **Análise filogenética da família Teiidae (Squamata, Reptilia), a ultra-estrutura de espermatozóide e sua utilidade filogenética**. 2003. 206p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

TEUGELS, G.G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. **Aquat. Living Resour.**, v.9, p.9-34, 1996.

THIELE, K. The holy grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. **Cladistics**, v. 9, p.275-304, 1993.

VARI, R.P., MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: MALABARBA, L.R. *et al.* (Eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 1-11.

WEBER, C. Family Loricariidae: subfamily Hypostominae (armored catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.351-372.

8. APÊNDICE

8.1. Apêndice 1: manuscrito submetido

“COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ULTRASTRUCTURE OF SPERMATOOZOA IN NEMATOGENYIDAE AND TRICHOMYCTERIDAE (TELEOSTEI, SILURIFORMES, LORICARIOIDEA)”

Maria Angélica Spadella^{1,2}

Claudio Oliveira¹

Irani Quagio-Grassiotto¹

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil - CP 510, CEP 18.618.000.

² Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil – CP 6109, CEP 13.084-971.

Running headline: Ultrastructure of fish spermatozoa

¹ Fax: +14 3811 6264; Tel.: +14 3811 6264; E-mail: morfologia@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Spermatozoal ultrastructure in *Nematogenys inermis* (Nematogenyidae), *Trichomycterus* aff. *iheringi* and *T. areolatus* (Trichomycteridae) was analyzed. The data obtained were also compared with those available on Siluriformes. In *N. inermis* spermatozoa the nucleus is semi-ovoid while in *Trichomycterus* it is spherical. In both, chromatin is homogeneous, highly condensed and interspersed with electron-lucent areas. The nuclear fossa, absent in *N. inermis*, is of the moderate type in *Trichomycterus*. While *N. inermis* has a very short cytoplasmic canal, in *Trichomycterus* the cytoplasmic canal is of medium length. In *N. inermis*, the midpiece is large and radially symmetric, and of medium length. In contrast, in *Trichomycterus*, the midpiece is narrow and of medium length, and may vary from asymmetric to symmetric. The mitochondria, in *N. inermis*, are numerous, long and ramified, and fill almost the entire length of the midpiece, whereas in *Trichomycterus* they are few, elongate and sparse. There are many vesicles, interconnected or not, located at the periphery and surrounding the entire midpiece in *N. inermis*. In *Trichomycterus*, besides the peripheral region, the vesicles are also sparsely spread in the midpiece. Spermatozoa are biflagellate in *N. inermis* and uniflagellate in *Trichomycterus*. In both groups, the flagellum contains the classical axoneme (9+2). Although no lateral projections or fins are observed in *N. inermis*, *Trichomycterus* flagella show a variable number of lateral projections, which may be short or long. A general analysis of the spermatozoa revealed many differences between *N. inermis* and *Trichomycterus*, that are sister-groups, while in both *Trichomycterus* species, spermatozoa were more similar.

KEY WORDS: Fish evolution, catfish, sperm, spermatozoon, morphology.

INTRODUCTION

Siluriformes comprise an extremely large group of fish that is widely distributed across the tropical regions of the world (Burgess, 1989; Teugels, 1996; Ferraris, 1998). This order is included in the superorder Ostariophysi, a fish group that contains about three quarters of the freshwater fish of the world (Nelson, 1994). No consensus on the number of Siluriformes families has been reached to date. Thus, the number of families belonging to this order is 34, according to Nelson (1994); 29, according to Ferraris (1998); and 33,

according to Teugels (1996) and Eschmeyer (1998). The number of Siluriformes species known is around 2,600. However, it may exceed 3,000 (Burgess, 1989; Nelson, 1994; Teugels, 1996; Ferraris, 1998). Its great ecological and evolutionary diversity makes it the subject of a large number of studies (Fink & Fink, 1996; de Pinna, 1998). Among the neotropical Siluriformes lineages likely to be monophyletic, we find the superfamily Loricarioidea (de Pinna, 1998) that comprises six families: Nematogenyidae (1 species), Trichomycteridae (about 200 species), Callichthyidae (about 180 species), Scoloplacidae (4 species), Astroblepidae (about 40 species) and Loricariidae (about 600 species). The families, Nematogenyidae and Trichomycteridae, are considered to be sister groups (de Pinna, 1998).

Ultrastructural studies of fish spermatozoa have shown that characteristics of the spermatozoal structure may be phylogenetically analyzed, and thus provide important data for the elucidation of relationship patterns in several fish groups (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Although the studies by Jamieson (1991) and Mattei (1991) provide data related to spermatozoal structure in practically all large groups of fish, the spermatozoa of neotropical Siluriformes are still poorly known (Maggese *et al.*, 1984; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001).

Studies of spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in *Diplomystes mesembrinus*, member of the most primitive siluriform family, have shown that many of the characteristics found in this species are not found in other Siluriformes or other Ostariophysi groups (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001).

Since the hypotheses about relationships among Loricarioidea families as well as among Siluriformes families are based almost exclusively on osteological and anatomical features, the characterization of spermatozoa in specimens of the families Nematogenyidae and Trichomycteridae, and the comparison between the data obtained and those related to other Siluriformes, were conducted in search of new features that may be useful in the study of this order's evolution.

MATERIAL AND METHODS

The present study was conducted with two adult males of *Nematogenys inermis* (Guichenot, 1848) (Nematogenyidae) collected from the Aguas de la Gloria River, VIII Region, Aguas de la Gloria, Chile (S36°50.304'W72°55.642'); three adult males of *Trichomycterus* aff. *iheringi* (Eigenmann, 1917) (Trichomycteridae), collected from the Capivara River, Botucatu, São Paulo, Brazil (S22°53.963'W48°23.204'); and two adult males of *Trichomycterus areolatus* (Valenciennes, 1846) (Trichomycteridae) collected from the Caramávida River, VIII Region, Antigua, Cañet, Chile (S37°40.842'W73°15.997'). Fish were identified and kept at the fish collection of Laboratório de Biologia de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Gonad fragments were fixed in 2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer, pH 7.4. The material was post-fixed for 2 h in the dark in 1% osmium tetroxide in the same buffer, contrasted in block with aqueous solution of 5% uranyl acetate for 2 h, dehydrated in acetone, embedded in araldite and sectioned and stained with a saturated solution of uranyl acetate in 50% alcohol and lead citrate. Electromicrographs were obtained using a Phillips - CM 100 transmission electron microscope.

RESULTS

N. inermis spermatozoa display the head and the midpiece joined in a single structure, with no clear delimitation between them, and two flagella medial to the nucleus (Fig. 1). They show no acrosomal vesicle and a semi-ovoid nucleus, whose base is about 3µm in length, containing highly condensed homogeneous chromatin interspersed with some electron-lucent areas. In the peripheral electron-lucent areas, small chromatin clusters are observed. In the cytoplasmic region, apical to the nucleus, no organelles are seen (Figs. 1, 2). The nuclear fossa is absent. The midpiece is large, of medium length, and shows a radial symmetry to the flagellum axis (Fig. 1). Surrounding the basal region of the nucleus and filling the midpiece, a large number of very long, sometimes ramified, mitochondria are found radially arranged (Figs. 3-5). In the basolateral region of the midpiece base,

several elongate and interconnected vesicles form a membranous compartment (Figs. 5, 6). The centrioles are lateral, parallel to each other and positioned at the distal region of the midpiece. They are anchored by cytoskeletal components (Fig. 5 inset). Each centriole is differentiated into a basal body and gives rise to an axoneme exhibiting the classical 9+2 microtubular pattern. At the initial segment of the tail, the axonemes are individualized and separated from the elongated distal vesicles of the midpiece by a short cytoplasmic canal, which is apparently resultant from the accommodation and interconnection of the vesicles around the flagella. In the other segments of the tail, the axonemes are not individualized, and share the same flagellar membrane. No flagellar lateral projections or fins are present (Figs. 7-10).

In the spermatozoa of *T. aff. iheringi*, the head is ovoid with thin edges; the midpiece is of medium length, narrow and asymmetric; and there is a single flagellum eccentric to the nucleus (Fig. 11). There is no acrosomal vesicle. The spherical nucleus contains highly condensed homogeneous chromatin interspersed with some electron-lucent areas. The cytoplasm of the perinuclear region displays several elongate mitochondria and vesicles (Figs. 11-14). The nuclear fossa is of the moderate type and contains the proximal centriole, which is anterior and oblique to the distal centriole (Figs. 15, 16). The midpiece contains no more than ten elongate mitochondria, numerous vesicles and a cytoplasmic canal of medium length. The mitochondria are spread from around the nucleus to the midpiece final end, and the vesicles are mostly concentrated in the peripheral region. At the final midpiece edge, the vesicles interconnect and form a membranous compartment. Mitochondria and vesicles are separated from the flagellum by the cytoplasmic canal (Figs. 17-19). The flagellum displays a classical axoneme with a 9+2 microtubular pattern, and a variable number of lateral projections or fins, that may be either short or long (Figs. 20-22).

The spermatozoa of *T. areolatus* exhibit a spherical head; a symmetric, narrow midpiece of medium length; and one flagellum almost eccentric to the nucleus (Fig. 23). There is no acrosomal vesicle. The nucleus is spherical and contains highly condensed homogeneous chromatin with some electron-lucent areas. No organelles are observed in the cytoplasmic area apical to the nucleus (Figs. 24-26). The nuclear fossa is of the moderate type and contains the centriolar complex. The proximal centriole is lateral to the distal

centriole, forming an angle greater than 90° (Figs. 27, 28). No more than ten elongate mitochondria are randomly distributed along the entire length of the midpiece. Several vesicles interconnected or not, are found preferably in the peripheral region of the midpiece (Figs. 29-32). The cytoplasmic canal is of medium length and runs along the entire midpiece (Figs. 27, 29, 34). The distal centriole gives rise to the flagellum that exhibits the classical axoneme (9+2 microtubules), and two long lateral projections (Figs. 33, 34).

DISCUSSION

Spermatozoa of the externally fertilizing Teleostei generally have a spherical to ovoid nucleus while in the inseminating species the nucleus is frequently cone-shaped and forward elongate (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). In Nematogenyidae, the nucleus is semi-ovoid while it is spherical in Trichomycteridae and Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) as well as in Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), Bagridae (Mattei, 1991; Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000) and Mochokidae (Mattei, 1991). An ovoid nucleus is observed in Clariidae (Mansour *et al.*, 2002). Poirier & Nicholson (1982), Emel'yanova & Makeyeva (1991), and Emel'yanova & Makeyeva (1992) described the shape of the head of Ictaluridae spermatozoa as globelike or heartlike, but did not specifically mention the shape of the nucleus that, according to observation, is semi-spherical or semi-ovoid. In Mattei (1991), schematic drawings indicate that, in Ariidae and Malapteruridae spermatozoa, the nucleus is also semi-spherical. In Amblycipitidae, the nucleus is described as ovoid by Lee and Kim (1999), even though its resemblance with the nucleus of Ictaluridae is apparent at close observation. In Auchenipteridae, the cone-shaped nucleus is very elongate forward (Burns *et al.*, 2002).

The nucleus of Otophysi spermatozoa usually exhibits homogeneously condensed chromatin (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). In Nematogenyidae and Trichomycteridae, the chromatin is also homogeneously condensed and is interspersed with electron-lucent areas. The same occurs in Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), Bagridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), Ictaluridae

(Poirier & Nicholson, 1982; Emel'yanova & Makeyeva, 1991; Emel'yanova & Makeyeva, 1992), Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999) and Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002). In Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) and Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) the chromatin forms highly condensed clusters.

The position of the centriolar complex is related with the presence and shape of a nuclear fossa, a depression more or less deep in the nucleus outline that faces the midpiece. When the nuclear fossa is absent, the centriolar complex usually lies close to the nucleus. When the nuclear fossa is shallow, one of the centrioles remains partially inside it while the other lies outside. If the nuclear fossa is of the moderate type, with about one half of the nuclear diameter in length, all or part of the centriolar complex, or only one of the centrioles, may be found inside it while the other lies outside. When the nuclear fossa is deep, with more than one half of the nuclear diameter in length, the centriolar complex is found inside it. In Nematogenyidae, there is no nuclear fossa and the centrioles, or basal bodies lie far from the nucleus. In Pimelodidae, the nuclear fossa is absent in *Sorubim lima* (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000) and shallow in *Iheringichthys labrosus* (Santos *et al.*, 2001). In both these species, the centriolar complex adjoins the nucleus. In Amblycipitidae, the shallow and double-arched nuclear fossa partially contains each centriole within each arch (Lee & Kim, 1999). The same seems to occur in Ariidae and Malapteruridae (Mattei, 1991). In Ictaluridae, the nuclear fossa is also shallow and double-arched. However, there is controversy over the number of centriolar complexes found in the biflagellate *Ictalurus punctatus* spermatozoa. To Poirier and Nicholson (1982), *I. punctatus* possesses one centriolar complex with each centriole, or basal body, partially contained by the arches of the nuclear fossa whereas to Emel'yanova and Makeyeva (1991) *I. punctatus* has two centriolar complexes with only the proximal centriole inside the nuclear fossa arches. Poirier and Nicholson (1982) do not consider the existence of proximal centrioles because they believe that what is found above the distal centrioles is a "cap", a structure that does not have the typical appearance of a centriole in cross-sections. Emel'yanova and Makeyeva (1991), however, point out that in cross sections of the structures they considered to be proximal centrioles, the nine triplets of microtubules were not detected. In *T. aff. iheringi*, the nuclear fossa is of the moderate type and contains only the proximal

centriole. In *T. areolatus*, the nuclear fossa is also of the moderate type but the entire centriolar complex is found inside it, as observed in Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001) and possibly in Mochokidae and Schilbidae (Mattei, 1991). In Auchenipteridae, the moderate nuclear fossa contains the proximal centriole and part of the distal centriole (Burns *et al.*, 2002). Only in Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001) and Bagridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000) the nuclear fossa is deep and contains the entire centriolar complex.

In the centriolar complex, the proximal centriole may be anterior or lateral to the distal centriole. The centrioles are found side by side in Nematogenyidae, Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999), Ariidae (Mattei, 1991), Malapteruridae (Mattei, 1991), in the Ictaluridae, *Amiurus nebulosus* (Emel'yanova & Makeyeva, 1992), and in the Trichomycteridae, *T. areolatus*. In the Ictaluridae, *I. punctatus*, the centrioles, or basal bodies, are also found side by side, according to Poirier and Nicholson (1982), while to Emel'yanova and Makeyeva (1991) the proximal centriole is anterior to the distal centriole. In the Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, the proximal centriole is anterior to the distal centriole, as observed in Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), Bagridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), and Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002).

In the centriolar complex, the centrioles may be parallel or coaxial, or form right, acute or obtuse angles. Mansour *et al.* (2002) considers the arrangement of the centriolar complex species-specific. The centrioles are parallel in Nematogenyidae, Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999), Ariidae (Mattei, 1991), Malapteruridae (Mattei, 1991), and in the Ictaluridae, *A. nebulosus* (Emel'yanova & Makeyeva, 1992). In the Ictaluridae, *I. punctatus*, the centrioles are also parallel according to Poirier and Nicholson (1982). However, to Emel'yanova and Makeyeva (1991), the proximal centriole forms a right angle with the distal centriole. In the Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, the proximal centriole forms an obtuse angle with the distal centriole, similarly to Bagridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000). The proximal centriole forming an angle

almost greater than 90° with the distal centriole is observed in the Trichomycteridae, *T. areolatus*. In Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), and Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002), the proximal centriole forms a right angle with the distal centriole. Even though the same is observed in Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), the centrioles may also form an obtuse angle, depending on the species. In Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), the proximal centriole forms an acute angle with the distal centriole.

According to Mattei (1970), in fish spermatozoa, the flagellum axis may be parallel or perpendicular to the nucleus and these positions result from the occurrence or absence of nuclear rotation during spermiogenesis; thus characterizing spermiogenesis as I or II, respectively. Type I spermiogenesis occurs in Siluriformes; the distal centriole differentiates into a basal body and gives origin to the flagellum (Mattei, 1970). In teleosts, the flagellum is usually single (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). Mattei (1988) reports that in biflagellate spermatozoa, the centrioles are not differentiated into proximal and distal centrioles as both differentiate into basal bodies and each gives rise to a flagellum. In Nematogenyidae, spermatozoa are biflagellate, with the flagella medial to the nucleus. In Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999), Ariidae (Mattei, 1991), Malapteruridae (Mattei, 1991), and Ictaluridae (Poirier & Nicholson, 1982; Emel'yanova & Makeyeva, 1991; Emel'yanova, 1992) both flagella and the nuclear fossa are medial to the nucleus. Maggese *et al.* (1984), in a study of the physiological characteristics of *Rhamdia sapo* spermatozoa, showed Scanning Electronic Microscopy images that led Jamieson (1991) to point out the occurrence of biflagellate spermatozoa in the Pimelodidae family. To Mattei (1991), the occurrence of biflagellate spermatozoa has no phylogenetic relation, as this feature is often seen in different groups of fish. However, the high incidence of biflagellate spermatozoa in Siluriformes requires a re-evaluation of the potential phylogenetic implications of this feature. In the species of all other Siluriformes families studied, there is only one flagellum. In the Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, and in Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002), the single flagellum and the nuclear fossa are eccentric. In *T. areolatus* the single flagellum and the fossa nuclear are almost eccentric. Spermatozoa with a single flagellum medial to the

nucleus and a medial nuclear fossa are found in Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Clariidae (Mattei, 1991; Mansour *et al.*, 2002), Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), and Bagridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000). In the Pimelodidae, *S. lima* (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000) the flagellum is medial to the nucleus while in *I. labrosus* (Santos *et al.*, 2001) spermatozoa there is a single flagellum and a nuclear fossa medial to the nucleus.

In Teleostei, the midpiece is usually short and contains a small cytoplasmic canal. However, it may also be long and have a long cytoplasmic canal with or without a cytoplasmic sheath (Jamieson, 1991; Mattei, 1991). The cytoplasmic canal is formed during spermiogenesis as the centriolar complex moves toward the nucleus carrying along the plasma membrane and the initial segment of the flagellum (Mattei, 1970). In biflagellate spermatozoa, the midpiece exhibits a radial symmetry around the flagellum axis, and is of medium length in Nematogenyidae and Ictaluridae (Poirier & Nicholson, 1982; Emel'yanova & Makeyeva, 1991; Emel'yanova & Makeyeva, 1992) and short in Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999). In the families Ictaluridae and Amblycipitidae, there are two double-walled cytoplasmic canals, one for each flagellum. In Nematogenyidae, it is possible that the existing canal is a result of the accommodation and interconnection of the vesicles around the flagella instead of the movement of the centrioles toward the nucleus. As a consequence, this cytoplasmic canal is short and encircles both flagella. In Trichomycteridae, both midpiece and cytoplasmic canal are of medium length. The midpiece is asymmetric in *T. aff. iheringi*. and symmetric in *T. areolatus*. In Auchenipteridae, the midpiece is long and asymmetric, with a lateral cytoplasmic canal (Burns *et al.*, 2002). A midpiece of medium length with no cytoplasmic canal is found in Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), and Clariidae (Mansour *et al.*, 2002). In Diplomystidae, the cytoplasmic canal, formed during spermiogenesis, does not remain in the spermatozoon (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001). In Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), and Bagridae (Emel'yanova &

Makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), and apparently in Mockokidae (Mattei, 1991), the midpiece and the cytoplasmic canal are short.

The mitochondria found in Otophysi spermatozoa are generally few, small, round or elongate, grouped in the anterior third of the cytoplasmic collar, around the centriolar complex and the initial segment of the axoneme, from which they are separated by the cytoplasmic canal (Jamieson, 1991; Mattei, 1988; 1991). In Nematogenyidae, mitochondria are numerous, sometimes ramified and radially distributed in the midpiece. In Trichomycteridae, the few elongate mitochondria are distributed along the entire midpiece and are separated from the axoneme by the cytoplasmic canal. In Bagridae (Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), and Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999), few mitochondria, round to oblong, are found close to the nucleus and arranged in two or three layers around the cytoplasmic canal. In Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), mitochondria are shaped and arranged as in Bagridae and Amblycipitidae, but surround the periphery of the midpiece instead of the cytoplasmic canal. In Ictaluridae (Poirier & Nicholson, 1982; Emel'yanova & Makeyeva, 1991), the mitochondria, whose shape vary from round to oblong, are distributed at the periphery of the large midpiece, distant from the basal bodies. In Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002), several mitochondria are found along the elongate and asymmetric midpiece. In Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), the cytoplasmic canal is absent and a single and large C-shaped mitochondrion surrounds the initial segment of the axoneme. In Clariidae (Mansour *et al.*, 2002) and Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), also show no cytoplasmic canal. In Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), mitochondria are ovoid or irregular and may fuse and form a ring around the initial segment of the axoneme whereas in Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001) they vary from oblong to elongate and are located close to the nucleus around the initial segment of the axoneme. Baccetti *et al.* (1984) suggest that the number of mitochondria a species-specific characteristic that may be helpful in interspecific phylogenetic studies.

The vesicles found in Siluriformes spermatozoa may be few in number, disperse and isolated or interconnected forming a membranous compartment. Different authors have described these vesicles using terms such as tubules, cytoplasmic vesicles, cisternae, or

membranous compartments. In the midpiece of Nematogenyidae, there are several elongate vesicles of basal distribution that interconnect forming a membranous compartment and possibly the cytoplasmic canal around the flagella. In Trichomycteridae, the vesicles found preferably at the final region of the midpiece, positioned at the periphery, may or may not interconnect. The presence of several vesicles connected to each other and to the plasma membrane is observed in Ictaluridae (Poirier & Nicholson, 1982; Emel'yanova & Makeyeva, 1991) and Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001). In Clariidae (Mansour *et al.*, 2002), there is a well organized lateral vesicular system in the midpiece. In Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), the tubular vesicles are regularly distributed along the midpiece. The absence of vesicles in the midpiece is observed in Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), Bagridae (Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002) and Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999).

In most Otophysi, spermatozoa exhibit a single flagellum formed by a basic axoneme with a pair of central microtubules and nine pairs of peripheral microtubules (Jamieson, 1991; Mattei, 1988; 1991). In some species, the flagellum may display intratubular differentiations and lateral expansions of variable length, denominated lateral projections or fins. While no lateral projections are found in the flagellum of most Siluriformes, such as Nematogenyidae, they may be present in some groups. In Diplomystidae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), spermatozoa display two lateral projections, as observed in Bagridae (Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), Amblycipitiidae (Lee & Kim, 1999) and Trichomycteridae. Lateral projections are short in Diplomystidae, short or long in the Trichomycteridae, *T. aff. iheringi*, and long in Bagridae and in the Trichomycteridae, *T. areolatus*. Jamieson (1991) suggested that the superorder Otophysi is unified by a clear synapomorphic loss of the flagellar fins. However, new data on Siluriformes show that this feature varies a lot within the group.

To date, the spermatozoa of 23 species and 12 families of Siluriformes have been described. For 12 species, there are good descriptions and photodocumentation whereas for the remainder, just some schematic drawings of spermatozoal morphology or some images within a broader context related to reproduction are available. This number of descriptions

is very small in comparison with the number of species and families of this order and limits a general discussion about the evolution of these characteristics in the group. However, a general analysis of the data available on the different spermatozoal structures found in Siluriformes did not reveal the existence of the similarities expected among related groups. Thus, in the families Nematogenyidae and Trichomycteridae, that form a monophyletic group (de Pinna, 1998), it is observed that the only characteristic that they have in common is the presence of a nucleus containing highly condensed homogeneous chromatin interspersed with electron-lucent areas. This characteristic, however, is also observed in Pimelodidae (Quagio-Grassiotto & Carvalho, 2000; Santos *et al.*, 2001), Siluridae (Emel'yanova & Makeyeva, 1992; Kwon *et al.*, 1998; Lee & Kim, 2001), Bagridae (Emel'yanova & makeyeva, 1992; Lee, 1998; Kim & Lee, 2000), Auchenipteridae (Burns *et al.*, 2002), Ictaluridae (Poirier & Nicholson, 1982; Emel'yanova & Makeyeva, 1991) and Amblycipitidae (Lee & Kim, 1999) suggesting that it is widely shared among Siluriformes.

By comparing the two species of *Trichomycterus* herein studied, similarities in spermatozoal structure are observed. Baccetti *et al.* (1984), based on the analysis of 7 species belonging to 6 genera of Cyprinidae (*Leuciscus*, *Rutilus*, *Alburnus*, *Chondrostoma*, *Barbus* and *Carassius*) of Cypriniformes, family Cyprinidae, suggested that the spermatozoal structure is quite conserved among species of a same family. Therefore, the characterization of such structure may be very useful in the identification of interfamilial relationship patterns. In conclusion, to know the extension of the variability in spermatozoal structure among Siluriformes, new, further and broader studies, including more families and a significant number of species per family, are required.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Cesar Cuevas for his help during collection expeditions, to Mário C. C. de Pinna for the taxonomic identification of the species, and to E.M. Laboratory of IBB-UNESP for allowing the use of their facilities. This research was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

- Baccetti, B., Burrini, A. G., Callaini, G., Gilbepertini, G., Mazzini, M. e Zerunian, S. (1984). Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research* 10: 373-396.
- Burgess, W.E. (1989). An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Burns, J.R., Meisner A.D., Weitzman, S.H., Malabarba, L.R. (2002). Sperm and spermatocyte ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae). *Copeia* 1: 173-179.
- Emel'yanova, N.G., Makeyeva, A.P. (1991). Morphology of the gametes of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Voprosy Iktiologii* 31(1): 143-148.
- Emel'yanova, N.G., Makeyeva, A.P. (1992). Ultrastructure of spermatozooids of some representative catfishes. *Journal of Ichthyology* 32(4): 127-134.
- Eschmeyer, W.N. (1998). *Catalog of fishes*. Vol. 3. California Academy of Science, California.
- Ferraris, C. J. (1998). Catfishes and knifefishes. In: *Encyclopedia of fishes* (Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., 2a. ed.), pp. 106-112. San Diego: Academic Press.
- Fink, S.V. & Fink, W.L. (1996). Interrelationships the Ostariophysian fishes (Teleostei). In: *Interrelationships of fishes*. pp. 209-245. San Diego: Academic Press.
- Jamieson, B.G.M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kim, K.H., Lee, Y.H. (2000). The ultrastructure of spermatozoa of ussurian bullhead, *Leiocassis ussuriensis* (Teleostei, Siluriformes, Bagridae). *Korean Journal of Limnology* 33(4), 405-412.
- Kwon, A.S., Kim, K.H., Lee, Y.H. (1998). Ultrastructure of spermatozoa in the catfish, *Silurus asotus*. *Development Reproduction* 2(1): 75-80.
- Lee, Y. H. (1998). Ultrastructure of spermatozoa in the bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* (Teleostei, Siluriformes, Bagridae). *Korean Society of Electron Microscopy* 28(1): 39-48.

- Lee, Y. H., Kim, K.H. (1999). Ultrastructure of the south torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis* (Teleostei, Siluriformes, Amblycipitidae) spermatozoon. *Korean Journal of Limnology* 32(3), 271-280.
- Lee, Y. H., Kim, K.H. (2001). The ultrastructure of spermatozoa of the slender catfish, *Silurus microdorsalis* (Teleostei, Siluriformes, Siluridae). *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* 33(3): 329-336.
- Maggese, M.C., Cukier, M., Cussac, V.E. (1984). Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae). Sperm induced by media of different salinities. *Revista Brasileira Biologia* 44 (4): 541-546.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. (2002). The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behavior in seminal vesicle secretion. *Journal of Fish Biology*. 60: 545-560.doi: 10.1006/jfbi.2002.1869.
- Mattei, X. (1970). Spermiogénese comparé des poisson. In: *Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.), pp. 57-72. New York: Academic Press.
- Mattei, X. (1988). The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. *Biology of the Cell* 63: 151-158.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 69: 3038-3055.
- Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the World*. 3rd edn., New York: John Wiley and Sons
- de Pinna, M.C.C. (1998). Phylogenetic relationship of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overviews and synthesis of hypotheses. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S. e Lucena, C.A.S., eds), pp.279-330. Porto Alegre: Edipucrs.
- Poirier, G.R., Nicholson, N. (1982). Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Ultrastructure Research* 80: 104-110.
- Quagio-Grassiotto, I., Carvalho, E.D. (2000). Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* 32(4): 629-633.

- Quagio-Grassiotto, I., Oliveira, C., Gosztonyi, E. (2001). The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. *Journal of Fish Biology* 58: 1623-1632.
- Santos, J.E., Bazzoli, N., Rizzo, E., Santos, G.B. (2001). Morphofuncional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue & Cell* 33(5): 533-540.
- Teugels, G.G. (1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. *Aquatic Living Resource* 9: 9-34.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. *N. inermis* spermatozoon. B: basal body; E: electron-lucent areas; F: flagellum; N: nucleus; V: vesicles; ✱: mitochondria; ★: chromatin clusters. X17.000.

Figures 2 and 3. Head of *N. inermis* spermatozoon (cross sections). N: nucleus; ★: chromatin clusters. X17.000; X13.600.

Figures 4-6. Midpiece region of *N. inermis* spermatozoon (cross sections). B: basal body; F: flagellum; V: vesicles; ✱: mitochondria; arrow: cytoplasmic channel. X17.000; X18.400; X18.400.

Figure 5 – Inset. Detail of centrioles fix. B: basal body; arrow: cytoskeletal components. X20.400.

Figures 7 and 8. Individualized and associated axonemes of *N. inermis* spermatozoon flagella (longitudinal sections). A: axoneme; L: plasmic membrane. X23.000; X17.000.

Figures 9 and 10. Individualized and associated axonemes of *N. inermis* spermatozoon flagella (cross sections). A: axoneme; L: plasmic membrane. X15.600; X15.600.

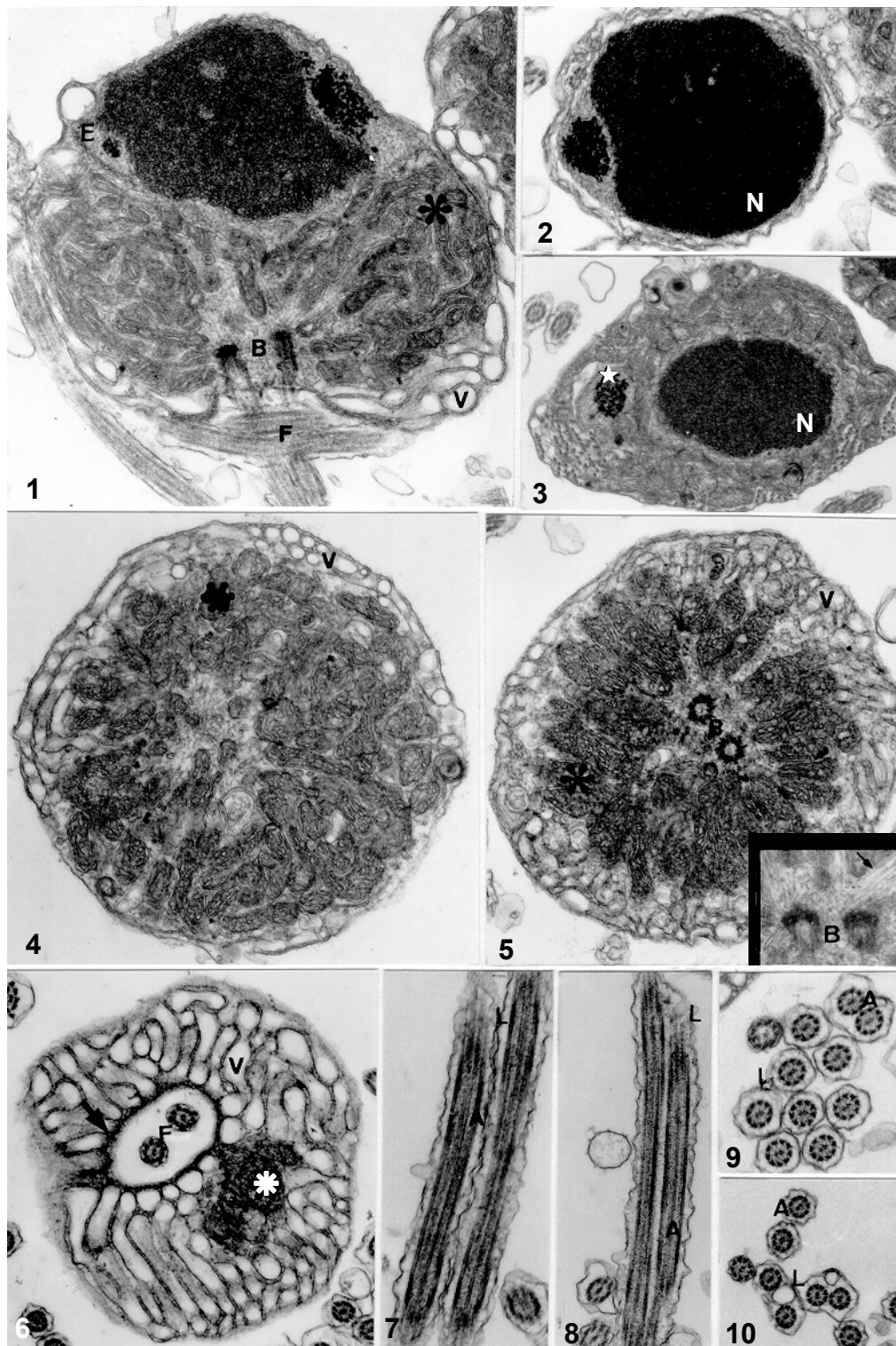


FIGURE CAPTIONS

Figure 11. *Trichomycterus* aff. *iheringi* spermatozoon. B: basal body; F: flagellum; N: nucleus; V: vesicles; *: mitochondria. X23.000.

Figures 12 and 14. Head region of *T.* aff. *iheringi* spermatozoon (cross sections). E: electron-lucent areas; N: nucleus; V: vesicles; *: mitochondria. X13.250; X13.250, X17.000.

Figures 15 and 16. Detail of nuclear fossa and centriolar complex of *T.* aff. *iheringi* spermatozoon. C: centriolar complex; E: electron-lucent areas; N: nucleus; *: mitochondria. X23.000; X42.000.

Figures 17-19. Midpiece of *T.* aff. *iheringi* spermatozoon. B: basal body; F: flagellum; N: nucleus; V: vesicles; *: mitochondria; arrow: cytoplasmic channel. X28.350, X23.000, X13.250.

Figures 20-22: Flagellum *T.* aff. *iheringi* spermatozoon (cross and longitudinal sections). A: axoneme; arrowhead: lateral projections. X42.000, X17.000.

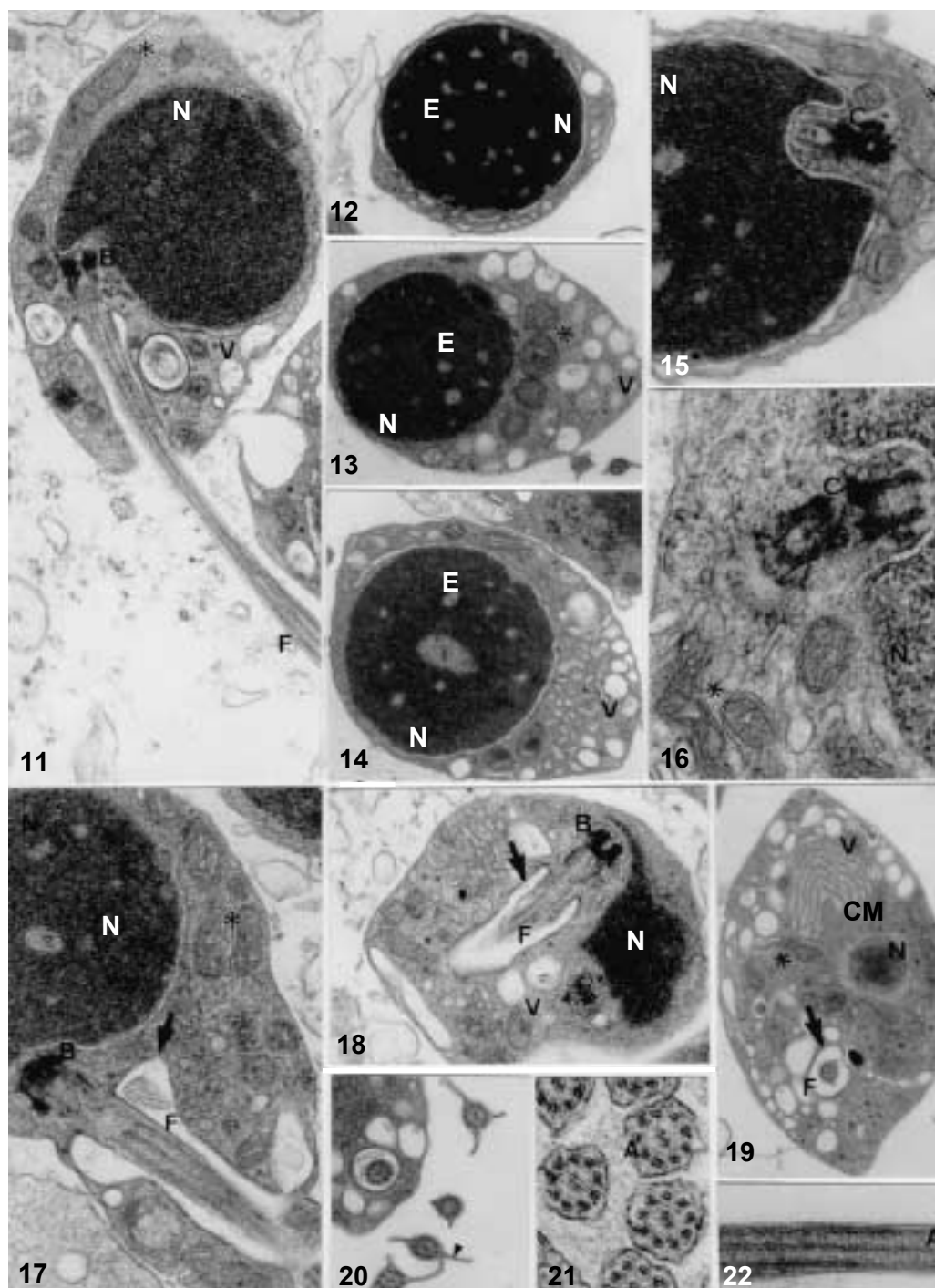


FIGURE CAPTIONS

Figure 23. *Trichomycterus areolatus* spermatozoon. B: basal body; E: electron-lucent areas; F: flagellum; N: nucleus; V: vesicles. X9750.

Figures 24-26. Head region of *T. areolatus* spermatozoon (cross sections). E: electron-lucent areas; N: nucleus; P: proximal centriole; V: vesicles; *: mitochondria. X25.200; X22.050; X18.400.

Figures 27 and 28. Detail of nuclear fossa and centriolar complex arrangement of *T. areolatus* spermatozoon. C: centriolar complex; F: flagellum; N: nucleus; V: vesicles; *: mitochondria; seta: cytoplasmic channel. X23.000; X23.000.

Figures 29-32. Midpiece of *T. areolatus* spermatozoon. C: centriolar complex; D: distal centriole; E: areas electron-lucent; F: flagellum; N: nucleus; V: vesicles; *: mitochondria; seta: cytoplasmic channel. X17.000; X18.400; X17.000; X22.100.

Figures 33 and 34. Flagellum of *T. areolatus* spermatozoon (cross and longitudinal sections). A: axoneme; N: nucleus; seta: cytoplasmic channel; arrowhead: lateral projections. X27.600; X23.800.

