

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**MARCELLA COSTA RADAEL**

***Melanotaenia boesemani* (Allen & Cross, 1982): ASPECTOS REPRODUTIVOS E  
ONTOGENÉTICOS**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**2014**

**MARCELLA COSTA RADAEL**

***Melanotaenia boesemani* (Allen & Cross, 1982): ASPECTOS REPRODUTIVOS E  
ONTOGENÉTICOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de *Doctor Science* em Ciência Animal.

**Orientador: Dalcio Ricardo de Andrade**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**2014**

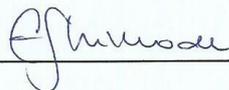
MARCELLA COSTA RADAEL

***Melanotaenia boesemani* (Allen & Cross, 1982): ASPECTOS REPRODUTIVOS E ONTOGENÉTICOS**

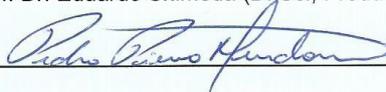
Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de *Doctor Science* em Ciência Animal.

Aprovada em 11 de junho de 2014.

**Comissão Examinadora:**



Prof. Dr. Eduardo Shimoda (D. Sc., Produção Animal) – UCAM



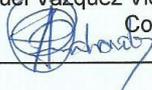
Prof. Dr. Pedro Pierro Mendonça (D. Sc., Ciência Animal) – IFES



Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira (D. Sc., Produção Animal) – UENF



Prof. Dr. Manuel Vazquez Vidal Junior (D. Sc., Zootecnia) – UENF  
Co-Orientador



Prof. Dr. Dalcio Ricardo de Andrade (D. Sc., Morfologia) – UENF  
Orientador

*Aos meus pais, Stair e Dalgiza que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre nos deram a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.*

*À Matheus por me ajudar a não desistir dos meus sonhos e objetivos.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e pessoal, portanto, agradeço:

- 🐟 À Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.
- 🐟 Aos meus pais Stair e Dalgiza, que sempre me incentivaram, que me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência e são meus exemplos de conduta.
- 🐟 À minha irmã Mariana, pela amizade, apoio, incentivo, carinho e atenção sempre dispensados a mim. E ao meu cunhado Doniseli pela disposição em ajudar sempre que foi necessário.
- 🐟 À minha querida família: tios, tias, primas e primos, em especial aos meus amados avós Wilson, Maria Augusta e Nilda por compreenderem minha constante ausência em momentos importantes e mesmo assim, continuarem a me incentivar.
- 🐟 Ao Matheus, pelo companheirismo, amor, paciência e incentivo constantes. Pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza. Pelo amparo nos momentos mais difíceis (que não foram raros neste último ano) e por toda a felicidade que me proporciona por te ter ao meu lado.
- 🐟 Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando, mesmo estando às vezes, distantes fisicamente. De forma especial, agradeço às amigas: Natty, Bebeth, Marize e Tatiana pelos excelentes momentos de convivência, pelas intermináveis risadas (e choros) compartilhadas, por todo o apoio nos momentos difíceis... vocês com certeza foram responsáveis por tornar essa trajetória mais agradável.
- 🐟 Ao Sr. José Clóvis, D. Lucia, Rodolpho, Lucyana e Olívia, por serem minha segunda família e por terem me acolhido com tanto carinho.
- 🐟 Ao professor Dalcio, meu orientador, pela confiança em mim depositada, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação e pelas experiências acadêmico-científicas que, certamente, serão de grande valia em minha carreira.

-  Ao professor Manuel, co-orientador, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, por contribuir para o meu crescimento profissional, pela ajuda na execução dos experimentos, ensinamentos e, sobretudo, pela amizade.
-  Aos colegas da piscicultura: Leonardo, Douglas, Jonas, João (little John), João (Peção), Paulo, Samuel, Gilmar, André, Rafael, Rafaele, Ticiane, Ana Paula e Layra, pela agradável convivência. Aos “meninos” da ontogenia, pela indispensável ajuda na execução do experimento. Pelos momentos de descontração e pelas boas risadas durante o trabalho.
-  Ao professor Edésio José Tenório de Mello e as colegas Lara Meneguelli e Cristiane Vergílio pela ajuda na histologia.
-  Aos colegas do Setor de Anatomia Patológica do LSA-UENF, Luciano, Beth, Ricardo e Luciana, pelo acolhimento e ensinamentos.
-  Às funcionárias da coordenação do programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Jovana e Conceição, pela atenção e paciência.
-  Ao funcionário de setor de Piscicultura, Sr. Jorge, por toda ajuda no decorrer desses anos e também por atenção que sempre teve comigo.
-  Aos professores da Pós Graduação em Ciência Animal pela convivência e ensinamentos.
-  Aos professores Eduardo Shimoda, Pedro Pierrro Mendonça e Leonardo Serafim da Silveira, por participarem da banca examinadora, por todas as sugestões e críticas fundamentais à complementação desse trabalho.
-  À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.
-  À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização do curso, crescimento pessoal e profissional.
-  Consciente de que seria impossível listar todas as pessoas importantes nesse momento, agradeço a todos aqueles que mesmo não tendo sido nominados tive a oportunidade de conviver e que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

"Existem pessoas que tornam nossa caminhada mais significativa... pela companhia, pelo apoio... pelo carinho... e porque nos tornam melhores!

Obrigada a todos que me ajudaram ao longo dessa caminhada!!!

“Ninguém gosta de pedir muito da vida porque tem medo da derrota. Mas quem deseja realizar um sonho, tem que olhar o mundo como se fosse um tesouro imenso, que está ali a espera que seja descoberto e conquistado.”

Paulo Coelho

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Gangada e a Pedra)

## RESUMO

**RADAEL, Marcella Costa, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Junho de 2014; *Melanotaenia boesemani* (Allen & Cross, 1982): Aspectos reprodutivos e ontogenéticos. Orientador: Professor Dalcio Ricardo de Andrade.**

O objetivo do estudo foi descrever a biologia reprodutiva de fêmeas e o desenvolvimento embrionário de *Melanotaenia boesemani*. Estudos relacionados à reprodução foram realizados através de análises do tecido germinativo ovariano de *Melanotaenia boesemani*. As gônadas foram emblocadas em parafina e os cortes corados com hematoxilina-eosina, para análises histológicas que permitiram descrever os tipos celulares encontrados e realizar a classificação do estágio de maturidade dos animais. Macroscopicamente, foi identificado que a espécie possui um único ovário, arredondado e na fase observada, amarelado, localizado na parte látero-anterior da cavidade celomática. As fêmeas observadas foram classificadas na escala de desenvolvimento gonadal como maduro/em reprodução. Nos ovócitos vitelogênicos deste peixe foi constatado a presença de filamentos de adesão ovocitária ancorados à zona pelúcida. Os ovários apresentaram aspecto morfológico geral semelhante ao de outros peixes teleósteos, o tipo de desova classificado como intermitente e o padrão de desenvolvimento de ovócitos como assincrônico. Acerca da ontogenia inicial, foi caracterizado o desenvolvimento embrionário e a influência que a incubação em temperaturas diferentes acarreta no embrião. Os ovos foram mantidos em incubadoras a 23, 26, 29 ou 32°C e observados, em horários pré-determinados, até o momento de eclosão. As fases de desenvolvimento foram identificadas e classificadas de acordo com características morfofisiológicas. O desenvolvimento embrionário foi similar ao observado em outras espécies do gênero *Melanotaenia*. A primeira eclosão ocorreu às 107,15 horas pós fertilização (HPF) na incubadora de 32°C e a última às 342,30 HPF na incubadora de 23°C, sendo o melhor índice de eclosão de 57,3% na temperatura de incubação de 29°C.

**Palavras – chave:** Reprodução, gônadas, desenvolvimento embrionário, temperatura.

## ABSTRACT

**RADAEL , Marcella Costa , D.Sc. , Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro ; June 2014 ; *Melanotaenia boesemani* ( Allen and Cross , 1982) : reproductive and ontogenetic aspects. Advisor: Professor Dalcio Ricardo de Andrade.**

The aim of this study was to understand the reproductive biology of *Melanotaenia boesemani* and embryonic development this specie. Related to reproduction studies were conducted through assay of ovarian germ tissue *Melanotaenia boesemani*. The gonads were embedded in paraffin and sections stained with hematoxylin-eosin for histological analyzes permitted to describe the cell types found and perform the classification of the stage of maturity of the animals. Macroscopically, it was identified that the species has a single ovary, rounded and phase observed, yellowish, located on the anterior part of the coelomic cavity. Females observed were classified on scale of gonadal development as mature/in reproduction. In vitellogenic oocytes of this fish was observed the presence of filaments anchored to the oocyte pellucid zone adhesion. The ovaries showed overall morphological appearance similar to other teleost fishes, spawning type classified as intermittent and pattern of development of oocytes as asynchronous. Regarding early ontogeny, embryonic development was characterized, and the influence that incubation at different temperatures causes the embryo. After fertilization, the eggs were kept in incubators at 23, 26, 29 or 32°C and observed at pre-determined times, until the time of hatching. Stages of development were identified and classified according to morphological and physiological characteristics. Embryonic development was similar to that observed in other species of the genus *Melanotaenia*. The first hatching occurred 107.15 hpf in the incubator at 32 °C and the last at 342.30 hpf in the incubator at 23 °C being the best hatching index of 57.3% in the incubation temperature of 29 °C.

**Keywords:** Reproduction, gonad, embryonic development, temperature.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

<b>Figura 1</b> – Macho adulto de <i>Melanotaenia boesemani</i> .....	15
<b>Figura 2</b> – Fêmea adulta de <i>Melanotaenia boesemani</i> .....	16

### Capítulo 1

<b>Figura 1</b> - Localização e detalhe do ovário de <i>M. boesemani</i> .....	54
<b>Figura 2</b> - Lamela ovulígera com tipos ovocitários de <i>M. boesemani</i> .....	54
<b>Figura 3</b> - Valores médios do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) dos ovócitos em diferentes fases de maturação de <i>M. boesemani</i> .....	55
<b>Figura 4</b> – Tipos ovocitários de <i>M. boesemani</i> .....	55
<b>Figura 5</b> – Filamentos de adesão .....	56
<b>Figura 6</b> – Marcas de desova .....	56
<b>Figura 7</b> – Folículo vazio .....	57

### Capítulo 2

<b>Figura 1</b> – Cronologia dos eventos e estágios embrionários de <i>M. boesemani</i> em horas pós-fecundação, incubados a 23°C, 26°C, 29°C ou 32°C.....	75
<b>Figura 2</b> – Etapas do período de clivagem de <i>M. boesemani</i> .....	76
<b>Figura 3</b> – Etapas do período de organogênese de <i>M. boesemani</i> .....	77
<b>Figura 4</b> – Larvas recém-eclodidas de <i>M. boesemani</i> .....	78

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Cronologia dos eventos e estágios embrionários de *Melanotaenia boesemani* em horas pós-fecundação, incubados a 23°C, 26°C, 29°C ou 32°C. .... 73

**Tabela 2** – Correlação entre os eventos ontogenéticos no desenvolvimento embrionário de *Melanotaenia boesemani*. ..... 74

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVOS .....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1. A espécie .....	13
3.2. Ciclo reprodutivo de peixes .....	16
3.3. Histologia de gônadas .....	18
3.4. Fecundidade por desova .....	19
3.5. Desenvolvimento embrionário .....	22
3.6. Influência da Temperatura na Ontogenia .....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
5. CAPÍTULO 1 .....	35
Descrição morfológica do ovário do peixe ornamental <i>Melanotaenia boesemani</i> em atividade reprodutiva .....	36
Resumo .....	36
Introdução .....	36
Material e Métodos .....	38
Resultados .....	39
Discussão .....	43
Conclusão .....	47
Agradecimentos .....	47
Referências .....	48
6. CAPÍTULO 2 .....	58
Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário do peixe <i>Melanotaenia boesemani</i> (Allen e Cross, 1982) .....	59
Resumo .....	59

Introdução.....	59
Material e métodos.....	60
Resultados.....	62
Discussão .....	67
Agradecimentos.....	70
Referências .....	70
7. CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura pode ser definida como sendo o cultivo de organismos que possuem o ciclo de vida total ou parcialmente aquático, dentre os quais estão os peixes, anfíbios, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas (IBAMA, 1997). Dentro da aquicultura, a piscicultura é um setor de bastante destaque.

O início da piscicultura se deu quando o homem passou a capturar e translocar peixes para ambientes de confinamento. No Brasil, o início da piscicultura data da década de 1920, quando peixes destinados ao consumo foram introduzidos no país (VIDAL JUNIOR, 2002). Já a piscicultura ornamental, que, em geral, envolve peixes em sua maioria de pequeno porte com particularidades anatômicas e cromáticas peculiares, surgiu no Brasil na década de 40 e hoje é um agronegócio que envolve cerca de 4.000 produtores rurais e urbanos.

O ramo da piscicultura destinado aos peixes ornamentais destaca-se da piscicultura de corte, se comparado o valor agregado em que um único exemplar pode alcançar várias vezes o valor de um quilo de peixe alimento. (LIMA, 2004). Assim, a piscicultura ornamental ganhou espaço entre os produtores rurais, uma vez que permite um rápido retorno econômico em uma pequena área, possibilitando o ingresso de pequenos produtores na atividade (VIDAL JUNIOR, 2002).

Porém, devido à difícil competição com a pesca extrativista que ainda consegue lançar no mercado peixes com valor menor que os cultivados, a

piscicultura ornamental brasileira tem utilizado grande número de espécies exóticas que permitem um maior retorno à atividade, pois escapa da competição desigual com o extrativismo.

Dentre essas espécies exóticas, têm-se dado bastante atenção aos exemplares da família *Melanotaeniidae*, conhecidos popularmente como melanotênias. Estes integram um grupo de coloridos e valiosos peixes ornamentais originários da Austrália e Nova Guiné, onde o clima tropical é predominante, o que facilitou a adaptação no Brasil e às condições de cultivo nacional, sendo importados e cultivados no país desde a década de 90, obtendo excelente aceitação no mercado de peixes ornamentais.

O período entre a desova e a comercialização das melanotênias está em torno de seis meses. Em relação a algumas espécies de ornamentais produzidas em cativeiro, esse é um período considerado de médio a longo. Este fato está relacionado ao aparecimento das características sexuais secundárias, que irão determinar o momento mais seguro para a sexagem dos animais e, conseqüentemente, sua comercialização. A sexagem nessa família é importante devido ao dimorfismo sexual apresentado pela grande maioria das espécies que torna o mercado mais promissor para os machos, que apresentam maior coloração em relação às fêmeas.

Dentre os vários representantes da família *Melanoteniidae*, uma espécie que desperta bastante atenção é a *Melanotaenia boesemani*, conhecida popularmente como arco-íris boesemani, devido a sua coloração acentuada, em especial, no macho que apresenta a região anterior (da cabeça até aproximadamente a metade do animal) em tom azulado e a região posterior em acentuados tons de laranja e amarelo.

Apesar da coloração exuberante do macho, nessa espécie a fêmea também é bastante valorizada, pois as fêmeas mais velhas tem coloração bastante similar aos machos à exceção dos dominantes. A melanotênia boesemani tem se destacado como um dos exemplares mais populares no aquarismo entre os membros da família *Melanoteniidae*.

A despeito da importância econômica e da disseminação no cultivo das espécies deste grupo, poucos esforços de investigação têm sido realizados. Para a maioria das espécies não se obteve dados sobre a reprodução, o desenvolvimento

embrionário e a larvicultura. Assim, diante desta lacuna, os produtores rurais utilizam tecnologias de cultivo desenvolvidas para espécies diversas, o que geralmente resulta em baixa produtividade e elevada mortalidade nos sistemas de cultivo. Em especial, na larvicultura, visto que a grande maioria de trabalhos realizados é com larvas altriciais e, portanto, as metodologias de cultivo utilizadas advêm desses trabalhos, não sendo totalmente adequadas às larvas precociais como as de *M. boesemani*.

Diante de seu grande potencial de produção e alto valor de mercado, estudos a respeito desta espécie se tornam cada vez mais relevantes, em especial àqueles concernentes à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval da espécie, visto que essas são áreas que quando bem delineadas podem ocasionar melhorias na taxa de sobrevivência do plantel, aumentando assim, a eficiência da produção.

## 2. OBJETIVOS

### ❖ *Objetivo Geral:*

- ✓ Descrever a morfologia do sistema reprodutor feminino e as etapas iniciais do desenvolvimento de *Melanotaenia boesemani*.

### ❖ *Objetivos Específicos:*

- ✓ Caracterizar as células da linhagem reprodutiva feminina, bem como a estrutura geral do ovário de *M. boesemani*.
- ✓ Caracterizar o desenvolvimento ontogenético inicial quanto ao efeito da temperatura no tempo de surgimento das principais estruturas e eventos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A espécie

O grupo das melanotênias, família *Melanotaeniidae*, possui sete gêneros com 66 espécies descritas (McGUIGUAN et al., 2000; ALLEN et al., 2002), sendo encontradas em várias condições ecológicas, lacustres, da Austrália e Nova Guiné (ALLEN, 1991). São consideradas espécies forrageiras, tendo, portanto, importante participação na cadeia trófica do ambiente que habitam (LLEWELLYN, 1971, citado por REID & HOLDWAY, 1995).

Os animais da Família *Melanotaeniidae* apresentam corpo coberto de escamas grandes com formato fusiforme e comprido lateralmente. As nadadeiras posteriores são pouco desenvolvidas, mas alongadas, o que permite que sejam excelentes e rápidos nadadores. A nadadeira dorsal é dupla (vestígio de sua origem marinha). A nadadeira anal se estende desde a região pélvica até a região caudal (ALLEN & CROSS, 1980).

Quanto à desova, os melanotenídeos, em geral, têm fecundação e desenvolvimento embrionários externos, com liberação simultânea dos gametas femininos e masculinos. Em seu habitat original, o período reprodutivo ocorre durante os meses de outubro a dezembro, entretanto quando em condições controladas de laboratório ou de sistemas de cultivo, podem desovar durante o ano inteiro, semelhante ao descrito para *Glossolepis incisus* (KIRTLEY, 1986).

Os *rainbowfishes*, como são conhecidos os peixes dessa família, utilizam como substrato para ovoposição raízes de plantas flutuantes, onde os ovos ficam aderidos. As desovas ocorrem sobre plantas de folhas finas (tipo *ceratopteris*, cabombas, *myriophyllum*, *ambulias*, musgo de java etc.) ou fibras sintéticas (TAYLOR, 1999). Os ovos são pequenos e têm adesividade, ficando aderidos às plantas e substratos. Essa adesividade ocorre devido a filamentos de fixação presentes no córion (REID & HOLDWAY, 1995; HUMPHREY et al., 2003).

A *Melanotaenia boesemani*, alvo desse estudo, é originária do lago Ayamaru, Península de Vogelkop, Irian Jaya, na Indonésia, que tem como características da água temperatura média de 24,8°C; pH 7,24; e condutividade de 252 mS (KADARUSMAN et al., 2010). Foi assim nomeada em homenagem ao biólogo Dr. Marinus Boeseman, que foi o coletor dos espécimes tipo no dia 04 de março do ano de 1955 (ALLEN & CROSS, 1980). O nome nativo para esta espécie é "Sekiak" e "Ikan rascado" (RAINBOWFISH, 2014). Esses peixes pertencem à classe dos Actinopterygii (peixes com raios nas barbatanas), ordem Atheriniformes (FISHBASE, 2014).

São peixes bentopelágicos de água doce que têm a faixa de pH ideal para sobrevivência entre 6,0 a 8,0. Possuem de 5 a 7 espinhos dorsais, de 10 a 14 raios dorsais, 1 espinho anal e de 17 a 23 raios anais (FISHBASE, 2014).

O conteúdo intestinal indica que a dieta em ambiente natural é composta principalmente de pequenos insetos, algas e crustáceos em menor quantidade (ALLEN & CROSS, 1980).

O padrão de coloração do macho de *melanotênia boesemani* é diferenciado da maioria dos outros animais da família por apresentar, quando sexualmente maduro, uma coloração bem definida dividindo o peixe pela metade. Dessa forma, a parte frontal da cabeça e do corpo é em cinza azulado brilhante, às vezes quase preta e as barbatanas e a metade posterior do corpo em grande parte laranja-avermelhado (Fig.1). Sua coloração selvagem pode desaparecer um pouco em cativeiro, possivelmente devido à falta de algum fator da dieta do habitat natural (RAINBOWFISH, 2014).



Figura 1 - Macho adulto de *Melanotaenia boesemani*

Os machos são facilmente distinguidos das fêmeas pela diferença de coloração e pelo formato mais alongado e comprido dos raios da barbatana dorsal. Podem atingir até 12 cm de comprimento, mas, em geral, não ultrapassam 10 cm. As fêmeas exibem uma ampla faixa lateral escura acompanhada de uma série de listras longitudinais estreitas amarelas ou laranja-avermelhado (Fig. 2), variando de acordo com o ambiente e estado fisiológico do animal. Quando maduras, muitas vezes apresentam coloração semelhante aos machos subordinados, mas o corpo é, em geral, mais longilíneo e com as bordas mais arredondadas (RAINBOWFISH, 2014).

O desenvolvimento de gônadas em *M. boesemani* já é evidente em espécimes do sexo feminino com apenas 3,4 cm e em animais a partir de 4 cm já parecem ser totalmente funcionais (ALLEN & CROSS, 1980).

Desde sua introdução no aquarismo, que segundo registros iniciou-se após uma expedição em novembro de 1982, a melanotênia boesemani tem aumentado sua popularidade e, hoje, pode ser considerada como o *rainbowfish* mais popular neste hobby (RAINBOWFISH, 2014).



Figura 2 - Fêmea adulta de *Melanotaenia boesemani*

### **3.2. Ciclo reprodutivo de peixes**

Peixes, em sua maioria, apresentam reprodução cíclica que corresponde a um período de repouso, intercalado por períodos de atividade sexual, que finalizam com o surgimento de nova prole. No período de repouso, as gônadas estão com tamanho reduzido, contendo apenas células gametogênicas em fases iniciais de desenvolvimento. Com o progresso do ciclo, elas acumulam espermatozoides ou ovócitos vitelogênicos até alcançar o pico no momento da reprodução. Em razão do acúmulo dessas células, as gônadas sofrem mudanças radicais em sua constituição, alterando sua aparência e peso (GODINHO, 2007).

Esse desenvolvimento gonadal ocorre durante a puberdade que é descrita como o período de desenvolvimento que vai da transição de um juvenil imaturo, até um estágio adulto, com sistema reprodutor maduro. Os componentes centrais desse sistema são as gônadas e o sistema endócrino, que controla a atividade gonadal, através do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (MURGAS et al., 2009).

Os processos reprodutivos, em geral, proporcionam ritmos endógenos disparados por sinais ambientais e, dessa forma, o período de reprodução se dá numa época favorável ao desenvolvimento de larvas e alevinos. A maturidade sexual varia de acordo com a espécie, podendo ocorrer desde o primeiro ano de vida, como na maioria dos teleósteos, num período intermediário ou até mesmo depois de mais de 15 anos de vida juvenil (*Anguilla Anguilla*), e, da mesma forma, o tipo de desova é variável (BALDISSEROTTO, 2009).

As variações ambientais bióticas e abióticas (disponibilidade de alimento, densidade populacional, predadores, foto período, temperatura, e também a qualidade da água e certos poluentes) estão envolvidas no período de puberdade, com a importância relativa de cada fator variando nos diferentes teleósteos (KUO et al., 1974).

Dos fatores ambientais que exercem influência na reprodução de peixes, temperatura e fotoperíodo são um dos mais importantes, sendo as alterações substanciais que eles podem provocar nas condições físico-químicas da água, um potencial indutor das desovas (QUEROL et al., 2004).

Estes fatores unem-se aos hipofisiotrópicos e ao sistema neuroendócrino (hipotálamo e/ou diretamente na hipófise ou nas gônadas), induzindo mudanças na atividade do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal. O desenvolvimento das gônadas acontece quando o peixe atinge a maturidade sexual, que ocorre em momentos diferentes tanto entre espécies, quanto entre os sexos (ZANIBONI-FILHO & WEINGARTNER, 2007).

A idade da primeira maturação sexual varia muito entre os teleósteos em função da espécie e do meio ambiente. O processo de maturação gonadal nos peixes é bastante elaborado, com alta exigência de energia. Entretanto, a redução da ingestão de alimentos é um evento natural no ciclo biológico dos peixes, como na migração para a desova (MACKENZIE et al., 1998).

O ciclo reprodutivo dos peixes teleósteos apresenta uma estreita relação com as variações de temperatura e com o regime de chuvas (BARBIERI et al., 2000; GODINHO, 2007), sendo o sincronismo entre as condições endógenas e exógenas do meio ambiente importante fator na liberação dos gametas (ZANIBONI-FILHO & WEINGARTNER, 2007).

Os processos reprodutivos geralmente apresentam ritmos endógenos disparados por sinais ambientais, de modo a encaixar o período da reprodução em uma época ambiental favorável ao desenvolvimento das larvas e juvenis (BALDISSEROTTO, 2009).

### **3.3. Histologia de gônadas**

Muitos aspectos da reprodução de peixes, como tamanho à primeira maturação, tipo de desova, duração e período de desova e estimativas de fecundidade, necessitam do conhecimento dos estádios de desenvolvimento gonadal, sendo necessário, para tal, a utilização da histologia, uma vez que as análises macroscópicas não apresentam exatidão dos resultados, em especial quando não se conhece ainda a dinâmica reprodutiva da espécie (SANTOS, 2006).

Embora em um primeiro momento a análise macroscópica tenha sua vantagem por apresentar resultados imediatos, por outro lado, pode ter sérias desvantagens porque essa análise leva em consideração características facilmente alteráveis, quer seja pelo processo de conservação das gônadas ou dos exemplares a serem processados, ou porque incorpora a individualidade do pesquisador na observação e reconhecimento das características consideradas, podendo, com isso, resultar em erros na avaliação e classificação das gônadas (SANTOS, 2006).

O estudo histológico da gametogênese é uma das etapas iniciais do processo de aprendizagem para compreender os processos reprodutivos da ictiofauna (GARCIA et al., 2001). Reconhece-se, então, que a análise histológica, embora exija tempo e recursos para sua execução, permite conhecer as características das funções das gônadas e estimar com confiabilidade as diferentes fases do ciclo gonadal e reprodutivo de qualquer espécie (WEST, 1990; DIAS et al., 1998).

Para estudos histológicos gonadais em peixes, em geral, é adotado o processo de descrição do ciclo reprodutivo com coletas realizadas durante pelo menos 12 meses, para que, desta forma, se possa descrever com maior precisão o funcionamento do processo de recrutamento de gametas de determinada espécie, contudo, pesquisas em que apenas a estrutura da gônada é descrita também são realizadas (ANDRADE, 1990).

De modo geral, utiliza-se descrição por classificação de grupos celulares visualizados. Para tal, são adotados diversos métodos histológicos de rotina, dentre os quais os mais utilizados são inclusão em parafina ou historesina, sendo a última mais utilizada quando se trabalha com gônadas em tamanhos diminutos ou quando é necessário realizar cortes histológicos com menor espessura (MUMFORD, 2007).

Os fixadores utilizados com maior frequência para gônadas são: formol tamponado 10%, líquido de Bouin e Karnovsky, ambos apresentando bons resultados (MUMFORD, 2007).

Com relação à coloração, vê-se como mais adotados a hematoxilina-eosina (HE), o azul de toluidina, o Alcian Blue e o Periodic Acid Schiff (PAS), entre outros. O corante, em geral, está relacionado com o método adotado para inclusão e também com o tipo celular que se deseja evidenciar (MUMFORD, 2007).

### **3.4. Fecundidade por desova**

A reprodução constitui parte fundamental da vida dos seres vivos, portanto, estudos sobre reprodução são importantes para entender o ciclo de vida das espécies, principalmente a fim de estabelecer políticas de manejo de recursos pesqueiros e preservação das espécies. Nos peixes, existe, além das outras células germinativas em desenvolvimento, uma fonte renovável e contínua de ovócitos a partir do epitélio folicular, o que explicaria o incremento nos valores absolutos da fecundidade com o crescimento. Assim, a cada desova um número maior de células permanece nos ovários, aumentando o estoque de ovócitos neoformados (VAZZOLER, 1996).

Segundo descrição de Crepaldi (2006), as classificações macro e microscópica dos diferentes estádios de maturação são variáveis de acordo com diferentes autores. Tal variação é inerente às metodologias empregadas, refletindo em maior ou menor número de subdivisões. Basicamente, todas as classificações dos estádios de desenvolvimento gonadal seguem uma escala universal, modificada de acordo com as características específicas para cada grupo de espécies: estágio imaturo ou jovem, repouso, maduro, reprodução e reproduzido. Barbieri e Santos (1988) classificam o desenvolvimento ovariano em três estádios; já Teles e Godinho (1997) em até seis; Andrade (1990) classificou em repouso, maturação (inicial, intermediária e avançada) e desovado/espermiado.

A fecundidade, o período e o tipo de desova são características específicas essenciais para a manutenção de qualquer espécie de peixe. O tipo de desova nos peixes é determinado pela interação entre a dinâmica do desenvolvimento

ovocitário, a frequência de desovas dentro de um período de reprodução e o número desses períodos durante sua vida (VAZZOLER, 1996).

Para que as matrizes apresentem uma desova de boa qualidade, é necessário que se tenha alguns cuidados no cultivo, incluindo: as condições em que os reprodutores são mantidos; a qualidade de água; a alimentação e a frequência de manejo. Esses fatores influenciam diretamente na qualidade da desova, visto que afetam, fortemente, o desenvolvimento gonadal. Principalmente durante a fase de vitelogênese, de modo que limitação na qualidade ou quantidade do alimento, alta densidade de estocagem e estresse podem provocar a reabsorção de ovócitos vitelogênicos, resultando num menor número de ovócitos maduros, ou ainda, podem atuar numa fase anterior, impedindo o início da vitelogênese (HARVEY; CAROLSFELD, 1993).

O conhecimento das variáveis reprodutivas entre as espécies, tais como sinalização pelas fêmeas do momento da desova, fertilidades inicial e final por grama de peso corporal dos reprodutores, adesividade do ovo, presença do órgão adesivo larval e realização ou não de movimento vertical na coluna d'água pela larva mostraram ter aplicação prática na piscicultura, podendo auxiliar no manejo de reprodutores, ovos, larvas e pós-larvas e nas estimativas de produção nas várias etapas do processo (SATO, 1999).

Os peixes são conhecidos pela elevada fecundidade, devido à maioria de as espécies liberarem centenas a milhões de ovócitos anualmente. A estabilidade populacional, considerando-se inicialmente desovas anuais igualmente intensas, raramente é atingida, e os números aumentam e diminuem conforme a pressão dos fatores abióticos (NAKATANI et al., 2001).

Em geral, a fecundidade pode ser expressa por duas maneiras, relativa ou absoluta. A fecundidade relativa é o número de ovócitos por unidade de comprimento ou peso (VAZZOLER, 1981). A fecundidade relativa, calculada em relação ao peso corporal ou ao comprimento total, é um valor indicativo da capacidade reprodutiva individual de peixes (SHATUNOVSKIY, 1988). O número de ovócitos que completam seu desenvolvimento e são eventualmente eliminados por fêmea de uma dada espécie durante o período reprodutivo é considerado como sendo fecundidade absoluta (NIKOLSKY, 1963).

De acordo com Vazzoler (1996), estimativas de fecundidade exigem análises quanto à distribuição de frequência de diâmetros de ovócitos intra-ovários e à anatomia microscópica dos ovários. A estimativa da fecundidade em peixes com desova parcelada, feita com base em análises macroscópicas, torna-se complexa devido à dificuldade de se distinguir ovócitos de reserva daqueles ovócitos em desenvolvimento (BAGENAL, 1978). Assim, a fecundidade poderá ser estimada de modo mais consistente por meio de métodos volumétricos (VAZZOLER, 1981), gravimétricos ou estereométricos (ISAAC-NAHUM et al., 1988).

Para a fecundidade, o tamanho do animal é de extrema importância, pois, maior tamanho acarreta em maior fecundidade e, assim, em maior sucesso reprodutivo (CONOVER, 1984; VAZZOLER, 1996). A fecundidade aumenta proporcionalmente aos incrementos em peso e comprimento, então quanto maior a fêmea, mais ovócitos serão produzidos (LOWE-MCCONNELL, 1999).

A fecundidade sofre influência do volume da cavidade celomática para abrigar o ovário maduro e do tamanho dos ovócitos, esta cavidade varia com o tamanho da fêmea e, portanto, aumenta em função do seu crescimento e está mais relacionado ao comprimento do espécime do que à sua idade (VAZZOLER, 1996). Na fase final de desenvolvimento os ovócitos maduros podem apresentar tamanhos bastante diferentes entre as espécies (BRAZ DE ARAÚJO, 2009).

Os ovos podem ser liberados ou depositados no substrato, em ninhos, guardados pelos pais ou ainda carregados (BALON, 1984). A fecundidade é inversamente proporcional ao grau de cuidados parentais (LAGLER et al., 1977).

Apesar de o processo reprodutivo ser um dos aspectos mais estudados dentro do ciclo de vida dos peixes, o volume de informações disponíveis torna-se bastante reduzido quando são comparados o número de espécies existentes e o número daquelas sobre as quais existem conhecimentos sobre algumas táticas reprodutivas como desova e fecundidade. (BRAZ DE ARAÚJO, 2009).

O conhecimento da biologia da reprodução nos peixes fornece subsídios para o desenvolvimento das técnicas reprodutivas, porém ainda necessita-se de mais pesquisas nas áreas de manejo de reprodutores, indução de desova e preservação dos estoques naturais, propiciando, assim, uma maior eficiência na produção de alevinos. (CREPALDI et al., 2006).

### **3.5. Desenvolvimento embrionário**

A ontogenia inicial em peixes caracteriza-se por uma série de importantes mudanças em estrutura e função, reflexo da rápida evolução morfológica, fisiológica e de hábitos e comportamentos pelos quais passam embriões, larvas e juvenis durante o início do seu desenvolvimento (BALON, 1984; BLAXTER, 1986; NOAKES & GODIN, 1988).

Os estudos ontogênicos fornecem informações sobre a fisiologia embrionária, sendo importantes para a conservação da ictiofauna e para o aprimoramento das técnicas de cultivo (GODINHO et al., 2003). A descrição dos estágios embrionários dos teleósteos contribui para a avaliação precisa do seu desenvolvimento (SENHORINI, 1993).

O estudo do desenvolvimento inicial em peixes é uma ferramenta importante nos sistemas de produção, tanto de peixes de corte como ornamentais, pois fornece informações sobre o tipo de manejo que pode ou deve ser aplicado, ajudando a responder questões críticas como, por exemplo: quais as variáveis físicas, químicas ou biológicas que afetam ou podem afetar os processos de desenvolvimento embrionário e larval; qual é o momento (horas após fertilização – HPF) mais adequado para se determinar as taxas de fertilização e sobrevivência durante incubação e larvicultura controladas, dentre outros (CLAVIJO-AYALA, 2008).

O processo embrionário inicia-se com fecundação do óvulo pelo espermatozoide através da micrópila (NAKATANI et al., 2001). A absorção de água que ocorre após a fertilização, provoca a formação do espaço perivitelino mediante a separação do córion da membrana vitelina. Após a entrada do gameta masculino no óvulo, este é estimulado e reage, passando a apresentar um intenso movimento citoplasmático, em direção ao pólo superior do ovo. Desta maneira, o vitelo fica segregado do citoplasma ativo, permanecendo na parte inferior do ovo, que se transforma em pólo vegetativo. O núcleo, formado pela união dos pronúcleos masculino e feminino, mais o citoplasma que se deslocou, constituem o pólo animal (SANTOS & AZOUBEL, 1996).

Por apresentarem o vitelo concentrado no pólo vegetativo e o citoplasma com suas organelas no disco germinativo, que constitui o pólo animal, os ovos de peixes são denominados telolécitos. Devido à grande quantidade de vitelo que possuem,

são classificados como polilécitos e apresentam segmentação parcial ou meroblástica. Esse vitelo irá nutrir o embrião durante a embriogênese e também a larva por algum tempo após a eclosão (SANTOS & AZOUBEL, 1996).

Os eventos morfofisiológicos avaliados ao longo do desenvolvimento embrionário são geralmente observados com o auxílio de um microscópio estereoscópio ou óptico, visto que, normalmente, o córion dos ovos das espécies estudadas é translúcido. (GODINHO et al., 1978; NAKATANI et al., 2001; SOUZA, 2004).

Os eventos morfofisiológicos comumente observados ao longo das avaliações ontogênicas em embriões ictiológicos são: a formação e clivagem do blastodisco; a evolução da blástula e da gástrula sobre a vesícula vitelínica (pólo vegetal); a diferenciação do eixo embrionário, da vesícula óptica, dos somitos, o surgimento da vesícula de Kuppfer e de melanóforos e a eclosão (FUJIMOTO et al., 2006). O tempo de surgimento dessas estruturas varia de acordo com a espécie e pode ser influenciado por diversos fatores como, por exemplo, a temperatura (LUZ, 2001).

Estes eventos foram também citados na descrição do desenvolvimento embrionário de algumas espécies de melanotênias e os autores citam, inclusive, serem poucos os estudos referentes à descrição do desenvolvimento embrionário e larval destes peixes (REID & HOLDWAY, 1995; HUMPHREY et al., 2003; FERREIRA, 2007; RADAEL et al., 2013).

Para que ocorra a eclosão, o córion deve ser enfraquecido mediante a ação de enzimas e a movimentação mais ativa do embrião (BLAXTER, 1988). A eclosão acontecerá após sucessivas e fortes contrações musculares da cauda e do corpo do embrião (NAKATANI et al., 2001).

A maioria das larvas de água doce eclode com boca e mandíbula ainda não formadas, os olhos não pigmentados e saco vitelino grande. No período pós eclosão, em geral, poucos melanóforos são visualizados e a larva é muito transparente. Algumas espécies, porém, eclodem com o sistema alimentar inicialmente funcional e com olhos pigmentados (NAKATANI et al., 2001).

O grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende da espécie considerada e do período de incubação, além de este fator estar relacionado à temperatura (BLAXTER, 1988).

Estudos morfométricos dos ovos e larvas de peixes são uma ferramenta extremamente valiosa, sobretudo para a taxonomia. A grande semelhança morfológica entre diferentes grupos taxonômicos foi o principal obstáculo à identificação de larvas, principalmente larvas coletadas no ambiente natural. Análises morfométricas permitem comparar as diferentes fases de desenvolvimento dentro e entre espécies e, em conjunto com outras características, permite a identificação correta das larvas (SANCHES et al., 1999).

### **3.6. Influência da Temperatura na Ontogenia**

Por serem os peixes animais pecilotérmicos, é sabido que a sua temperatura de criação interfere fortemente no seu crescimento e desenvolvimento (ARITAKI & SEIKAI, 2004). Tanto a organogênese como o desenvolvimento somático são controlados por enzimas. O desenvolvimento embrionário de animais como os peixes depende essencialmente da expressão diferencial de certos genes e da temperatura (OJANGUREN & BRANA, 2003).

A temperatura interfere em diversas etapas de desenvolvimento dos animais, e estas interferências foram demonstradas em diversas pesquisas. Os efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento gonadal de *Periophthalmus modestus* foram examinados por análises histológicas e endocrinológicas. Os resultados mostraram que vitelogênese e espermatogênese foram induzidas pelo tratamento de alta temperatura (30°C). Enquanto o desenvolvimento gonadal não ocorreu no tratamento de baixa temperatura (18°C). Estes resultados sugerem que um aumento na temperatura desempenha um papel importante no desenvolvimento gonadal destes peixes (SHIOTA et al., 2003).

Na maioria dos teleósteos marinhos com estágios iniciais de vida planctônicos e falta de cuidados parentais, os embriões e as larvas são caracterizados por uma baixa capacidade funcional no que diz respeito à visão, natação e olfato e pela incapacidade de alimentação total (KENTOURI, 1985; KOUMOUNDOUROS et al., 1998; GLUCKMANN et al., 1999).

Nestas fases, a temperatura é a determinante mais importante do ambiente, não apenas da duração destes estágios ontogênicos vulneráveis, mas também para uma variedade de características importantes, tais como o tamanho ao nascimento e

início do período de alimentação (POLO et al., 1991; KOUMOUNDOUROS et al., 2001).

A magnitude e direção dos efeitos temperatura não dependem apenas da espécie, mas também do estágio de desenvolvimento com as diferentes fases de vida dos peixes, apresentando diferentes requisitos de temperatura e de resistência (HERZIG & WINKLER, 1986). A percepção do papel da temperatura no início da ontogenia em peixes é extremamente importante para a compreensão da distribuição de ovos e larvas, da dinâmica e dos mecanismos de adaptação no meio ambiente marinho variável (KLIMOGIANNI et al., 2004).

Em diferentes espécies de teleósteos, a temperatura influencia no desenvolvimento das células musculares do embrião, na incubação e nas etapas subsequentes do desenvolvimento (NATHANAILIDES et al., 1995; AYALA et al., 2001), sendo, portanto, um fator importante a ser pesquisado.

A influência mais significativa da temperatura nos parâmetros fisiológicos dos peixes pode ser no tempo de desenvolvimento (BLAXTER, 1992). Lo (1985) já havia proposto que as taxas de desenvolvimento dos peixes são uma exponencial mista em função da temperatura e estágio de desenvolvimento do animal. O tempo requerido para o desenvolvimento embrionário em cada espécie de peixe é intimamente relacionado com a temperatura (SAMPAIO et al., 2004).

Em robalo, a utilização de uma temperatura ligeiramente superior durante o seu curto período de incubação teve um efeito positivo sobre o desenvolvimento muscular larval, que foi observado após 37-50 dias pós-eclosão (AYALA et al., 2000). Pesquisas realizadas com *Pseudopleuronectes herzensteini* sugerem que a temperatura de criação influencia não apenas no crescimento e desenvolvimento larval, mas também na ocorrência de metamorfose relacionadas com anormalidades morfológicas em juvenis (ARITAKI & SEIKAI, 2004).

Em *Melanotaenia praecox*, verificou-se que a temperatura de incubação dos ovos, embora não tenha afetado significativamente no tempo de eclosão das larvas, teve influência no tempo de diferenciação celular e organogênese, bem como na porcentagem de eclosão dos animais, sendo a temperatura de 27,43°C a mais indicada para o processo de desenvolvimento embrionário da espécie (RADAEL, 2010).

Em embriões de *Pterophyllum scalare* incubados em diferentes temperaturas, verificou-se também que a temperatura influenciou no tempo e porcentagem de eclosão das larvas, além de interferir no desenvolvimento morfológico do embrião (MOTTA et al., 2009).

Muitos estudos analisaram a influência da temperatura sobre o desenvolvimento e mortalidade de embriões de peixes, mas estes mecanismos relacionados à temperatura ainda permanecem indefinidos para muitas espécies (LEGGET & DE BLOIS, 1994), necessitando de maior número de pesquisas para que esses fatores sejam mais bem elucidados.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, Gerald R.; CROSS, Norbert J., Descriptions of five new rainbowfishes (Melanotaeniidae) from New Guinea. **Records - Western Australian Museum** 8: (3). 1980.
- ALLEN, G. R.; OHEE, H.; BOLI, P.; BAWOLE, R.; WARPUR, M. Fishes of the Youngsu and Dabra areas, Papua, Indonesia. In: RICHARDS, S e SURYADI, S. **The RAP Bulletin of Biological Assessment**. Ed. Conservation International, p. 67-72. 2002.
- ALLEN, G. R. Field guide to the freshwater fishes of New Guinea. Madang, Papua New Guinea: **Christensen Research Institute**, 1991. 268 p.
- ANDRADE, D. R. **Biologia reprodutiva da manjuba *Curimatella lepidura* Eigenmann and Eigenmann, 1889 (Pisces, Curimatidae) da Represa de Três Marias, Rio São Francisco, MG**. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. 1990.
- ARITAKI, Masato; SEIKAI, Tadahisa. Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. **Aquaculture**, USA, v. 240, p.517-530, 2004.
- AYALA, M. D.; LÓPEZ-ALBORS, O.; GIL, F.; LATORRE, R.; VÁZQUEZ, J. M.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ABELLÁN, E.; RAMÍREZ, G.; MORENO, F. Temperature effects on muscle growth of the axial musculature of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Anat. Histol. Embryol.**, Philadelphia, v. 29, n. , p.235-241, 2000.

- AYALA, María D.; LÓPEZ-ALBORS, Octavio; GIL, Francisco; GARCÍA-ALCÁZAR, Alicia; ABELLÁN, Emilia; ALARCÓN, Juan A.; ÁLVAREZ, María C.; RAMÍREZ-ZARZOSA, Gregorio; MORENO, Francisco. Temperature effects on muscle growth in two populations (Atlantic and Mediterranean) of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture**, USA, v. 202, p.359-370, 2001.
- BAGENAL, T. B. Aspects of fish fecundity. In: GERKING, S.D. (ed.). Ecology of freshwater fish production. **Oxford: Blackwell**, p. 75-101. 1978.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 350p.
- BALON, E. K.. Reflections on Some Decisive Events in the Early Life of fishes. **Transations of Americans Fisheries Society**, Bethesda, v. 113, n. 2, p.178-185, 1984.
- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP). **Acta Limnologica Brasiliensi**, v. 12, p. 85 – 91, 2000.
- BARBIERI G.; SANTOS E. P. Análise comparativa do crescimento e de aspectos reprodutivos da piava, *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) da represa do Lobo e do rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo. **Ciência e Cultura**, n.40, p.693-697, 1988.
- BLAXTER, J. H. S. Development of Sense Organs and Behaviour of Teleost Larvae whith Special Reference to Feeding and Predator Voidance. **Transations Of Americans Fisheries Society**, Bethesda, v. 115, p.98-114, 1986.
- BLAXTER, J. H. S. Pattern and variety in development: Eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.. **Fish physiology**. 11. ed. San Diego: Academic Press, Cap. 01, p. 01-58. 1988.
- BLAXTER, J. H. S. The effect of temperature on larval fishes. **Journal of Zoology**. Netherlands , v.42, p.336–357, 1992.
- BRAZ DE ARAÚJO, RENATO. Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 9, núm. 2, pp. 24-31. Universidade Estadual da Paraíba. Paraíba, Brasil. 2009.
- CLAVIJO-AYALA, Jhon Alejandro. **Ontogenia do Sistema Sensorial do Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae)**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado) - UNESP, Jaboticabal, 2008.
- CONOVER, D. O. Adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a fish. **American Naturalist**. 123(03):297-313. 1984.

- CREPALDI, Daniel V.; FARIA, Paulo M.C.; TEIXEIRA, Edgar de A.; RIBEIRO, Lincoln P.; COSTA, Ângelo Augusto P.; MELO, Daniela C.; CINTRA, Anna Paula R.; PRADO, Samuel de A.; COSTA, Frederico A. A.; DRUMOND, Mariana L.; LOPES, Vando E.; MORAES, Vinícius E. Utilização de hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.168-173, jul./dez. 2006.
- CREPALDI, D. V. et al. Biologia reprodutiva de Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.30, n.3, p.159-167, 2006.
- DIAS, J. F.; PERES-RIOS, E.; CHAVES, P.T.C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI C.L.D.B.. Análise Macroscópica dos Ovários de Teleósteos: Problemas de Classificação e Recomendações de Procedimentos. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, 58 (1): 55-69. 1998.
- FERREIRA, André Veloso. **Ontogenia inicial e consumo de vitelo em embriões de melanotênia maçã (*Glossolepis incisus*, WEBER, 1907)**. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, UENF, Campos dos Goytacazes, Campos dos Goytacazes, 2007.
- FERREIRA, André V.; VIDAL JUNIOR, Manuel V.; ANDRADE, Dalcio R.; YASUI, George S., MENDONÇA, Pedro P.; MATTOS, Douglas C. Consumo de vitelo durante o desenvolvimento embrionário de melanotênia-maçã, *Glossolepis incisus*, weber 1907 (*Melanotaeniidae*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 721-729, jul./set. 2009.
- FISHBASE. ***Melanotaenia boesemani*** (Allen & Cross, 1980). Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=10489&genusname=Melanotaenia&speciesname=boesemani&AT=melanotaenia+boesemani&ang=Portuguese>>. Acesso em: 05 março 2014.
- FUJIMOTO, Takafumi; KATAOKA, Takashi; SAKAO, Suzu; SAITO, Taiju; YAMAHA, Etsuro; ARAI, Katsutoshi Developmental stages and germ cell lineage of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Zoological Society Of Japan**, Bunkyo, p.977-989, 2006.
- GARCIA, Jose Antonio Dias; CHINI, Helena A.S.; MAISTRO, Edson Luis; QUAGIO-GRASSIOTTO, Irani. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Teleostei, Characiformes, Characidae) from RioSapucaf, Minas Gerais State, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**. 18 (4): 1057 -1064. 2001.
- GLUCKMANN, I.; HURIAUX, F.; FOCANT, B.; VANDEWALLE, P.. Postembryonic development of the cephalic skeleton in *Dicentrarchus labrax* (Pisces, Perciformes, Serranidae). **Bulletin of Marine Science**. 65:11–36. 1999.

- GODINHO, H. M.; FENERICH, N.A.; M.Y.NARAHARA. Desenvolvimento embrionário e larval de *Ramdhia hildarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Porto Alegre, p.51-56, 1978.
- GODINHO, H. P.; SANTOS J. E.; SATO, Y. Ontogenese larval de cinco espécies de peixes do São Francisco, p.133-148. In: GODINHO, A.L (org.) **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte; PUC Minas, 468pp. 2003.
- GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 351-360, 2007.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, 144 p., 1993.
- HERZIG, A.; WINKLER, H. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides mento* and *Vimba vimba*. **Journal of Fish Biology**. 28:171–181. 1986.
- HUMPHREY, C.; KLUMPP, D. W.; PEARSON, R.. Early development and growth of the east rainbowfish, *Melanotaenia splendida splendida* (Peters I). Morphogenesis and Ontogeny. **Marine and Freshwater Research**, New Zealand Journal, p.17-25, 2003.
- IBAMA. Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas - DBFLO Coordenação Geral de Autorização de Uso e Gestão da Fauna e Recursos Pesqueiros – CGFAP. Estatística da Pesca 2007. Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília-DF, dezembro de 2007.
- ISAAC – NAHUM, V. J.; CARDOSO, R. DE D.; SERVO, G. & ROSSI – WONGTSCHOWSKI, C. L. D. Aspects of the spawning biology of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879), (Clupeidae). **Journal of Fish Biology**, 32. (3): 383 –396. 1988.
- KADARUSMAN, SUDARTO, PARADIS E. & POUYAUD L.. Description of *Melanotaenia fasinensis*, a new species of rainbowfish (*Melanotaeniidae*) from West Papua, Indonesia with comments on the rediscovery of *Melanotaenia ajamaruensis* and the endangered status of *M. parva*. **Cybiurn**, 34(2): 207-215. 2010.
- KENTOURI, M. Comportement larvaire de 4 sparide´s mediterrane´ens en e´levage *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (Poissons Te´leosteens). **The´se d’Etat, Universite´ des Sciences et Techniques**, Languedoc. 1985.
- KIRTLEY, P. T. **Spawning rainbowfishes made simple**. US: T.F.H. 1986

- KLIMOGIANNI Æ G. KOUMOUNDOUROS Æ P. KASPIRIS M. KENTOURI. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*. **Marine Biology**. 145: pag.1015–1022. 2004.
- KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. Embryonic and yolk-sac larval development of *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes, Sparidae). **Mar Life**. 6:41–50. 1998.
- KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; ANEZAKI, L.; KENTOURI, M. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Marine Biology**. 139:817–830. 2001.
- KUO C. M.; NASH, C. E.; SHEHADEH, Z. H. The effects of temperature and photoperiod on ovarian development in captive grey mullet (*Mugil cephalus* L.). **Aquaculture**, 3:25-43, 1974.
- LAGLER, K. F.; BARDACH, J. E.; R. R. MILLER. **Ichthyology**. New York: Wiley. 1977.
- LEGGET, W.C.; DEBLOIS, E.. Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages. **Neth. J. Sea Res.** 32, 119–134. 1994.
- LIMA, A. O. Aquicultura ornamental. **Panorama da Aquicultura**. v. 14, n. 83, p. 58-59. 2004.
- LO, N.. A model for temperature-dependent northern anchovy egg development and an automated procedure for the assignment of age to staged eggs. In: Lasker, R. (Ed.), **An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy (*Engraulis mordax*)**. U.S. Dep. Commer. NOAA Tech. Rep NMFS.36. 1985.
- LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 374-400. 1999.
- LUZ, R.K. et al. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. São Paulo: **Boletim do Instituto de Pesca**, 2001.
- MACKENZIE, D.; VANPUTTE, C.; LEINER, K. Nutrient regulation of the endocrine function in fish. **Aquaculture**. v.161, p.3-25, 1998
- MCGUIGAN, K.; ZHU, D.; ALLEN, G. R.; MORITZ, C. Phylogenetics relationships and historical biogeography of melanoteiid fishes in Australia and New Guinea. **Marine and Freshwater Research**, Melbourn, v. 51, p. 713-723, 2000.
- MOTTA, Jonas Henrique de S.; VIDAL JUNIOR, Manuel V.; RADAEL, Marcella C.; CARDOSO, Leonardo D.; MATTOS, Douglas da C.; MANHÃES João Vitor de A. Período de eclosão em diferentes temperaturas em ovos de acará-bandeira *Pterophyllum scalare* Lichtenstein (1823). I COMVET – I Congresso de Medicina Veterinária do Norte Fluminense. 2009.

- MUMFORD, Sonia; HEIDEL, Jerry; SMITH, Charlie; MORRISON, John; MACCONNELL, Beth; BLAZER, Vicki. **Fish Histology and Histopathology**. Manual, volume 4. 357p. 2007.
- MURGAS, Luis D. S.; DRUMOND, Mariana M.; PEREIRA, Gilmar J. M.; FELIZARDO, Viviane de O. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** - Suplemento, Belo Horizonte, n.6, p.70-76, dez. 2009.
- NAKATANI, Keshiyu; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: UEM, 2001. 378 p.
- NATHANAILIDES, C.; LÓPEZ-ALBORS, O.; STICKLAND, N. C. Influence of prehatch temperature on the development of muscle cellularity in posthatch Atlantic-Salmon (*Salmo salar*, L.). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 52, 675–680. 1995.
- NIKOLSKY, G. V. 1963. **The ecology of fishes**. Academic press, London and New York, 352p.
- NOAKES, D. L. G.; GODIN, J. J. Ontogeny of Behavior and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. In: HOAR, W. S.; HANDALL, D. J.. **Fish Physiology** Vol. XI B. London: Academic Press, p. 345-394. 1988.
- OJANGUREN A.F., BRAÑA F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. **Journal of Fish Biology**. 62, 580-590. 2003.
- POLO, A.; YUFERA, M.; PASCUAL, E. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. **Aquaculture**. 92:367–375. 1991.
- QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; PESSANO, E. F. Influência de fatores abióticos sobre a dinâmica da reprodução do cascudo viola *Loricariichthys platymetopon* (Isbrucker & Nijssen, 1979) (Osteichthyes, Loricariidae), no reservatório da estância Nova Esperança, Uruguaiana, bacia do Rio Uruguai, RS, Brasil. **Biodivers. Pampeana** 2:24-29. 2004.
- RADAEL, M. C. **Efeito Da Temperatura Na Ontogenia Inicial De Melanotênia Neon (*Melanotaenia praecox*)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 76p. (Dissertação de Mestrado), 2010.
- RADAEL, M. C.; CARDOSO, L. D.; ANDRADE, D. R.; MATTOS, D. C.; MOTTA, J. H. S.; MANHÃES, J. V.; VIDAL JUNIOR, M. V. Morphophysiological characterization of the embryonic development of *Melanotaenia praecox* (Weber & de Beaufort, 1922). **Zygote** 9, 1–7. 2013.
- RAINBOWFISH. Disponível em: < <http://rainbowfish.angfaqld.org.au/Boesemani.htm> > Acesso em: 24 de janeiro de 2014.

- REID, H. P.; HOLDWAY, D. A. Early development of the Australian crimson-spotted rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis* (Pisces: *Melanotaeniidae*). **Mar Freshwater Res.**, New Zealand, v. 46, p.475-480, 1995.
- SAMPAIO, L. A.; ROBALDO, R. B.; OKAMOTO, M. O.; LOUZADA, L. R.; FREITAS, L. S.; RODRIGUES, R. V.; SILVA, E.; ROCHA, A. F.; OLIVEIRA, M. O. Reprodução e larvicultura do linguado *Paralichthys orbygnianus*: revisão do conhecimento atual. Anais do Aqua Ciência – I Congresso da Aquabio, Vitória, de 24 a 28 de maio / Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática: ed. José Eurico Possebon Cyrino [e] Elisabeth Criscuolo Urbinati – Vitória, 460p. 2004.
- SANCHES, P. V.; NAKATANI, K.; BIALETZKI, A. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná river. **Rev. Brasil. Biol.**, Porto Alegre, v. 59, n. 3, p.429-438, 1999.
- SANTOS, H. S. L. & R. AZOUBEI. **Embriologia Comparada**. Jaboticabal, FUNEP, 189p. 1996.
- SANTOS, CESAR. Comunidade de Peixes Demersais e Ciclo Reprodutivo de Quatro Espécies da Família *Sciaenidae* na Plataforma Interna entre Superagui e Praia del Leste, PR. Tese (Doutorado) Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.
- SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 179f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1999.
- SENHORINI, J. A. **Procedimentos para criação de larvas de peixes**. Pirassununga: Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura, 1993. 32p. (Apostila de curso).
- SHATUNOVSKIY, M. I. Some indices of reproductive ability of fishes. **Journal of Ichthyology**, v. 28, n. 3, p. 119-123, 1988.
- SHIOTA, T.; ISHIMATSU, A.; SOYANO, K. Effects of temperature on gonadal development of mudskipper (*Periophthalmus modestus*). **Fish Physiology and Biochemistry**. 28: 445–446, 2003.
- SOUZA, G. **Reprodução Induzida, ontogenia inicial, etologia larval e alevinagem da piabanha (*Brycon insignis*, STEIDACHNER, 1877)**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência Agropecuárias e Tecnológicas. Campos dos Goytacazes, RJ. 2004.
- TAYLOR, E. C. **Over the rainbows**. Pet Bussiness. p. 1-99. 1999.

- TELES M. E. O.; GODINHO, H. P.. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Sertrasalmus brandtii* (Teleostei: Characidae) na represa de Três Marias, Rio São Francisco. **Rev Bras Biol**, v.57, p.177-184, 1997.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: reprodução e crescimento**. Brasília, CNPq-Programa Nacional de Zoologia. 1981.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. EDUEM, Maringá, 169p. 1996.
- VIDAL JUNIOR, M. V. Peixes Ornamentais, As boas perspectivas para a piscicultura ornamental. **Panorama da Aquicultura**, n.72, 2002.
- WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Aust. Jour. Mar. Freshwater. Res.** 41: 199-222. 1990.
- ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

## 5. CAPÍTULO 1

O capítulo a seguir corresponde ao artigo integrante desta tese a ser submetido como manuscrito ao jornal “**Fish Physiology and Biochemistry**” (ISSN: 0920-1742) e, como tal, sua redação e edição foram preparadas segundo as normas deste periódico, normas essas constantes na página do mesmo na rede mundial de computadores conforme o endereço a seguir:

[http://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10695?detailsPage=pltc1\\_1060339](http://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10695?detailsPage=pltc1_1060339)

Data de acesso: 25/04/2014

## **Descrição morfológica dos ovários do peixe ornamental *Melanotaenia boesemani* em atividade reprodutiva.**

### **Resumo**

Estudou-se o tecido germinativo ovariano de *Melanotaenia boesemani*. Através de análises morfológicas das gônadas, realizadas após a confecção de lâminas histológicas confeccionadas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina, foram descritos os tipos celulares encontrados e realizada a classificação do estágio de maturidade dos animais. Macroscopicamente, foi identificado que a referida espécie possui ovário único, arredondado e, na fase observada, amarelado, localizado na parte látero-anterior da cavidade celomática. As fêmeas observadas foram classificadas na escala de desenvolvimento gonadal como maduro/em reprodução e eram evidentes a presença de folículos vazios e marcas de desova nas lamelas ovulíferas. Nos ovócitos vitelogênicos deste peixe foi constatado a presença de filamentos de adesão ovocitária ancorados à zona pelúcida. Os ovários apresentaram aspecto morfológico geral semelhante ao de outros peixes teleosteos. Seu tipo de desova foi classificado como intermitente e o padrão de desenvolvimento de ovócitos como assincrônico.

**Palavras-chave:** oogênese, histologia ovariana, desenvolvimento gonadal, reprodução.

### **Introdução**

A *Melanotaenia boesemani* é um peixe muito utilizado no aquarismo. É originária do lago Ayamaru, na Indonésia (Kadarusman et al., 2010). São peixes bentopelágicos de água doce cuja faixa de pH ideal para sobrevivência está entre 6,0 a 8,0. Esses peixes pertencem à classe dos Actinopterygii (peixes com raios nas nadadeiras), ordem Atheriniformes (Fishbase, 2014).

Os machos se distinguem das fêmeas pela coloração na parte frontal da cabeça e pelo corpo em cinza azulado brilhante; nas nadadeiras e na metade posterior do corpo apresentam coloração laranja-avermelhado e os raios da sua nadadeira dorsal são mais compridos e alongados. As fêmeas exibem uma ampla

faixa lateral escura acompanhada de uma série de listras longitudinais estreitas amarelas ou laranja-avermelhado, variando de acordo com o ambiente e estado fisiológico do animal. O seu corpo é, em geral, mais longilíneo e com as bordas mais arredondadas que nos machos (Rainbowfish, 2014).

Desde sua introdução no aquarismo, que segundo registros iniciou-se após uma expedição em novembro de 1982, a melanotênia boesemani tem se tornado mais conhecida e, hoje, pode ser considerada como o *rainbowfish* mais popular neste hobby (Rainbowfish, 2014).

O desenvolvimento das gônadas em *M. boesemani* já é evidente em espécimes do sexo feminino com apenas 3,4 cm e em peixes acima de 4 cm o sistema reprodutor já parece ser totalmente funcional (Allen & Cross, 1980).

Os ovos destes peixes apresentam adesividade, ficando fixados ao substrato utilizado para desova, essa adesão ocorre por meio de filamentos de fixação presentes no córion (Humphrey et al., 2003).

Apesar de a reprodução nos peixes teleósteos ser complexa, a morfologia das células germinativas e os elementos somáticos constituintes do tecido das gônadas são semelhantes nas várias espécies. Todas estas estruturas se desenvolvem no sentido de produzir gametas férteis necessários para uma reprodução bem sucedida (Hoar et al., 1983).

Os peixes constituem o grupo mais numeroso e diversificado dentro dos vertebrados e estão adaptados a diversos habitats aquáticos. Essa diversidade é refletida em suas estratégias reprodutivas e, conseqüentemente, na morfologia gonadal (Desjardins & Fernald, 2009).

Na maioria dos peixes teleósteos, o ovário é um órgão par que se estende no sentido crânio-caudal e se funde na região caudal formando um ducto ovocitário comum. Contudo, podem ocorrer distinções dentre algumas espécies, em que os ovários podem se fundir ou um deles pode se degenerar e, em ambos os casos, permanecer como um órgão único (Nagahama, 1983).

Histologicamente, ovários são revestidos pela túnica albugínea que emite septos para o interior do órgão formando lamelas ovulíferas que delimitam a cavidade ovariana central. Nestas lamelas se encontram ovogônias e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (Bazzoli, 2003).

O reconhecimento e a caracterização das células germinativas, em seus diferentes estágios de desenvolvimento, assim como a sua distribuição e frequência nos ovários de animais adultos, permitem estimar o desenvolvimento ovariano e o tipo de desova da espécie (Lima et al., 1991).

Essas informações são de relevante interesse às pesquisas que envolvem processos reprodutivos e para a piscicultura, portanto, objetivou-se, através da observação de cortes histológicos de gônadas de *M. boesemani*, descrever as características das células gametogênicas durante o processo de oogênese.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no setor de Aquicultura da Unidade de Apoio à Pesquisa em Zootecnia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes-RJ. O processamento do material coletado (ovários) foi realizado no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Foram utilizadas, no experimento, fêmeas maduras e em atividade reprodutiva, provenientes do plantel de *Melanotaenia boesemani* do setor de piscicultura do LZNA/CCTA. Após a captura, os animais foram insensibilizados em água a zero grau Celsius e submetidos à eutanásia. Durante a necropsia, o ovário foi avaliado macroscopicamente quanto à forma, textura, consistência e coloração das superfícies. As gônadas foram coletadas inteiras e imediatamente fixadas em formalina neutra tamponada a 10% por um período mínimo de 24 horas.

Posteriormente, os ovários foram submetidos a processamento histológico com inclusão em parafina. Foram obtidos cortes de 5 $\mu$  e as lâminas permanentes coradas em hematoxilina e eosina (HE) para análise morfométrica e morfológica dos ovários e posterior descrição das estruturas ovocitárias e das células da linhagem ovogênica, bem como dos estágios de desenvolvimento ovariano.

As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital INFINITY1 e software INFINITY ANALYZE, adaptada em

microscópio óptico (Nikon® ECLIPSE E2000), através do qual as células ovocitárias foram medidas para posterior análise e correlações.

Para análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o software SAS. Os dados foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância. Em caso de diferenças, aplicou-se teste de Tukey.

## Resultados

O ovário de *Melanotaenia boesemani* foi observado como sendo um órgão único, arredondado, com coloração amarelada ocupando a parte anterior da cavidade celomática (Figura 1). Em observações realizadas antes deste experimento, foi possível verificar que o ovário, em período anterior ao reprodutivo, tem uma forma muito diminuta, o que dificulta sua observação a olho nu, no entanto, em período reprodutivo, apesar de não ser tão volumoso como visto em outras espécies de teleósteos, é de fácil visualização.

Este órgão estava revestido pela serosa peritoneal que o prendia à cavidade celômica e ao intestino pelo mesovário. Logo abaixo desta serosa se encontrava a albugínea ovariana, que delimita o parênquima do ovário. Esta era uma camada espessa, formada por tecido conjuntivo denso e com afinidade para a eosina. A albugínea emitia, para o interior do órgão, septos conjuntivos incompletos, as lamelas ovulíferas, que suportavam e envolviam ovogônias e ovócitos. Esta região possuía fibras conjuntivas, nervos, vasos sanguíneos, células do conjuntivo e células musculares lisas.

A organização ovariana se mostrava do tipo assincrônica. Devido ao comportamento reprodutivo intermitente da espécie, que desova várias vezes ao longo do período reprodutivo, em observações histológicas foi possível visualizar ovócitos em todos os estádios de desenvolvimento ovocitário, incluindo ovócitos em crescimento primário/jovem (O1); crescimento secundário/pré vitelogênico (O2); em fase de alvéolo cortical (O3); e, por último, vitelogênico (O4) (Figura 2).

As ovogônias foram visualizadas em pequena quantidade e apresentavam citoplasma escasso e finamente granular, núcleo grande, ovóide e centralmente localizado com nucléolo proeminente, esférico e único.

Estatisticamente, verificou-se que durante o desenvolvimento ovocitário o diâmetro do ovócito 1 não diferia do ovócito 2 no teste de Tukey (0,0963) e os demais tiveram resultado significativo com probabilidade menor que 0,0001 (Figura 3). Porém, os aspectos morfológicos de cada célula eram bastante distintos entre si.

Os ovócitos com crescimento primário (O1) apresentavam citoplasma vítreo e basófilo. O núcleo grande e arredondado era centralizado e com nucléolos aderidos a face interna do envoltório nuclear. Nessa fase de desenvolvimento ovocitário o núcleo ocupava a maior parte do ovócito em relação ao citoplasma. Em sua maioria, os O1 eram pequenos com perímetro médio de  $64,72 \pm 28,97$  micrômetros (Figura 4 – A).

Nos ovócitos em crescimento secundário (O2) o tamanho médio foi de  $112,69 \pm 28,61$  micrômetros. O citoplasma ainda basófilo apresentava aspecto granular, a relação nucleoplasmática era menor que na fase anterior, embora o núcleo permaneça grande com cromatina na forma de granulações finas. A zona radiata já podia ser notada, porém de forma bastante discreta (Figura 4 – B).

Os ovócitos 3 foram caracterizados principalmente pela presença dos alvéolos corticais. Inicialmente, estes alvéolos, vistos como pequenos vacúolos surgiram na zona periférica do citoplasma formando uma espécie de anel e foram aumentando gradativamente em número e tamanho de acordo com o desenvolvimento da célula. Na fase final do ovócito 3, os alvéolos corticais preenchiam quase por completo o citoplasma (Figura 4 – C).

O núcleo dos ovócitos 3 era inicialmente grande, de formato circular, claro, com cromatina em granulações finas e nucléolos irregulares. Com o desenvolvimento da célula, tornou-se disforme, tendo seu tamanho reduzido corando-se fortemente pela eosina. A zona radiata, ainda com pequena espessura, foi visualizada como uma camada com coloração fortemente eosinófila e destacada em relação ao citoplasma.

Nessa etapa, pode-se também observar a presença de estruturas filamentosas aderidas externamente à zona pelúcida com aspecto proteico, corados pela eosina (Figura 5). Esses filamentos foram identificados como estruturas de fixação que têm a função de aderir os ovos às raízes e outros substratos durante o

desenvolvimento do embrião, o que é uma tática reprodutiva da espécie. Ovócitos 3 apresentaram tamanho médio de  $250,93 \pm 26,44$  micrômetros.

Os ovócitos 4 são considerados como a fase vitelogênica do desenvolvimento ovocitário. Nesse estágio, existe ainda grande presença de alvéolos corticais, porém grânulos de vitelo foram surgindo, preenchendo gradativamente o citoplasma de acordo com o desenvolvimento. Os grânulos de vitelo se coraram em tonalidade róseo-avermelhado devido à eosina e isto facilitou observar sua evolução no citoplasma do ovócito.

Com o progresso da vitelogênese nesses ovócitos, o número de grânulos de vitelo aumentou e encobriu o núcleo que deixou de ser evidente. Os alvéolos corticais nesse ponto foram empurrados novamente para a periferia e os glóbulos de vitelo se fundiram, formando grandes placas que preencheram quase todo o citoplasma.

A zona radiata, nesta fase de desenvolvimento ovocitário, era mais espessa e fortemente corada pela eosina. Nela, ressaltavam-se inúmeras estrias, constituindo canalículos para possível passagem de substâncias para o interior do ovócito. Ocorreu, nessa fase também, o aumento da espessura da granulosa e presença de vacúolos por toda a camada. O desenvolvimento de células da teca também foi visualizado. Ovócitos 4 apresentaram tamanho médio de  $683,30 \pm 28,61$  micrômetros.

Apesar de o núcleo deslocado ser uma característica que evidencia a proximidade de desova, no presente trabalho, essa situação nuclear não foi observada, o que talvez possa ser atribuído ao fato de os grânulos de vitelo encobrirem esse aspecto nas lâminas analisadas.

A zona pelúcida ou radiata atinge sua espessura máxima no ovócito 4, apresentando, aparentemente, uma única camada que se apresentou com estriações transversais bastante nítidas em observações microscópicas com objetiva de 40x. Em algumas dessas estriações, que, segundo a literatura, são canalículos de passagem de material, podia-se ver nitidamente um material denso percorrendo esses canais. Essa região apresentou afinidade tintorial pela eosina na coloração com HE, mostrando, portanto, coloração avermelhada.

Células foliculares da camada granulosa apresentaram formatos diferentes ao longo do ovócito. Elas estavam em contato com a zona pelúcida e com os filamentos

de adesão e, no ovócito 4, elas se apresentavam como células colunares com núcleo na região apical. Seu núcleo se corou em tom azulado refletindo sua afinidade pela hematoxilina na coloração com HE.

Foi comum observar entre a camada granulosa e a zona pelúcida espaços mais claros, provocados, provavelmente, pela pressão feita pelos filamentos que se colocavam frequentemente entre a zona pelúcida e granulosa.

A teca apresentou o padrão típico encontrado em peixes teleósteos, evidenciando células e fibras conjuntivas, bem como, vasos sanguíneos.

As lâminas histológicas dos peixes estudados apresentaram poucas observações de atresia ovocitária, encontradas principalmente em ovócitos 4 e apresentando o padrão clássico de eventos atrésicos na reabsorção de ovócitos.

Apesar da baixa observação de ovócitos em processo de atresia, foi possível encontrar forte evidência da mesma através da observação bastante comum de estruturas que mostravam o processo final dessas reabsorções. Essas estruturas se apresentavam como uma massa residual pequena e com regiões amareladas resultante da reabsorção final do vitelo (grânulos de lipofuscina). Essas estruturas foram denominadas marcas de desova (Figura 6), por somente ocorrerem em peixes que apresentavam sinais de desova, ou seja, presença de folículos vazios. As marcas de desova foram visualizadas principalmente junto à cápsula conjuntiva que revestia o ovário.

Os folículos vazios (Figura 7) são formados quando o ovócito maduro é expelido da lamela para o lúmen ovariano, deixando na lamela parte de seu envoltório, ou seja, a camada granulosa formada pelas células foliculares e a teca. Essa estrutura semelhante a um colar dobrado com espaço vazio no seu interior é bem evidente no seu início, porém, aos poucos ela vai sendo absorvida pelas próprias células foliculares e por fagócitos, restando, no final desse processo, uma massa compacta residual semelhante a marca de desova, porém, mais densa e sem as granulações amareladas desta última.

Em função do padrão de distribuição dos tipos celulares da linhagem ovocitária no ovário de *M. boesemani*, foi necessário criar uma nova denominação para o estágio de maturação ovariana que pudesse representar o momento fisiológico em que se encontravam todas as fêmeas adultas observadas no presente

trabalho. Portanto, para refletir a peculiaridade de sua desova múltipla e intermitente, as fêmeas observadas foram classificadas como no estágio de maturação ovariana F3R – (maduro/em reprodução).

## Discussão

A maioria dos teleósteos apresenta dois ovários dispostos no sentido crânio-caudal, fundidos na região caudal, formando o ducto ovariano comum, porém, podem ocorrer casos em que os ovários se fundem ou um deles degenera e, assim, permanecem como um único órgão (Nagahama, 1983). Corroborando com essa última descrição, o ovário de *M. boesemani* apresentou-se como um órgão único.

A desova da referida espécie ocorre de forma parcelada e por um longo período, podendo desovar por todo o ano em condições de qualidade da água e nutrição adequadas. Portanto, o ovário após a maturidade apresenta ovócitos em todos os estádios de desenvolvimento ovocitário (Reid e Holdway, 1995). Esta situação foi observada no presente trabalho, onde, numa mesma lâmina, foi possível observar ovócitos em todos os estádios de desenvolvimento.

Comumente, o desenvolvimento ovocitário dos teleósteos, apesar de ser um processo contínuo, tem sido dividido em fases para uma melhor compreensão das alterações pelas quais passam as células germinativas. Todavia, observa-se que existe uma divergência quanto à classificação dessas fases. Alguns pesquisadores levam em conta as características nucleares, citoplasmáticas e de vitelo; outros o tamanho; e alguns consideram os diferentes estágios de desenvolvimento dos ovócitos e as camadas de folículos ovarianos (Romagosa, 1991).

Em pesquisa realizada com a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), por Ganeco et al. (2001), com piraputanga (*Brycon hilarii*), por Zaiden (2000) e com cascudo (*Liposarcus anisitsi*), por Cavalcanti (1994), a classificação adotada foi de seis fases para o desenvolvimento ovocitário: Cromatinanucléolo (fase 1), Perinucleolar (fase 2), Alvéolo-Cortical (fase 3), Vitelogênico (fase 4), Pós-Vitelogênico/maturação final (fase 5) e Atrésico (fase 6).

Em outros estudos com Pirá *Conorhynchus conirostris* (Ribeiro, 2002), mandi *Pimelodus maculatus* (Oliveira Junior, 2002) e *Bryconops affinis* (Andrade et al.,

2001) foram identificadas cinco fases: ovogônias, ovócito jovem, ovócitos pré-vitelogênicos, ovócitos com alvéolos-corticais e ovócitos Vitelogênicos.

Em *M. boesemani*, foram caracterizados 4 estádios: englobando ovócitos em crescimento primário/jovem (O1); crescimento secundário/pré vitelogênico (O2); em fase de alvéolo cortical (O3); e, por último, vitelogênico (O4), semelhante ao utilizado por Cangussu-Mariani et al. (1991) para *Astyanax bimaculatus* e por Bazzoli & Rizzo (1990) para diversas espécies estudadas.

As ovogônias de *M. boesemani* corresponderam à descrição feita para peixes teleósteos por Vazzoler (1996) e Takahashi (2006), que denominaram esta fase inicial de cromatina-nucleolar, sendo o primeiro tipo de ovócito encontrado.

Ovócitos na fase de crescimento primário seguiram o padrão descrito por Fosse Filho (2014) para *Melanotaenia praecox* e Amorim (2007) para *Pimelodus maculatus*. O citoplasma é pequeno em relação ao núcleo que é central, e nucléolos são facilmente visualizados na periferia do nucleoplasma. O citoplasma, inicialmente basófilo e de contorno anguloso, assemelha-se ao visualizado em *Brycon orbygnyanus* por Ganeco et al. (2001).

Na fase de crescimento secundário, os ovócitos apresentaram tamanho maior em relação à fase anterior, embora, em alguns momentos, o perímetro de ambos se interponha. O núcleo se manteve grande, com diversos nucléolos basófilos periféricos, mas houve diminuição da relação núcleo plasmática devido ao aumento do citoplasma.

O núcleo vitelínico, também conhecido como corpo de Balbiani, pode apresentar-se no citoplasma do ovócito como uma estrutura basófila de contorno circular e homogênea (Ganeco et al., 2001). Essa estrutura geralmente é descrita no ovócito II, mas já foi visualizada em algumas espécies no citoplasma do ovócito I (Wallace, 1981, Matkovic & Pisanó, 1989). Nos ovócitos de *M. boesemani*, o núcleo vitelínico não se mostrou evidente em nenhum dos estádios ovocitários.

A fase de alvéolo cortical em *M. boesemani* apresentou características semelhantes ao descrito por Guraya (1986) quando cita que os alvéolos corticais aparecem primeiramente na periferia do ooplasma de onde são espalhados para o resto do ovócito e finalmente se agregam no córtex do ooplasma para constituir uma zona conspícua. Nas primeiras fases, esses ovócitos demonstraram o núcleo

central, citoplasma com afinidade tintorial mudando de basófilo para acidófilo, presença de membrana pelúcida e células foliculares, assim como descrito para *Brycon orbignyanus* por Ganeco et al. (2001).

Menn et al. (2007) relataram que, na fase de alvéolo cortical, se inicia a inclusão de vitelogenina no citoplasma do ovócito. Semelhante ao que ocorreu com *Danio rerio* (Yön et al., 2008), com o avanço da fase de alvéolo cortical o núcleo dos ovócitos de *M. boesemani* se tornou disforme e com aspecto opaco, até praticamente desaparecer em meio aos alvéolos, concomitantemente, a zona radiata se tornou mais visível e espessa, assim como relatado por Jiang et al. (2010).

Na fase vitelogênica (ovócitos IV), grânulos de vitelo começaram a se tornar evidentes em meio aos alvéolos corticais. De forma gradual, com o crescimento desses ovócitos, que foram os que apresentaram maior perímetro, o vitelo foi empurrando os alvéolos de volta à periferia, uma vez que o surgimento desses grânulos de vitelo foi visto mais frequentemente da região central para a periferia, semelhante ao descrito para *Danio rerio* (Çakici e Üçuncü, 2007).

Ao final do desenvolvimento, nessa fase, o ovócito possuía seu citoplasma completamente ocupado por grânulos de vitelo, assim como ocorrido em *Hoplias malabaricus* (Marques et al., 2000), que finalmente se fundem formando grandes placas.

Geralmente, o aparelho micropilar apresenta-se totalmente desenvolvido em ovócitos maduros. A morfologia da micrópila pode variar de acordo com a espécie, sendo caracterizados pelo menos 4 tipos (Ricardo et al., 1996). De modo geral, a micrópila é visualizada como uma pequena abertura localizada no polo animal da célula, através da qual o espermatozoide penetra no ovócito maduro (Laale, 1980). Nas observações realizadas em *M. boesemani*, não foi possível evidenciar com destaque micrópila, nem aparelho micropilar.

Ovócitos atrésicos são comumente encontrados em ovários de teleósteos (Narahara, 1991). O processo de atresia ovocitária pode ocorrer durante todo o ciclo reprodutivo e ocorre normalmente nos ovócitos em maturação e maduros, coincidindo com a fase de pré-desova e pós-desova (Guraya, 1994). A atresia folicular envolve a atividade fagocitária dos tecidos ovarianos e boa parte dessa

fagocitose é auxiliada pelas células sanguíneas que invadem o citoplasma (Mazzoni, 1993). A atresia envolve também a quebra da zona pelúcida e hipertrofia das células foliculares (Narahara, 1991). Ovócitos com estas características foram visualizados com frequência nos ovários de *M. boesemani*.

Fosse Filho (2014) descreveu para *Melanotaenia praecox* estruturas filamentosas coradas pela eosina aderidas à zona pelúcida que são estruturas de fixação dos ovos para adesão aos substratos utilizados para a reprodução. Estruturas semelhantes a estas foram observados em *M. boesemani*.

A zona pelúcida surge no final do crescimento avitelogênico, inicialmente apresentando-se como camada delgada e homogênea e, quando alcança a espessura máxima, apresenta estriações conspícuas (Agostinho et al., 1982). A origem dessa camada tem sido relacionada à atividade secretora do ovócito, das células foliculares ou de ambas (Cavalcanti, 1994). Essas estriações foram verificadas em *M. boesemani* e sugeridas como canais de comunicação intercelular.

Bazzoli e Godinho (1995), estudando a ovogênese de peixes neotropicais, constataram que para *S. hilarii* a zona pelúcida possui camada dupla. Em *M. boesemani*, essa camada apresentou-se de forma simples, como uma única camada.

A definição de uma escala de maturidade é fundamental para o entendimento e para a previsão das variações de comportamento que a população, como um todo, sofre durante o ano (Cavalcanti, 1994). Porém, encontra-se na literatura diversas escalas para classificação da maturidade gonadal.

Para *Brycon cephalus*, Zaniboni Filho e Kawakami de Resende (1988) consideraram 5 estádios: imaturo, maturação, maduro, esvaziado e repouso, para exemplares capturados na natureza. Vazzoler (1996) por sua vez, faz uma classificação geral utilizando estágio A: imaturo, estágio B: em maturação/ repouso reprodutivo, estágio C: maduro e estágio D: esgotado. Para animais mantidos em cativeiro, Romagosa (1998) verificou os estádios de repouso, maturação, maduro e regressão. Zaiden (2000), para *Brycon hilarii*, considerou repouso, maturação I, maturação II, maduro e regressão. Em Piracanjuba, observaram-se 4 estádios de maturação: Repouso, Maturação Inicial, Maturação Avançada e Regressão (Ganeco et al., 2001) e Andrade et al. (2004) classificaram quatro estádios de maturação para

a tabarana na represa de Três Marias: recuperação-reposo, em maturação, maduro e esgotado.

Para o presente trabalho, foram utilizadas apenas fêmeas de *M. Boesemani* em atividade reprodutiva avançada e a classificação adotada para este estágio foi a de F3R – maduro/em reprodução. Tal nomenclatura foi adotada por não haver na literatura uma denominação apropriada ao tipo de desova da espécie que é intermitente e contínua. Esse fator confere ao ovário uma característica própria onde se observa a presença de todos os tipos ovocitários com incidência acentuada de ovócitos tipo IV, bem como presença de folículos vazios recentes e antigos e marcas de desova, o que caracteriza um processo contínuo de reprodução.

## **Conclusão**

O ovário de *Melanotaenia boesemani* apresentou aspecto morfológico geral semelhante ao de outros peixes teleósteos e é um órgão único.

Nos ovócitos vitelogênicos deste peixe foi constatado a presença de filamentos de adesão ovocitária que se mostraram, nas lâminas histológicas, muito evidentes e ancorados na zona pelúcida.

Seu tipo de desova foi classificado como intermitente/contínuo e o padrão de desenvolvimento de ovócitos como assincrônico.

Como nas lâminas observadas de ovário sempre foi evidente a presença de folículos vazios e marcas de desova nas lamelas ovulíferas, foi criado, para este peixe, um novo estágio de desenvolvimento ovariano, o qual denominou-se F3R (maduro/em reprodução).

## **Agradecimentos**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

## Referências

- Agostinho, AA, Narahara, MY, Godinho, HM. 1982. Morfologia dos ovários de *Plecostomus commersonii* (Valenciennes, 1840) Osteichthyes - Loricariidae: desenvolvimento dos ovócitos e escala de maturidade. Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro v. 42, n. 1:71-77.
- Allen, GR, Cross, NJ. 1980. Descriptions of five new rainbowfishes (Melanotaeniidae) from New Guinea. Rec. West. Aust. Mus. 8: (3).
- Amorim, JPA (2007). Foliculogênese e caracterização celular das classes reprodutivas em *Pimelocus maculatus* (Siluriformis: Pimelodidae), Dissertação, Botucatu-SP: Ed. UNESP.
- Andrade, DR, Bazzoli, N, Rizzo, E, Sato, Y. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). Tissue & Cell, v.33, n. 5:524-532.
- Andrade, DR, Godinho, AL, Godinho, HP. 2004. Biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* (osteichthyes, characidae) na represa de Três Marias. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, Niterói, v. 11, n. 3:123-128.
- Bazzoli, N, Rizzo, E. 1990. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. Eur. Arch.Biol. v.101:399-410.
- Bazzoli, N, Godinho, HP. 1995. Comparative morphology of the yolk nucleus (Balbiani's Body) in freshwater neotropical teleost fish. Revista Brasileira de Biologia. Rio de Janeiro, v.55, n. 2:207-214.
- Bazzoli, N. 2003. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho, HP, Godinho, AL. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUCMinas. 458 p.

Çakici, Ö, Üçüncü, Sİ. 2007. Oocyte development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, v.24, n.1-2:137-141.

Cangussu-Mariani, SD, Rizzo, E, Bazzoli, N. 1991. Morfologia e desenvolvimento do núcleo vitelínico do lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Osteichythes, Characidae). Revista Brasileira de Zoologia. 7(3):207-213.

Cavalcanti, DG. Reprodução do cascudo cinza *Liposarcus ansisti* (Holberg, 1893) (Loricariidae, Siluriforme): Histologia de gônadas e fatores abióticos. 1994. 124 f. Dissertação - Centro de Aquicultura (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Desjardins, JK, Fernald, RD. 2009. Fish sex: Why so diverse? Current Opinion in Neurobiology 19(6):648-653.

Fishbase. *Melanotaenia boesemani* (Allen & Cross, 1980). Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=10489&genusname=Melanotaenia&speciesname=boesemani&AT=melanotaenia+boesemani&lang=Portuguese>>. Acesso em: 05 março. 2014

Fosse Filho, JC. 2014. Avaliação temporal da absorção dos folículos pós ovulatórios e descrição morfológica do ovário de *Melanotaenia praecox* (Weber & De Beaufort, 1922). Dissertação – Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Ganeco, LN, Nakaghi, LSO, Urbinati, EC, Dumont Neto R, Vasques, LH. 2001. Análise Morfológica do Desenvolvimento Ovocitário de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Durante o Ciclo Reprodutivo. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, 27(2): 131 – 138.

Guraya, S. S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Basel, New York: Karger. 213p. Monographs in developmental biology, v. 18.

- Guraya, SS. 1994. Gonadal development and production of gamete in fish. Proc. Indian Natural Science Academy, v. 1:15-32.
- Hoar, WS, Randall, DJ, Brett, JR. 1983. Fish physiology, Reproduction, New York: Academic Press, p. 373-404.
- Humphrey, C, Klumpp, DW, Pearson, R. 2003. Early development and growth of the east rainbowfish, *Melanotaenia splendida splendida* (Peters). I. Morphogenesis and ontogeny, Marine and Freshwater Research, v. 54, n. 1:17- 25.
- Jiang, YQ, Zhang, TT, Yang, WX. 2010. Formation of zona radiata and ultrastructural analysis of egg envelope during oogenesis of Chinese perch *Siniperca chuatsi*, Micron, v. 41, n. 1: 7-14.
- Kadariusman, Sudarto, Paradis, E, Pouyaud, L. 2010. Description of *Melanotaenia fasinensis*, a new species of rainbowfish (Melanotaeniidae) from West Papua, Indonesia with comments on the rediscovery of *M. ajamaruensis* and the endangered status of *M. parva*. Cybium, 34(2): 207-215.
- Laale, H. W. 1980 The perivelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. Copeia, 2: 210-226.
- Lima, RLVA, Bernardino, G, Val-Sella, MV, Fava de Moraes, F, Schemy, RA, Borella, MI. 1991. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. Boletim Tecnico CEPTA, 4(1): 1-46.
- Marques, DKS, Rosa, IL, Gurgel, HCB. 2000. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. Revta bras. Zool. 17 (3): 573 – 582.

Matkovic, M, Pisanó, A. 1989. Oogenesis and ovulation in normal conditions are induced by homologous hypophysis in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Rev. Brasil. Biol. 49(1):203-212.

Mazzoni, R. 1993. Estratégia reprodutiva de duas espécies de *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae) do trecho inferior do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro. Dissertação – Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Menn, LEF, Cerdá, J, Babin, JP. 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, PJ, Cerdà, J, Lubzens, E. The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, New York, Springer, p. 1-38.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, WS, Randall, DJ, Brett, JR. Fish physiology, Reproduction, New York: Academic Press, p.223-275.

Narahara, MY. 1991. Histologia dos ovários de teleósteos. In: 1º Semana Sobre Histologia de Peixes, Jaboticabal, 1991. Resumos... Jaboticabal: FACV/UNESP, p. 39-46.

Oliveira Junior, RL. 2002. Análise comparativa da reprodução do mandi-amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do rio São Francisco, MG. Dissertação – Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.

Rainbowfish. 2014. Disponível em: <  
<http://rainbowfish.angfaqlld.org.au/Boesemani.htm> > Acesso em: 24 de abril de 2014.

Reid, HP, Holdway, DA. 1995. Early development of the Australian crimsonspotted rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis* (Pisces: Melanotaeniidae), Marine and Freshwater Research, v.46, n.2:475-480.

Ribeiro, DCJ. 2002. Biologia reprodutiva do pirá *Conorhynchus conirostris* Valenciennes, 1840 (Pisces: Pimelodidae) do Rio São Francisco, região de Pirapora, Minas Gerais. Dissertação – Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

Ricardo, MCP, Aguiar, CA, Rizzo, E, Bazzoli, N. 1996. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotropicais de água doce. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 48 (Supl. 1): 17-24.

Rocha, C. 2000. Análises histoquímicas da ovogênese de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758), Tetraodontidae. Monografia – Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

Romagosa, E. 1991. Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

Romagosa, E. 1998. Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultraestrutura) e indução da reprodução do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro, Vale do Ribeira, São Paulo. São Carlos, 218p. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar.

Takahashi, ELH. 2006. Ciclo reprodutivo da tabarana, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characidae, Salmininae) na região do baixo Rio Sorocaba, SP. Dissertação – Mestrado. Universidade Estadual Paulista.

Vazzoler, AEAM. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática, Maringá: Eduem/SBI/CNPq/Nupélia, 169 p.

Wallace, RA, Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer. Zool., London, v.21, n.1:325 – 43.

Yön, NDK, Aytakin, Y, Yüce, R. 2008. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*), Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 51, n. 3:513-522.

Zaiden, S. F. 2000 Morfologia gonadal e metabolismo energético da piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual. Jaboticabal, 152 p. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura, UNESP.

Zaniboni-Filho, E, Kawakami de Resende, E. 1988. Anatomia de gônadas, escala de maturidade e tipo de desova do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). Rev. Brasil. Biol., 48(4): 833-44.



Figura 1 – Localização e detalhe do ovário de *M. boesemani*.

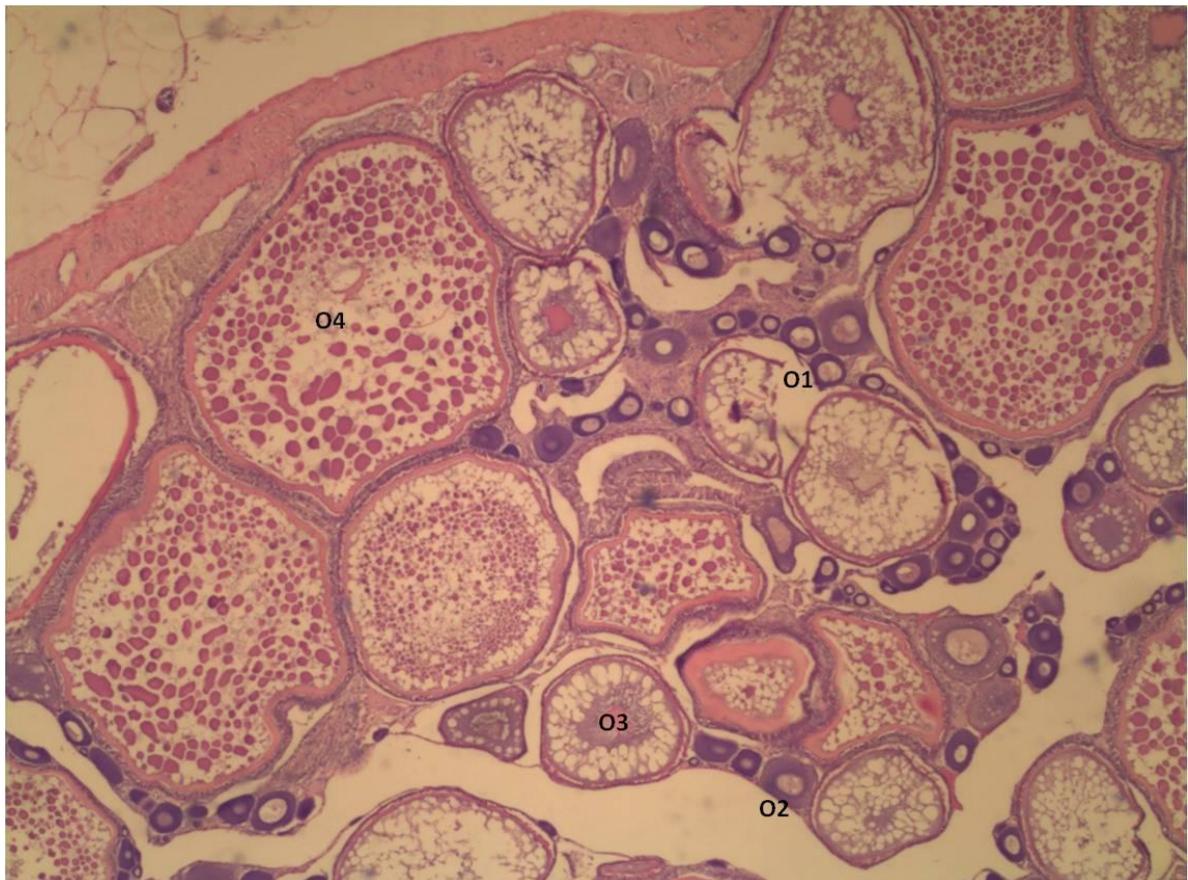


Figura 2 – Lamelas ovulíferas de *M. boesemani* com tipos ovocitários em todos os estádios (O1 – ovócito 1, O2 – ovócito 2, O3 – ovócito 3, O4 – ovócito 4). (Aumento 40x).

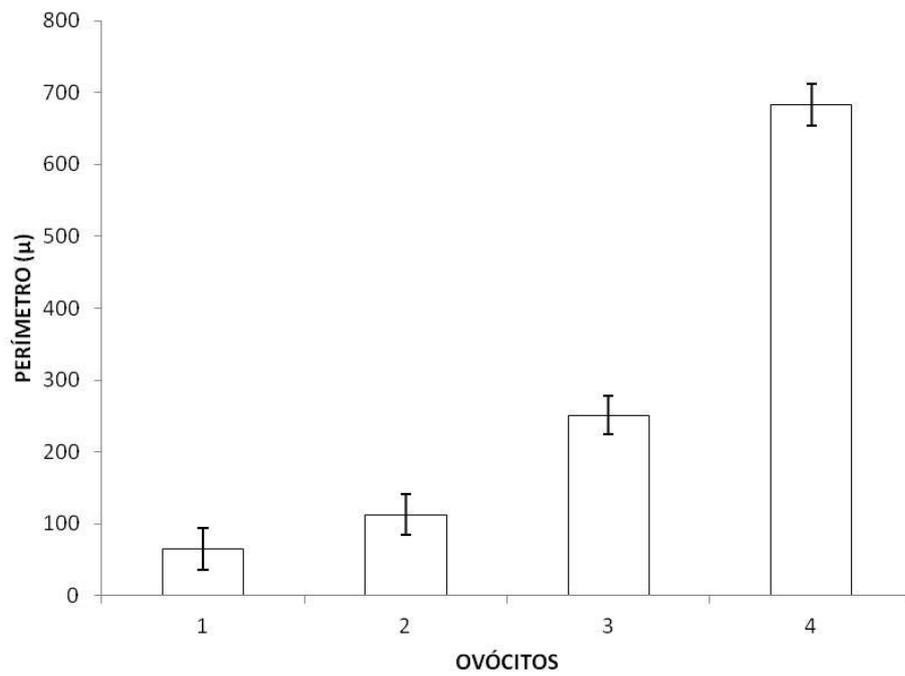


Figura 3 - Valores médios do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) dos ovócitos em diferentes fases de maturação do ovário de *M. boesemani*.

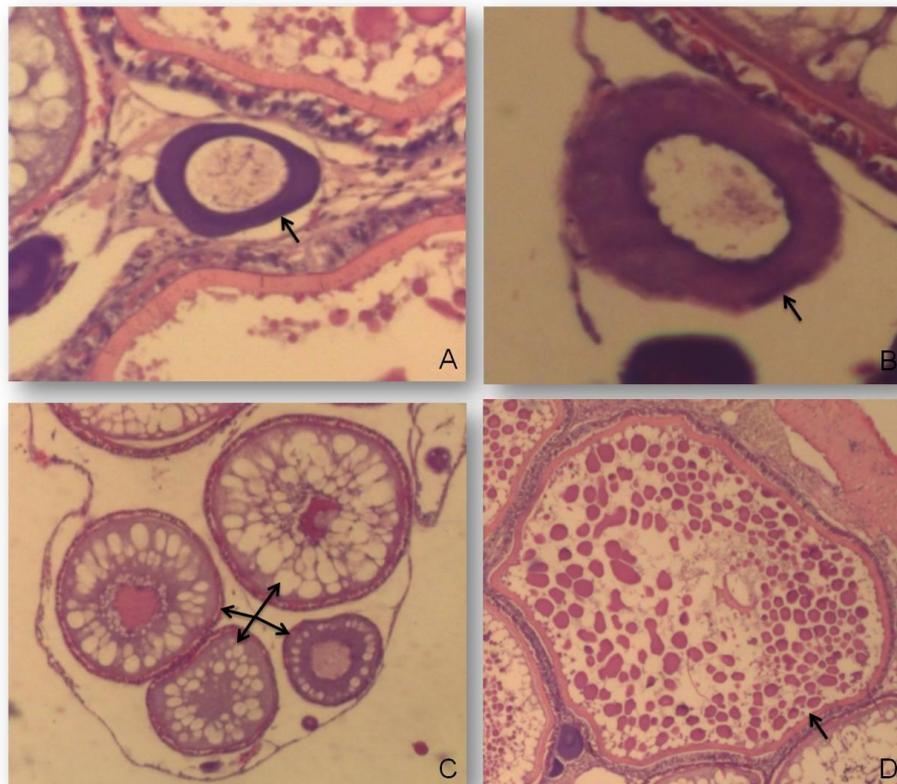


Figura 4 – Tipos ovocitários de *M. Boesemani* - indicados pela seta (A) – Ovócito 1, (B) – Ovócito 2, (C) – evolução do ovócito 3, (D) – Ovócito 4. (Aumento 100x).

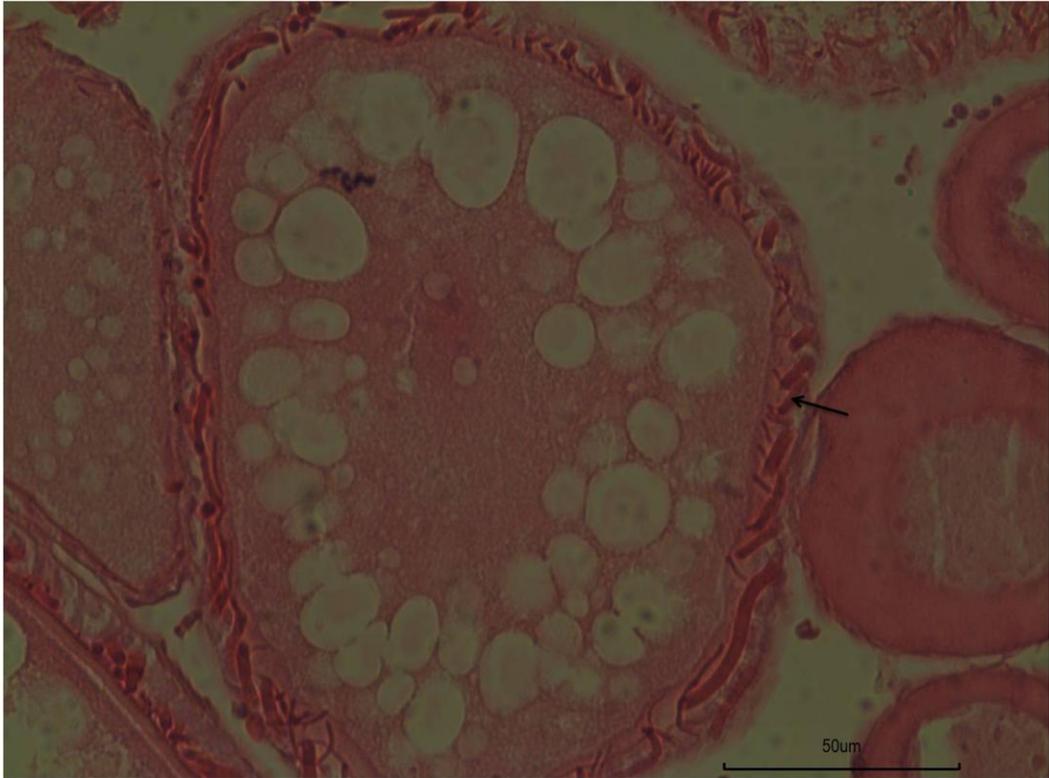


Figura 5 – Filamentos de adesão corados pela eosina em ovários de *M. boesemani* indicados pela seta. (Aumento 400x)

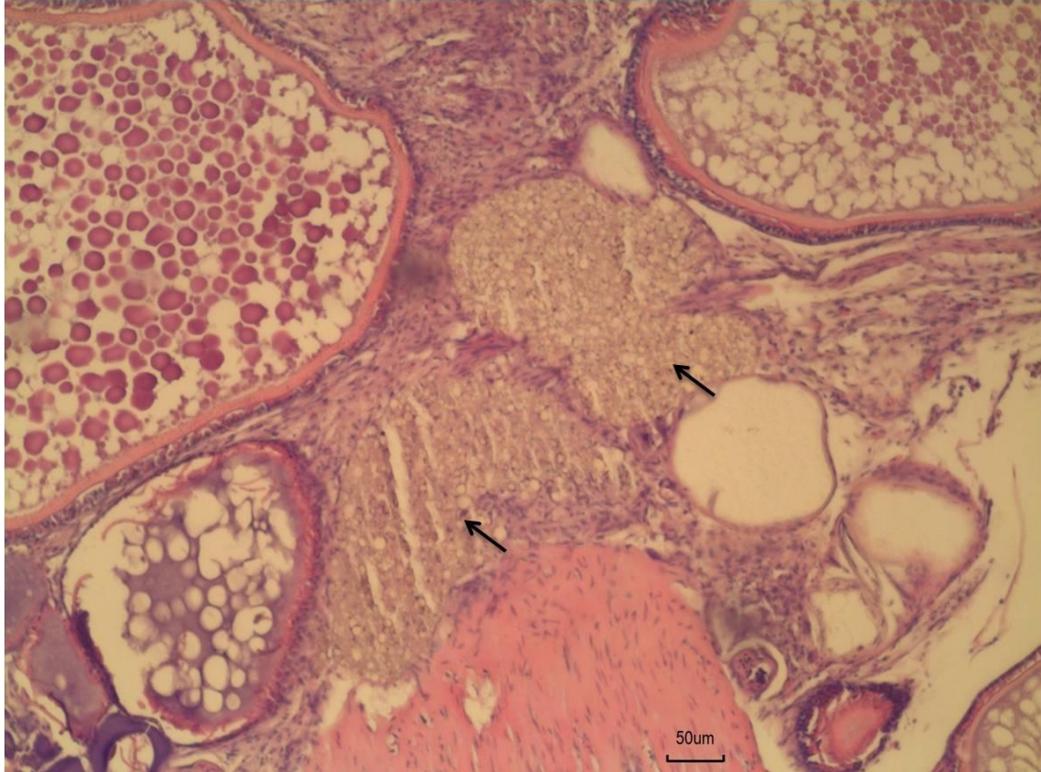


Figura 6 – Marcas de desova em ovários de *M. boesemani* – indicadas pela seta. (Aumento 400x).

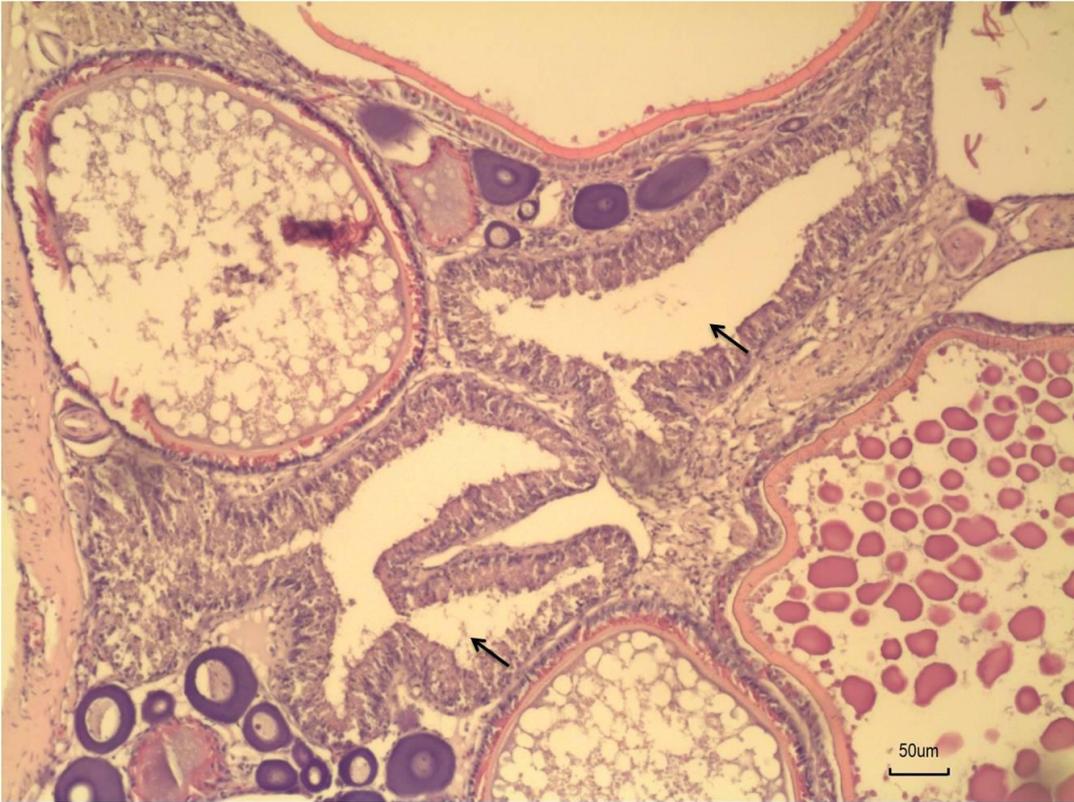


Figura 7 – Folículos vazios em ovário de *M. boesemani* – indicados pela seta. (Aumento 400x)

## 6. CAPÍTULO 2

O capítulo a seguir corresponde ao artigo integrante desta tese submetido como manuscrito ao jornal “**Zygote – Cambridge Journals**” (ISSN: 0967-1994) e, como tal, sua redação e edição foram preparadas segundo as normas deste periódico, normas essas constantes na página do mesmo na rede mundial de computadores conforme o endereço a seguir:

<http://journals.cambridge.org/action/displayMoreInfo?jid=ZYG&type=ifc&sessionId=98E4D7F5534401131B72C3E6DB3D2523.journals>

Data de acesso: 25/03/2014

## **Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário do peixe**

### ***Melanotaenia boesemani* (Allen e Cross, 1982)**

#### **Resumo**

No presente estudo, tem-se por objetivo fornecer dados sobre o tempo necessário para *Melanotaenia boesemani* completar o desenvolvimento embrionário e a influencia que a incubação realizada em águas com temperaturas diferentes causa na espécie. Os efeitos da temperatura sobre o tempo e a taxa de eclosão são apresentados, bem como informações relacionadas aos estágios de desenvolvimento embrionário. Após fertilização, os ovos foram mantidos em incubadoras a 23°C, 26°C, 29°C ou 32°C e observados nos horários pré determinados até o momento de eclosão das larvas. As fases de desenvolvimento foram identificadas e classificadas de acordo com características morfofisiológicas. Foram visualizadas gotículas de óleo no interior dos ovos e filamentos de adesão presentes no córion. O desenvolvimento embrionário foi similar ao observado em outras espécies do gênero *Melanotaenia*, com eclosão e desenvolvimento mais rápidos nas temperaturas mais elevadas.

**Palavras-chave:** temperatura, desenvolvimento embrionário, peixe ornamental, *Melanotaeniidae*.

#### **Introdução**

Embriões e larvas são muito vulneráveis às variações nos parâmetros físico-químicos que ocorrem no ambiente aquático (Laurence & Howell, 1981). Essas mudanças exercem marcante influência nos diversos processos metabólicos, podendo afetar diretamente a sobrevivência dos peixes, principalmente durante os estádios de desenvolvimento inicial (Laurence, 1975). A temperatura da água é considerada uma das variáveis que mais afetam o desenvolvimento dos organismos aquáticos (Rogers & Westin, 1981), devido à sua importância no controle de processos fisiológicos (Blaxter, 1992; Fuiman, 2002). Tanto a organogênese como o

desenvolvimento somático são controlados por enzimas e estas são afetadas pela variação da temperatura *in loco*.

A duração do período embrionário e a velocidade de consumo do vitelo são fortemente influenciadas pela temperatura da água circundante a desova (Petereit et al., 2008), podendo ocorrer desenvolvimento anormal de estruturas e o vitelo se exaurir antes que o embrião esteja pronto para eclosão.

O conhecimento da embriogênese é de grande importância, pois constitui ferramenta útil na localização de áreas de desova e no estudo do crescimento das espécies aquáticas em ambiente natural (Anjos e Anjos, 2006), além de fornecer informações relevantes para seu cultivo.

Os melanotênídeos são peixes bastante utilizados na aquarofilia e sua criação tem sido intensificado nas últimas décadas. A *Melanotaenia boesemani* é, dentre as espécies cultivadas da família, uma das mais apreciadas e valorizadas no mercado (Rainbowfish, 2014).

A despeito de serem muito aceitas no mercado, quase não existem registros acerca do desenvolvimento inicial de melanotênias. Diante de seu grande potencial de produção e alto valor de mercado, estudos a respeito desta espécie se tornam cada vez mais relevantes, em especial àqueles concernentes ao desenvolvimento embrionário e larval da espécie, visto que essas são áreas que, quando bem conhecidas, podem levar à melhoria na taxa de sobrevivência do plantel, principalmente durante a larvicultura, aumentando, assim, a eficiência da produção, além de servirem também como base para trabalhos de conservação da espécie em habitat natural.

Portanto, objetivou-se descrever a sequência dos processos ontogenéticos durante o desenvolvimento dos embriões da espécie *Melanotaenia boesemani*, assim como o tempo necessário para a ocorrência dos eventos morfofisiológicos em função da temperatura.

## **Material e métodos**

Foram utilizados ovos obtidos de desovas naturais de *Melanotaenia boesemani*, provenientes do plantel do setor de aquicultura da Universidade

Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Para tal, matrizes foram mantidas na proporção de um macho para cada fêmea, distribuídos por três aquários de 40 litros de capacidade volumétrica cada, numa temperatura próxima a 28°C. No total, foram utilizados 30 machos e 30 fêmeas.

Em cada aquário, foram colocados dois aguapés (*Eichhornia crassipes*), que serviram de estímulo à reprodução e de substrato para ovoposição. A cada meia hora os aguapés eram observados, a olho nu, até que foram encontrados ovos aderidos às raízes. Em cada observação onde não foi notada a presença de ovos os aguapés foram descartados e substituídos por outros.

As desovas ocorreram de forma espontânea e os ovos retirados das raízes dos aguapés, com auxílio de tesouras e pinças, foram dispostos em lâminas de vidro e imediatamente observados em microscópio óptico em aumento de 25x para caracterização e identificação do estágio embrionário. O diâmetro dos ovos foi determinado com o auxílio de ocular dotada de escala micrométrica.

Após a observação inicial, os ovos foram contados e transportados para 04 incubadoras com capacidade de 35L, dotadas de aeração e nas quais foram utilizados aquecedores com termostato automático com o intuito de manter a temperatura estável. Após aclimação, 105 ovos foram distribuídos entre 03 peneiras flutuantes de cada tratamento, onde ficaram durante o período de incubação até o momento da eclosão.

Para determinar a influência da temperatura no desenvolvimento embrionário da espécie, cada incubadora foi mantida em uma temperatura diferente, determinando assim os tratamentos: 23°C, 26°C, 29°C e 32°C. As ações descritas a seguir foram realizadas individualmente para cada aquário com sua respectiva temperatura-teste.

A observação do desenvolvimento dos embriões foi realizada da seguinte forma: a cada meia hora a partir do momento de fertilização até o final do período de gástrula, a cada 1h do início da fase de organogênese até o surgimento do coração e a cada 2h a partir do surgimento do coração até o momento de eclosão. A cada observação, alguns ovos foram retirados da peneira, colocados em lâminas de vidro, observados em microscópio óptico (25X). Ao final da observação, os ovos retornaram para suas respectivas peneiras. Os ovos não fecundados e/ou fungados

foram descartados e anotados para controle da quantidade. A fim de evitar a manipulação frequente de um mesmo ovo, foi mantida uma ordem para coleta com devolução em outra peneira de forma que um mesmo grupo de ovos não era manipulado em intervalo menor que 12 horas, pressupondo que a manipulação excessiva poderia afetar o seu desenvolvimento.

Os estágios de desenvolvimento embrionário foram identificados e caracterizados a partir do momento em que mais de 50 % dos ovos observados atingiram determinado estágio do desenvolvimento embrionário. A classificação dos estágios embrionários foi realizada segundo o proposto por Fujimoto et al. (2006), adaptado por Radael et al. (2013) para *Melanotaenia praecox*.

Para a mensuração de tempo e correlação com os eventos morfo-fisiológicos, foram utilizadas as medidas de horas-pós-fertilização (HPF), considerando-se como hora 0 a visualização de apenas 1 célula no ovo.

Para determinação de HPF para a eclosão e porcentagem de eclosão, após o período de descrição dos embriões, foi realizada nova desova. Esta foi acondicionada da mesma maneira que as demais nas incubadoras, porém, foram mantidas sem manipulação, representando assim, com maior exatidão, o tempo necessário para eclosão.

A cada observação dos ovos, a temperatura da água foi mensurada através de termômetro digital e o oxigênio foi medido uma vez por dia, pela manhã, utilizando oxímetro. O pH da água foi medido com o auxílio de medidor digital de pH, quatro vezes ao dia, às 6h, 12h, 18h e 24h.

Foi realizada estatística descritiva das variáveis, além de correlação de Pearson entre elas.

## **Resultados**

Os valores médios observados para os parâmetros físico-químicos da água da incubadora, durante o período experimental, foram de  $31,9 \pm 0,052^{\circ}\text{C}$  para a temperatura;  $6,9 \pm 0,022$  para o pH e de  $9,3 \pm 0,193$  mg/L para o oxigênio dissolvido na incubadora de  $32^{\circ}\text{C}$ . Para a incubadora de  $29^{\circ}\text{C}$ , foi de  $29,0 \pm 0,0307^{\circ}\text{C}$  para a temperatura;  $6,9 \pm 0,0081$  para o pH e de  $9,3 \pm 0,2156$  mg/L para o oxigênio

dissolvido. Na incubadora de 26°C foi de  $26,0 \pm 0,0327^\circ\text{C}$  para a temperatura;  $6,9 \pm 0,0099$  para o pH e de  $8,8 \pm 0,1745$  mg/L para o oxigênio dissolvido. Na incubadora de 23°C, os parâmetros observados foram de  $23,0 \pm 0,0314^\circ\text{C}$  para a temperatura;  $7,0 \pm 0,0100$  para o pH e de  $8,0 \pm 0,1361$  mg/L para o oxigênio dissolvido. Valores estes considerados satisfatórios para a espécie.

Os ovócitos recém-fertilizados de *M. boesemani* apresentavam forma esférica, com córion e saco vitelínico translúcidos e coloração levemente amarelada. Apresentaram tamanho médio de  $1,09 \pm 0,0158$  mm. Os ovos continham gotas de óleo de tamanho variado, inicialmente espalhadas pela vesícula vitelínica. Ao longo do desenvolvimento embrionário, estas gotas foram se agrupando na região da vesícula oposta ao blastodisco.

Os ovos possuíam filamentos extensos, cilíndricos e numerosos que se originavam de uma determinada área do córion, próxima ao polo animal. Esses filamentos mostravam características adesivas, pois aderiam ao substrato que entrava em contato com eles (raízes do aguapé, pinças etc.) e têm, portanto, a função de aderir o ovo a um suporte durante a desova e período de incubação. Ovos não fertilizados foram facilmente observados devido à coloração branco opaco que apresentavam.

Os ovos de *M. boesemani* puderam ser classificados como telolécitos por apresentarem vitelo concentrado no pólo vegetativo e o citoplasma com suas organelas no polo animal e também polilécitos, devido à grande quantidade de vitelo que possuem.

O padrão de clivagem foi meroblástica. A observação da sucessão de eventos que aconteceram durante o período de desenvolvimento embrionário permitiu a divisão em fases: clivagem, blástula, segmentação, organogênese e pré-eclosão.

O padrão inicial de divisão apresentou blastômeros se dividindo em média a cada 30 minutos, porém, a partir do momento em que a temperatura começou a fazer efeito sobre a incubação, esse espaçamento foi se modificando de acordo com a temperatura teste.

Os tempos para surgimento de cada fase do desenvolvimento ou estrutura embrionária encontram-se descritos na tabela 1 e na figura 1.

No período de clivagem (Fig.2–A, 2–B, 2–C, 2–D, 2–E, 2–F) foi possível observar nitidamente a divisão dos blastômeros de forma exponencial, até que esses alcançaram a fase de blástula, a partir da qual, não foi mais possível precisar a quantidade de células, embora seja possível observar as divisões ocorrendo. As células diminuem de tamanho na medida em que as divisões acontecem. A blastoderme é inicialmente organizada, semi-esférica e alta sobre a vesícula vitelínica. O desenvolvimento da blastoderme ocorreu com aumento do número de suas células sem ocasionar ainda aumento do seu tamanho até que o embrião estava com aproximadamente 1024 células, quando foi possível observar o avanço da blastoderme sobre a vesícula vitelínica.

Os eventos do processo de epibolia, em que o movimento das células blastodérmicas recobriu a massa vitelínica e pela migração, onde as células mais internas da blastoderme deslocaram-se dorsal e convergentemente, formando o eixo embrionário, caracterizaram a fase de gástrula. Nessa fase, a blastoderme formou uma pequena cúpula sobre a vesícula vitelínica, cúpula esta que aumentou gradativamente a cada observação, caracterizando, assim, o período da gástrula (Fig.2–G) que foi medido em porcentagem.

Ainda na gástrula, observou-se que houve um espessamento da borda marginal da blastoderme, formando o anel germinativo, onde iniciou-se um acúmulo de células perpendicular ao anel, que deu origem ao escudo embrionário sobre o qual formou-se posteriormente o eixo embrionário (Fig.2–H). O tempo de ocorrência desse evento variou de acordo com a temperatura de incubação, mas em todas elas ocorreu na fase de gástrula (tabela1).

Com a evolução gradativa da gástrula, as bordas da blastoderme foram se aproximando. Quando as bordas da blastoderme se fundiram, cobrindo totalmente a vesícula vitelínica, foi caracterizado o momento de fechamento do blastóporo (Fig.2–I).

A partir desse momento, iniciou-se o período de organogênese com a visível diferenciação de tecidos e órgãos do embrião. A diferenciação para todas as temperaturas seguiu uma ordem semelhante na ocorrência dos eventos, porém, com modificações no tempo de desenvolvimento de cada estrutura em função da temperatura testada.

A partir do desenvolvimento do eixo embrionário, uma das extremidades iniciou a diferenciação na porção anterior do corpo embrionário, mostrando-se de forma mais proeminente, dando origem à região cefálica do embrião (Fig.3–A). Nesta região, posteriormente a partir de uma evaginação ocorrida na parede lateral, surgiu o primórdio óptico (Fig.3–B e 3–C), visto inicialmente como um par de vesículas ópticas rudimentares, sem coloração e delimitação de estruturas. Ao longo do desenvolvimento, foi possível observar a diferenciação da retina no primórdio óptico que surgiu de forma mais delimitada e um pouco mais escura na região central, sendo denominada a partir desse momento de vesícula óptica (Fig.3–F).

Na região mediana do embrião ocorreu a diferenciação de somitos rudimentares (Fig.3–E), que darão origem às vértebras, costela e musculatura axial. Estes, a princípio, apresentaram-se em poucos pares e tinham forma elíptica. Durante o desenvolvimento foram surgindo outros pares e, após algum tempo, adquiriram a forma de “v”. A vesícula de Kupffer (Fig.3–D) surgiu na região oposta à cabeça e apresentou-se com o formato de uma bolha.

Na região cefálica do embrião, foi possível visualizar a estrutura cranial cartilaginosa que dará origem a base do crânio que sustentará o encéfalo. Essa estrutura localizava-se na região sagital e com a porção mediana mais escura, sendo denominada condrocânio (Fig.3–F). Ainda na região cefálica, foi visualizada a vesícula ótica onde inicialmente estavam presentes um par de otólitos (Fig.3–H) e, no final do desenvolvimento, 2 pares eram visíveis em cada vesícula.

O coração embrionário foi observado inicialmente como uma simples região da veia axial na mesoderme que inicia movimentos peristálticos, promovendo lentamente a circulação do sangue. Mais tarde, o coração passou a ter duas câmaras definidas, trabalhando em movimentos antagônicos de sístole e diástole, representando o átrio e o ventrículo.

Melanóforos (Fig.3–G) surgiram aleatoriamente ao longo do eixo embrionário, passando logo depois para a vesícula vitelínica. Inicialmente, eram dendríticos, assumindo ao longo do desenvolvimento o formato puntiforme. Sobre o eixo embrionário, iniciou-se a circulação, a princípio, lentamente e com hemácias elípticas, tornando-se arredondadas e com maior fluxo ao longo do desenvolvimento. Inicialmente, a circulação era incolor, mas assumiu o tom avermelhado, assim como

surgiram ramificações dos vasos sanguíneos, promovendo irrigação sanguínea sobre a região periférica do vitelo.

As contrações musculares iniciaram com pouca frequência na repetição dos espasmos, mas, foram se intensificando, em especial, próximo ao momento da eclosão. Nessa fase, os animais se movimentavam de forma intensa, inclusive com movimentos rotatórios dentro do ovo. As nadadeiras peitorais (Fig.3-I), que iniciaram seu desenvolvimento ainda na fase embrionária, próximo à eclosão, movimentaram-se com batimentos rápidos e bem espaçados.

Após o desenvolvimento da pigmentação do cristalino e da pigmentação da retina os olhos passaram a mover-se. Foi possível identificar o delineamento da boca, que se abriu mesmo antes da eclosão e apresentou movimentos lentos e espaçados.

Nas últimas observações antes da eclosão das larvas, observou-se que os embriões estavam muito pigmentados e que o espaço perivitelínico no ovo era muito reduzido. A saída das larvas mediante o rompimento do córion aconteceu de maneira muito rápida. A bexiga natatória inflou rapidamente, conferindo às larvas grande habilidade natatória e agilidade. Elas apresentavam rápida movimentação dos opérculos, movimentação da boca e do trato digestório e também apresentavam otólitos evidentes. Foi possível observar que as larvas recém-eclodidas continham um volume residual de vitelo e nesse resíduo ainda foi possível visualizar gotas de lipídeos. As larvas encontravam-se bastante pigmentadas, com os olhos escuros e muitos melanóforos espalhados por todo o corpo (Fig. 4).

Os embriões que eclodiram tardiamente (temperatura de incubação de 23°C) apresentavam menor quantidade aparente de vitelo, mais pigmentação, melanóforos maiores e em maior concentração. Estes embriões eram menos ágeis que os que nasceram com menor tempo de incubação.

Dentre os eventos descritos, em alguns foi possível observar uma diferença muito grande para o tempo de ocorrência entre a maior e menor temperatura. Alguns exemplos foram o fechamento do blastóporo, que ocorreu com praticamente a metade do tempo na temperatura de 32°C em relação à de 23°C e também para a primeira eclosão que na temperatura de 32°C ocorreu às 107,15hpf e na temperatura de incubação de 23°C ocorreu somente com 253,58hpf.

O tempo de surgimento dos eventos morfofisiológicos observados durante o desenvolvimento de embriões de *M. boesemani* foi correlacionado e os resultados mais significativos podem ser observados na tabela 2.

Os ovos da incubadora de 32°C tiveram índice de eclosão de 20,9%, os da incubadora de 29°C tiveram 57,3%, na incubadora de 26°C a taxa de eclosão foi de 51,8% e na de 23°C foi de 49,1%.

## Discussão

O desenvolvimento embrionário de *Melanotaenia boesemani* apresentou características semelhantes às da maioria dos teleósteos de água doce, sendo evidentes as fases de segmentação, formação de blástula, gástrula, fechamento do blastóporo, organogênese, liberação da cauda e eclosão.

O tipo de ovo (telolécito) e de segmentação (meroblástica) referentes à espécie estudada também é próprio dos peixes teleósteos, com presença de grande quantidade de vitelo e blastômeros no pólo animal (Leme dos Santos & Azoubel, 1996; Garcia & Fernandez, 2001).

Os ovos de *M. boesemani* apresentaram diâmetro médio próximo aos de outros melanotenídeos, como os de *Melanotaenia praecox* que foi de 1,02 mm  $\pm$  0,01 (Radael et al., 2013), *Glossolepis incisus* que foi de 0,90 mm a 1,10 mm (Ferreira, 2007), *Melanotaenia splendida australis* com 1,07 mm (Ivantsoff et al., 1988), de *Melanotaenia nigrans* com média de 1,05 mm e de *Melanotaenia splendida inornata* com média de 0,88 mm (Reid & Holdway, 1995).

Os filamentos adesivos verificados nos ovos, neste trabalho, foram descritos também em trabalhos referentes a outros melanotenídeos, demonstrando ser, a adesividade dos ovos, uma estratégia reprodutiva característica da família (RADAEL et al., 2013; FERREIRA, 2007).

A disposição e agregação de gotas de óleo verificada nos ovos recém-fecundados foi a mesma observada e descrita em *M. praecox*, *Glossolepis incisus* e *Betta splendens* (Radael et al., 2013; Ferreira, 2007; Duarte et al., 2012).

As fases iniciais da clivagem não apresentaram grande divergência dos tempos de ocorrência nas temperaturas utilizadas. Este fato pode estar relacionado

ao fato de que os ovos poderiam não estar sofrendo ainda influência da temperatura, uma vez que a distribuição destes nas incubadoras somente ocorreu após a fecundação.

Já na fase de gástrula, a distinção do tempo de ocorrência dos eventos começou a ser evidente em função das temperaturas de incubação. Nesta fase ocorreu a diferenciação do eixo embrionário primeiramente na temperatura de 32°C e seguiu uma ordem decrescente até surgir finalmente nos embriões da incubadora com 23°C. Humphrey et al. (2003) citam que em *Melanotaenia splendida* também foi possível observar a diferenciação do eixo embrionário no período de gástrula, ocorrendo, na referida espécie, próximo ao momento de gástrula 70%.

O fechamento do blastóporo é um evento importante por ser considerado o período em que se pode confirmar a fecundação do ovócito e caracteriza o final do processo de epibolia. Nos embriões de *M. boesemani*, incubados a 32°C, o fechamento do blastóporo ocorreu às 14,13hpf, antes das demais temperaturas teste (tabela 1), essa fase foi descrita para *M. praecox* (30°C) às 13,99 hpf, para *M. nigrans* e *M. s. inornata* este evento foi observado próximo às 18,0 hpf (Reid e Holdway, 1995), em *M. s. splendida* próximo às 12,5 hpf (Humphrey et al., 2003) e em *G. incisus* às 11,8 hpf (Ferreira, 2007). Em peixes endêmicos do Brasil, percebe-se um desenvolvimento embrionário mais rápido. Foi observado, por exemplo, para embriões de *Brycon orbygnianus* com 6,5 hpf (Reynalte-Tataje et al., 2004) e para *Brycon insignis* 5,5 hpf (Souza, 2004).

Os eventos da organogênese demonstraram a mesma tendência de desenvolvimento, com a diferenciação ocorrendo, geralmente, primeiro na temperatura mais elevada e posteriormente nas demais. Em estudo realizado com *Sprattus sprattus* (Petereit et al., 2008), o desenvolvimento do ovo também era dependente da temperatura, evidenciando que, com o aumento da temperatura, o período de incubação desde a fecundação até eclosão se reduz.

As eclosões dos embriões de *M. boesemani* ocorreram primeiramente na incubadora de 32°C (maior temperatura), com aproximadamente 04 dias e com diferença de 146,43hpf para a primeira eclosão da incubadora de 23°C (menor temperatura). A temperatura de 26°C foi a que apresentou maior duração do tempo de eclosão, com intervalo de 93,68hpf entre a primeira e a última eclosão.

O tempo de desenvolvimento embrionário apresentado é considerado relativamente alto quando comparado com os peixes brasileiros (Nakatani et al., 2001; Reynalte-Tataje et al., 2004), como, por exemplo, *Symphysodon aequifasciatus*, que em trabalho realizado com água de incubação à aproximadamente 28°C começou a eclodir com 55,5 hpf (Mattos et al., 2014), contudo, o tempo de desenvolvimento embrionário entre 6 e 7 dias é comumente observado na literatura para animais do gênero *Melanotaenia*. Para *M. s. inornata* e *M. niigrans*, Ivantsoff et al. (1988) observaram tempo de eclosão entre 4 a 5 dias na temperatura de 26°C. Para *M. fluviatilis*, o período de eclosão observado foi entre 7 e 9 dias (Reid & Holdway, 1995). Em *M. s. splendida* o tempo para eclosão observado esteve entre 4 e 8 dias (Humphrey et al., 2003).

Neste trabalho, a saída das larvas mediante o rompimento do córion aconteceu de maneira muito rápida, semelhantemente ao observado por Humphrey et al. (2003) para *M. s. splendida*. As larvas recém-eclodidas, do mesmo modo que *M. s. splendida* (Humphrey et al., 2003) e *M. fluviatilis* (Reid e Holdway, 1995), eram muito ativas e possuíam muita habilidade natatória. As larvas recém-eclodidas possuíam rápida movimentação dos opérculos, movimentação da boca e do trato digestório e também apresentavam otólitos proeminentes como observado em *M. fluviatilis* (Reid e Holdway, 1995), *M. s. splendida* (Humphrey et al., 2003) e *M. praecox* (Radael et al., 2013).

A maioria dos estádios embrionários elencados (expressos em horas após a fecundação) apresentou mais de uma correlação significativa (tabela 2). Esperavam-se correlações apenas entre eventos temporalmente próximos, entretanto foi observada correlação entre 64 células (desenvolvimento recente) e a diferenciação de cabeça e cauda, próximo ao fechamento do blastóporo. Também, foi observada correlação entre 128 células (desenvolvimento recente) e o surgimento de somitos, que ocorre somente após o fechamento do blastóporo, no período da organogênese.

Entre eventos temporalmente próximos, e mais adiantados, foi observada alta correlação, como entre o fechamento do blastóporo e a diferenciação de cabeça e cauda, entretanto entre a diferenciação do eixo embrionário e a primeira eclosão, que são temporalmente distantes, também foi observada alta correlação. O que

demonstra que a correlação, nesse caso, existe tanto entre os eventos próximos, como para os eventos distantes no tempo de desenvolvimento e entre si.

Portanto, de modo geral, desde que os ovos sejam incubados dentro dos limites ecológicos para a espécie, temperaturas elevadas aceleram os processos biológicos, resultando em um período de incubação menor que os observados em temperaturas mais baixas (Lasker, 1964). Porém, é importante que a temperatura adotada, além de acelerar o processo de incubação, permita o nascimento de larvas viáveis e com bom índice de eclosão.

Para *M. boesemani*, a temperatura de incubação de 29°C, apesar de não ter sido a que apresentou menor tempo de incubação, foi a temperatura que demonstrou melhor porcentagem de eclosão com maior viabilidade visual das larvas, sendo, desta forma, a temperatura sugerida para a incubação de embriões da referida espécie.

## **Agradecimentos**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

## **Referências**

Anjos, H.D.B., Anjos, C.R. (2006). Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em laboratório. *B. Inst. Pesca* **32**, 151-160.

Blaxter J.H.S. (1992) The effect of temperature on larval fishes. *Neth J. Zool* **42**, 336–357.

Duarte, S.C. (2009). Ontogenia Inicial e Consumo de Vitelo em Embriões de *Betta splendens*. Dissertação (Mestrado) – Curso de Aquicultura Continental, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 52 f.

Duarte, S.C., Vasconcellos, B.F., Vidal Júnior, M.V., Ferreira, A.V., Mattos, D.C., Branco, A.T. (2012). Ontogeny and embryonic description of *Betta splendens*, Perciformes (Regan, 1910). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **13**(3), 880-893.

- Ferreira, A.V. (2007). Ontogenia Inicial e Consumo de Vitelo em Embriões de Melanotênia maçã (*Glossolepis incisus*, WEBER, 1907). Dissertação (Mestrado) – Curso de Produção Animal, UENF, Campos dos Goytacazes, Campos dos Goytacazes, 64 f.
- Fuiman L.A. (2002). Special considerations of fish eggs and larvae. In: Fuiman LA, Werner RG (eds) *Fishery science: the unique contributions of early life stages*. Blackwell Science, Oxford, 1–32.
- Garcia, S.M.L.; Fernandez, C.G. (2001). *Embriologia*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 350 pp.
- Humphrey, C., Klumpp, D. W. & Pearson, R. (2003). Early development and growth of the east rainbowfish, *Melanotaenia splendida splendida* (Peters). I. Morphogenesis and ontogeny. *Mar. Freshwater Res.* 54, 17–25.
- Ivantsoff, W., Crowley, L.E.L.M., Howe, E. & Semple, G. (1988). Biology and early development of eight fish species from the Alligator Rivers Region. Technical memorandum 22, Supervising Scientist for the Alligator Rivers Region.
- Lasker R. (1964) An experimental study of the effect of temperature on the incubation time, and growth of Pacific sardine embryos and larvae. *Copeia* 2:399–405
- Laurence, G.C. (1975.) Laboratory Growth and Metabolism of the Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus* from Hatching through Metamorphosis at Three Temperatures. *Mar Biol* **32**, 223-229.
- Laurence G.C. & Howell, W.H. (1981). Embryology and Influence of Temperature and Salinity on Early Development and Survival of Yellowtail Flounder *Limanda ferruginea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser* **6**, 11-18.
- Leme dos Santos, H., Azoubel, R. (1996). *Embriologia comparada*. Jaboticabal: FUNEP, 189 pp.
- Mattos, D.C., Cardoso, L.D., Fosse, P.J., Radael, M.C., Fosse Filho, J.C., Manhães, J.V.A., Andrade, D.R., & Vidal Jr, M.V. (2014). Description of the ontogenic and larval period of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Zygote*, 1-7.
- Nakatani, K. (2001). *Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce: Desenvolvimento e Manual de identificação*. EDUEM : UEMNupélia, Maringá, 378 pp.
- Petereit, C., Haslob, H., Kraus, G., Clemmesen, C. (2008). The influence of temperature on the development of Baltic Sea sprat (*Sprattus sprattus*) eggs and yolk sac larvae. *Mar Biol* **154**, 295-306.

Radael, M.C., Cardoso, L.D., Andrade, D.R., Mattos, D.C., Motta, J.H.S., Manhães, J.V. & Vidal Jr, M.V. (2013). Morphophysiological characterization of the embryonic development of *Melanotaenia praecox* (Weber & de Beaufort, 1922). *Zygote* **9**, 1–7.

Rainbowfish. 2014. Disponível em: <  
<http://rainbowfish.angfaql.org.au/Boesemani.htm> > Acesso em: 24 de abril de 2014.

Reid, H.P. & Holdway, D.A. (1995). Early development of the Australian crimson-spotted rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis* (Pisces:Melanotaeniidae). *Mar. Freshwater Res.* **46**, 475–80.

Reynalte-Tataje, D.R., Zaniboni-Filho, E. & Esquivel, J.R. (2004). Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Scientiarum* **26**, 67–71.

Rogers B.A. & Westin D.T. (1981). Laboratory Studies on Effects of Temperature and Delayed Initial Feeding on Development of Striped Bass Larvae. *Am Fish Soc* **110**, 100-110.

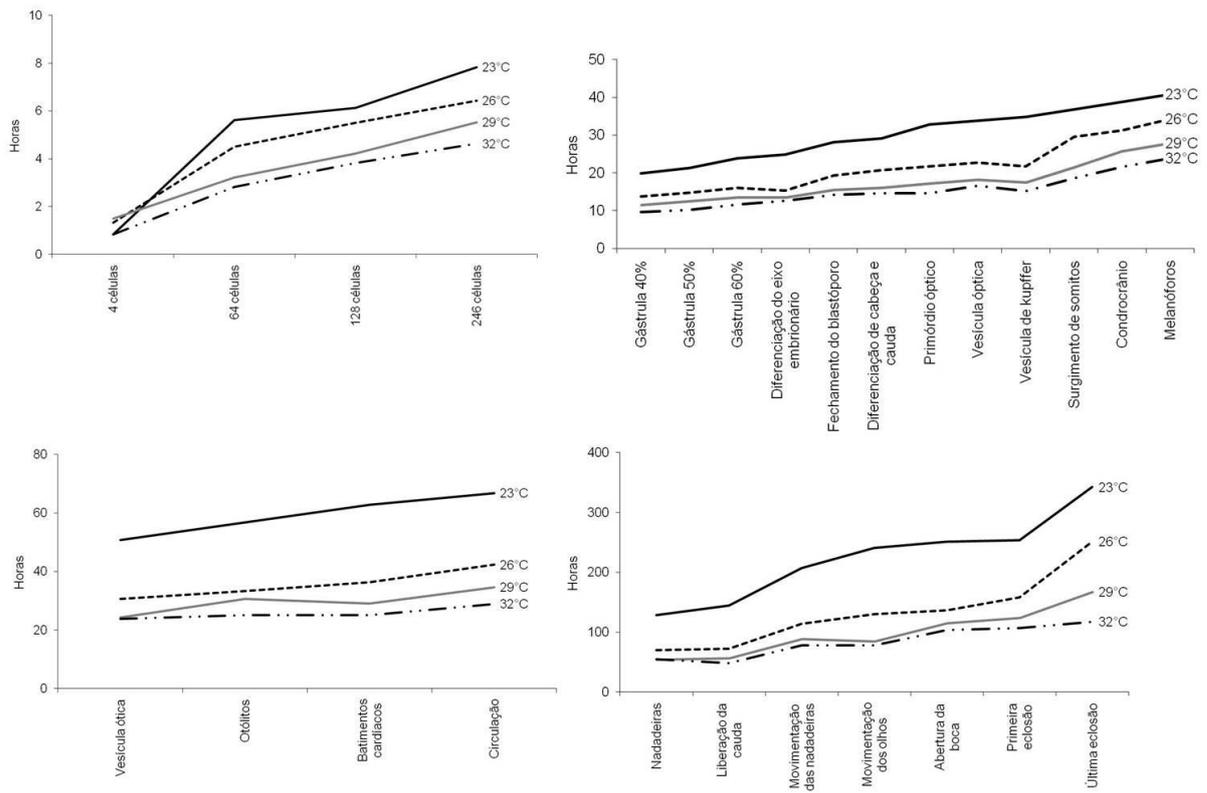
Souza, G. (2004). Reprodução Induzida, Ontogenia Inicial, etologia larval e alevinagem da piabanha (*Brycon insignis*, STEIDACHNER, 1877). Dissertação (Mestrado) – Curso de Produção Animal, Departamento de Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 67 pp.

TABELA 1 – Cronologia dos eventos e estágios embrionários de *Melanotaenia boesemani* em horas pós-fecundação, incubados a 23°C, 26°C, 29°C ou 32°C.

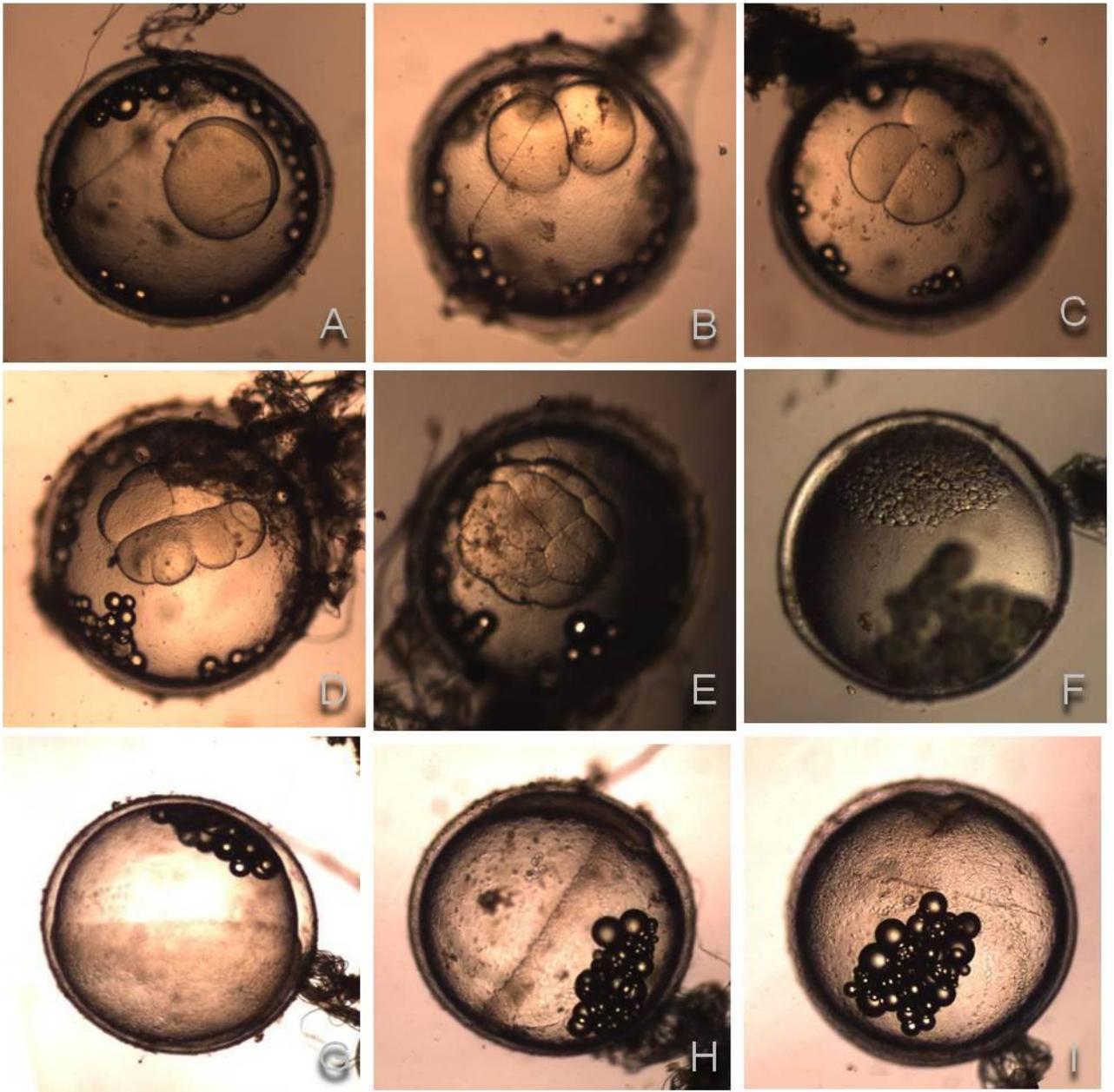
EVENTO/ESTÁGIO	Horas pós-fecundação			
	23°C	26°C	29°C	32°C
4 células	0,83	1,33	1,50	0,83
64 células	5,63	4,50	3,22	2,83
128 células	6,13	5,50	4,22	3,83
246 células	7,83	6,43	5,53	4,63
Gástrula 40%	19,83	13,81	11,62	9,63
Gástrula 50%	21,33	14,81	12,40	10,23
Gástrula 60%	23,83	15,98	13,45	11,63
Diferenciação do eixo embrionário	24,83	15,31	13,45	12,63
Fechamento do blastóporo	28,13	19,31	15,45	14,13
Diferenciação de cabeça e cauda	29,17	20,81	15,95	14,63
Primórdio óptico	32,83	21,81	17,12	14,63
Vesícula óptica	33,83	22,81	18,12	16,63
Vesícula de kupffer	34,83	21,81	17,45	15,13
Surgimento de somitos	36,83	29,51	21,45	18,63
Condrocrânio	38,83	31,31	25,67	21,63
Melanóforos	40,83	34,31	27,88	23,92
Vesícula ótica	50,83	30,58	24,45	23,92
Otólitos	56,83	33,31	30,68	25,05
Batimentos cardíacos	62,83	36,31	29,12	25,05
Circulação	66,83	42,31	34,67	28,88
Nadadeiras	128,83	70,31	54,47	55,13
Liberção da cauda	144,83	72,41	56,47	48,63
Movimentação das nadadeiras	206,83	114,31	88,47	77,93
Movimentação dos olhos	240,83	130,31	84,40	77,93
Abertura da boca	250,83	136,31	114,47	103,65
Primeira eclosão	253,58	157,88	123,97	107,15
Última eclosão	342,30	251,56	167,32	117,65

TABELA 2 – Correlação entre os eventos ontogenéticos no desenvolvimento embrionário de *Melanotaenia boesemani*.

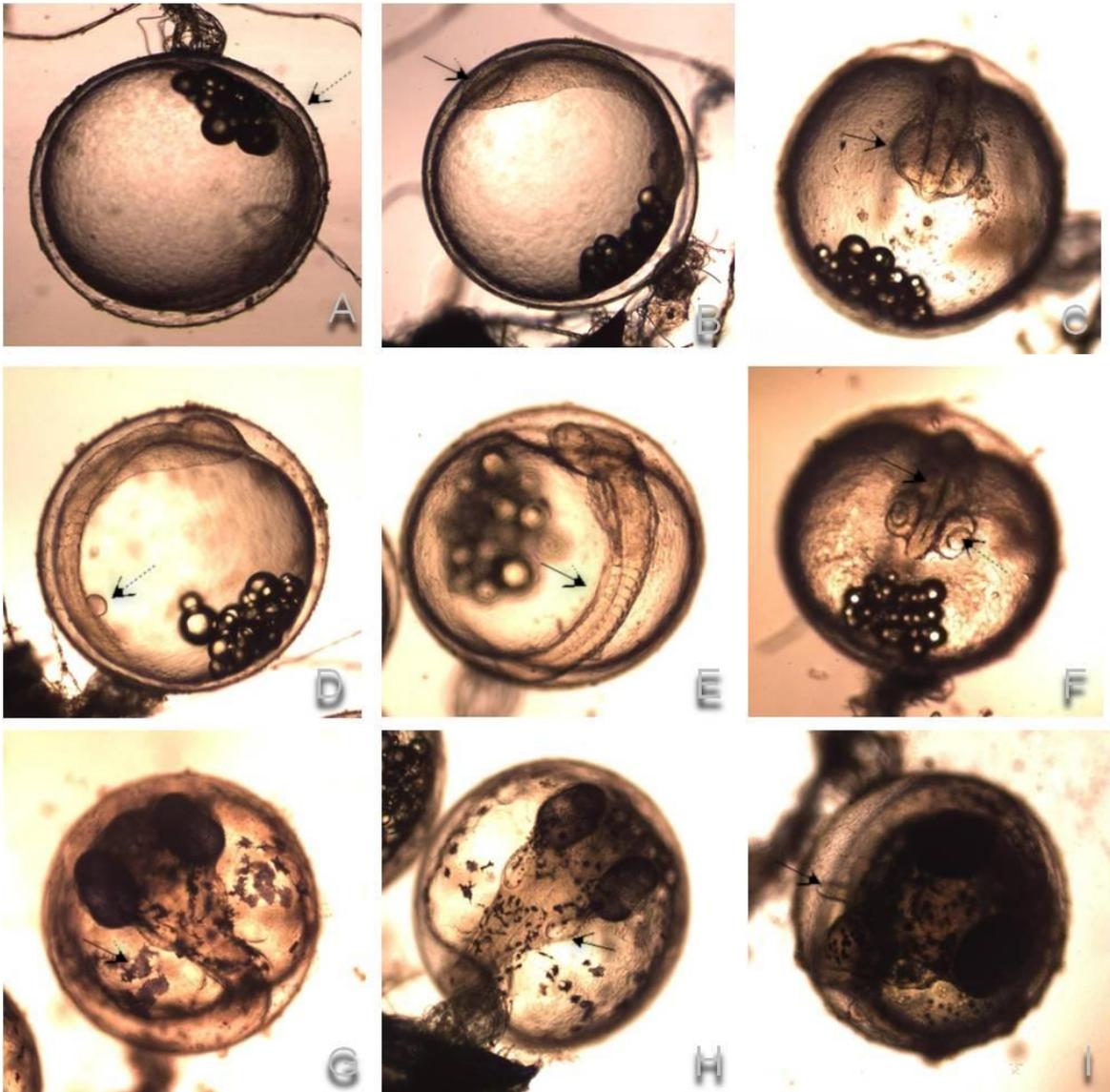
EVENTOS	CORRELACIONADOS	CORRELAÇÕES	SIGNIFICÂNCIA
64 células	Diferenciação do eixo embrionário	92,37%	3,81
64 células	Fechamento do blastóporo	97,20%	1,40
64 células	Diferenciação de cabeça e cauda	98,44%	0,78
64 células	Surgimento dos somitos	99,99%	0,00
64 células	Condrocrânio	99,32%	0,00
64 células	Melanóforos	99,53%	0,00
64 células	Circulação	96,26%	1,87
64 células	Primeira eclosão	96,41%	1,79
64 células	Circulação	96,26%	1,87
128 células	Surgimento de somitos	99,17%	0,00
128 células	Melanóforos	98,90%	0,55
256 células	Gástrula 40%	98,52%	0,74
256 células	Gástrula 50%	98,57%	0,71
256 células	Primórdio óptico	97,89%	1,06
256 células	Vesícula óptica	96,75%	1,63
256 células	Condrocrânio	99,87%	0,00
256 células	Surgimento de somitos	98,86%	0,57
256 células	Melanóforos	99,61%	0,00
256 células	Circulação	97,24%	1,38
256 células	Primeira eclosão	96,81%	1,60
Gástrula 50%	Fechamento do blastóporo	99,50%	0,00
Gástrula 50%	Primórdio óptico	99,83%	0,00
Gástrula 50%	Vesícula óptica	99,41%	0,00
Gástrula 50%	Vesícula de kupffer	99,56%	0,00
Gástrula 50%	Otólito	98,59%	0,71
Gástrula 50%	Batimento cardíaco	99,17%	0,00
Gástrula 50%	Circulação	99,78%	0,00
Gástrula 50%	Liberção da cauda	98,39%	0,80
Gástrula 50%	Primeira eclosão	99,58%	0,00
Diferenciação do eixo embrionário	Vesícula de kupffer	99,28%	0,00
Diferenciação do eixo embrionário	Otólitos	99,44%	0,00
Diferenciação do eixo embrionário	Abertura de boca	100%	0,00
Diferenciação do eixo embrionário	Primeira eclosão	99,18%	0,00
Diferenciação do eixo embrionário	Movimentação de nadadeiras	99,80%	0,00
Fechamento do blastóporo	Diferenciação de cabeça e cauda	99,81%	0,00
Fechamento do blastóporo	Vesícula óptica	99,99%	0,00
Fechamento do blastóporo	Vesícula de kupffer	99,88%	0,00
Fechamento do blastóporo	Vesícula ótica	99,22%	0,00
Fechamento do blastóporo	Circulação	99,76%	0,00
Fechamento do blastóporo	Liberção da cauda	99,15%	0,00
Fechamento do blastóporo	Movimentação das nadadeiras	99,57%	0,00
Fechamento do blastóporo	Movimentação dos olhos	99,82%	0,00
Fechamento do blastóporo	Primeira eclosão	99,92%	0,00
Vesícula de kupffer	Primeira eclosão	100%	0,00
Movimentação das nadadeiras	Primeira eclosão	99,78%	0,00
Movimentação dos olhos	Primeira eclosão	99,75%	0,00
Abertura de boca	Primeira eclosão	99,20%	0,00



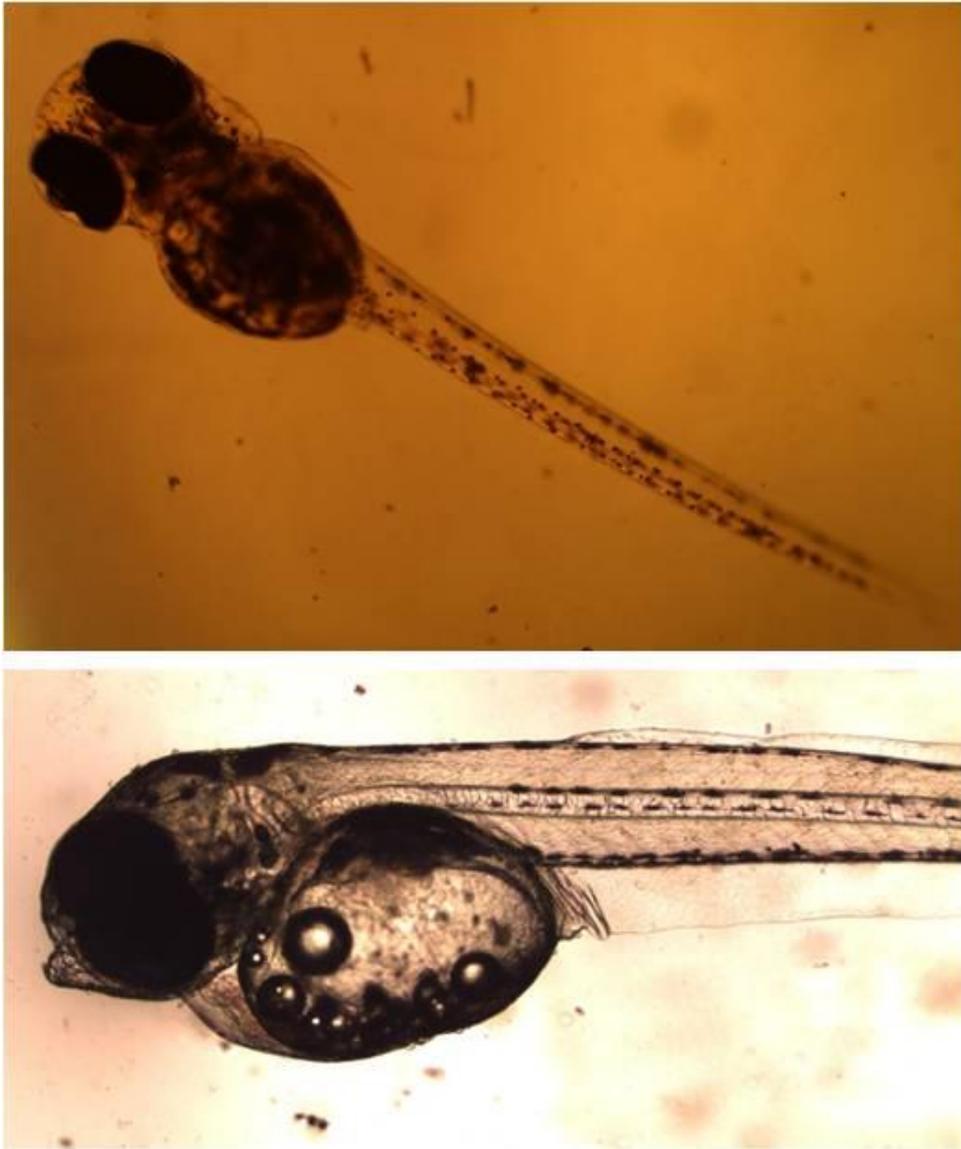
**Figura 1** – Cronologia dos eventos e estágios embrionários de *Melanotaenia boesemani* em horas pós-fecundação, incubados a 23°C, 26°C, 29°C ou 32°C.



**Figura 2** – Etapas do período de clivagem de *M. boesemani*. A à F – Período de clivagem de *M. boesemani*. 2 – A uma célula, 2 – B duas células, 2 – C quatro células, 2 – D oito células, 2 – E dezesseis células, 2 – F duzentos e quarenta e seis células. 2 – G gástrula 50%, 2 – H diferenciação do eixo embrionário, 2 – I fechamento do blastóporo. Aumento 100x.



**Figura 3** – Etapas do período de organogênese em *M. boesemani*. As setas indicam as estruturas descritas. 3 – A diferenciação de cabeça e cauda com seta indicando região da cabeça. 3 – B e C primórdio óptico, vista lateral e superior, respectivamente. 3 – D vesícula de Kupffer. 3 – E somitos. 3 – F condrocânio e início da formação da retina (vesícula óptica). 3 – G melanóforos. 3 – H otólitos na vesícula ótica. 3 – I nadadeiras. Aumento 100x.



**Figura 4** – Larvas recém-eclodidas de *M. boesemani*. Aumento 40x.

## 7. CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A *Melanotaenia boesemani* é uma espécie que em condições adequadas como água em temperatura ideal, alimentação de qualidade e substratos para ovoposição, pode desovar durante todo o ano. As fêmeas desovam quase que diariamente, fazendo pequenos intervalos de um ou dois dias e retornando a desovar novamente.

Possuem ovário único e as observações das lâminas histológicas confirmaram a possibilidade de desova intermitente, dado que nas lamelas existem ovócitos em vários estádios de desenvolvimento. Os tipos ovocitários encontrados são os mesmos descritos para outros teleósteos. Foi notado também que a maioria dos ovários observados tinha características de maturação avançada, mas apresentava, além disso, aspecto de desova recente como a presença de folículos vazios, o que pode estar relacionado com o tipo de desova da espécie. Devido a este fator, foi criado uma escala de maturidade gonadal e os animais foram classificados como F3R (maduro/em reprodução).

Outro fator peculiar visualizado foi a presença de filamentos proteicos de adesividade, presentes a partir dos ovócitos III e presentes nos ovos desovados.

Quanto à embriologia da espécie, nota-se um lento desenvolvimento, resultando em longo período de incubação, uma característica da família, mas que pode ser um entrave em cultivos com água em baixa temperatura (menor que 24°C), pois a maioria dos ovos torna-se inviável durante a incubação, portanto, águas com

temperatura entre 25°C e 30°C são mais adequadas. A temperatura de incubação, portanto, influencia diretamente no desenvolvimento e na eclosão.

No desenvolvimento embrionário foi possível notar que embriões apresentam distintas taxas de eclosão quando estão sendo utilizados no experimento e quando não há manipulação. Provavelmente, o aquecimento no microscópio e a passagem do ovo pela pipeta podem, em alguns casos, danificar o córion ou influenciar em fatores do desenvolvimento e, por isso, essa diferença ocorre.

Diante disso, sugere-se que, em trabalhos desse tipo, os ovos utilizados sejam retirados do experimento após observação. Porém, quando se trabalha com reprodução natural e conseqüente com menor número de ovos, isso nem sempre é possível e, para tal, recomenda-se a utilização de rodízio dos ovos, tal qual foi realizado no experimento descrito no artigo II, pois, dessa forma, é possível diminuir a quantidade de vezes que um mesmo ovo é observado e minimizam-se os efeitos provocados pela manipulação.