

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Remoção da adesividade em ovos de**  
***Pseudoplatystoma fasciatum***

**Daniel Guimarães Figueiredo Ariki**  
***Zootecnista***

Jaboticabal, São Paulo  
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Remoção da adesividade em ovos de**  
***Pseudoplatystoma fasciatum***

**Daniel Guimarães Figueiredo Ariki**

**Orientador: Dr. Sergio Ricardo Batlouni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo  
2014

F476r Figueiredo-Ariki, Daniel Guimarães  
Remoção da adesividade em ovos de *Pseudoplatystoma fasciatum*  
/ Daniel Guimarães Figueiredo Ariki. -- Jaboticabal, 2014  
vii, 44 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura, 2014

Orientador: Sergio Ricardo Batlouni

Banca examinadora: Laura Satiko Okada Nakaghi, Renato  
Massaaki Honji

Bibliografia

1. *Pseudoplatystoma fasciatum*. 2. *Pseudoplatystoma reticulatum*.  
3. Ovos adesivos. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



*Só consegui chegar até aqui por causa desta mulher extraordinária, a mulher mais forte que conheço. Ela que nunca mediu esforços para prover TUDO o que precisei, que me ensinou o que ninguém mais poderia, que me orgulha e me emociona enquanto escrevo esta frase e me lembro de tudo o que fez por mim.*

*Mãe.*

*Dedico a você este trabalho, pois você é a pessoa mais importante na minha vida, meu norte, meu porto seguro, minha pedra fundamental, a mais preciosa de todas.*

**Agradeço...**

**Ao meu orientador, o Prof. Sergio Ricardo Batlouni, pela paciência, críticas, conselhos, orientação, amizade, risadas e a oportunidade de trabalhar ao seu lado.**

***Obrigado por me transformar em uma pessoa melhor, pessoal e profissionalmente.***

**A todos os professores que conheci durante o mestrado por compartilhar seu conhecimento, especialmente para a Profa. Maria Célia Portella, a Profa. Laura Satiko Okada Nakaghi, Profa. Fabiana Pilarski, o Prof. Diogo Teruo Hashimoto e o Prof. Renato Massaaki Honji,**

***Obrigado pela ajuda e sugestões que engrandeceram este trabalho.***

**A todos os profissionais, funcionários e técnicos, de laboratório e de campo, com quem tive o prazer de trabalhar.**

***Obrigado pela ajuda e seu trabalho duro.***

**A minha família, meus amigos e colegas de trabalho do Caunesp e tantos locais por onde passei durante este mestrado.**

***Obrigado pelo suporte, amizade e companheirismo.***

***Quem estiver se perguntando: sou amigo ou colega? Você já tem a resposta.***

**À Unesp e à pós graduação do Caunesp pela infraestrutura oferecida.**

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.**

***MUITO OBRIGADO!***

# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

<b>RESUMO</b> .....	2
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	3
1.1 Aquicultura no Brasil .....	3
1.2 A espécie .....	4
1.3 Reprodução.....	6
1.4 Indução Hormonal.....	7
1.5 Híbridação .....	9
1.6 Embriogênese e Larvicultura.....	10
1.7 Adesividade .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivos específicos.....	12
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	12

## CAPÍTULO II

<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>SUMÁRIO DE FIGURAS</b> .....	21
<b>SUMÁRIO DE TABELAS</b> .....	22
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
2.1 Local, Animais e Condições de Manejo.....	24
2.2 Biometria e coleta de dados.....	25
2.3 Reprodução induzida.....	26
2.4 Tratamentos .....	26
2.4.1 Experimento 1.....	27

2.4.2	Experimento 2.....	27
2.5	Amostragem e índices reprodutivos .....	28
2.6	Análise morfométrica .....	29
2.7	Análise genética .....	30
2.8	Análise espermática.....	30
2.9	Larvicultura .....	30
2.10	Análise estatística .....	31
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	Adesividade .....	31
3.2	Índices Reprodutivos.....	32
3.2.1	Experimento 1.....	32
3.2.2	Experimento 2.....	33
3.3	Análise morfométrica .....	34
3.3.1	Experimento 1.....	36
3.3.2	Experimento 2.....	36
3.4	Análise genética .....	39
3.5	Análise espermática.....	39
3.6	Larvicultura .....	39
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>



# CAPÍTULO I

## RESUMO

O *Pseudoplatystoma fasciatum* tem sua reprodução em cativeiro limitada a um problema incomum em peixes reofílicos, a adesividade dos ovos. Por essa e outras razões, produtores frequentemente utilizam ovócitos de *P. corruscans* (que não são adesivos) fertilizados com sêmen de *P. fasciatum* para produzir híbridos. Sendo assim, visando desenvolver estratégias para a produção de *P. fasciatum* “puro”, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de distintos protocolos utilizando soluções de uréia e tanino vegetal para remover a adesividade dos ovos. Dois experimentos foram executados com 4 tratamentos nas estações reprodutivas de 2010/2011 e 2013/2014. Nos tratamentos 1 (T1), 2 (T2) e 3 (T3) os ovos recém-fertilizados foram expostos à uma solução de ureia (Ureia 0,03% e NaCl 0,04%) por 30, 60 e 90 min. respectivamente. No tratamento 4 (T4) os ovos recém-fertilizados foram expostos à solução de uréia por 10 min. e posteriormente submetidos à uma lavagem com uma solução de tanino vegetal (0,05%). No controle (C) os ovos foram fertilizados com água sem exposição a substâncias químicas. No segundo experimento, foi adicionado outro controle (C') utilizando a solução de uréia ao invés de água (por 10 min.) no momento da fertilização. Em ambos os experimentos, O T4, com tanino vegetal, mostrou os melhores resultados para a remoção da adesividade nos ovos, no entanto apresentou as menores taxas de fertilidade (TF) e eclosão (TE), mostrando uma associação negativa entre a perda de adesividade dos ovos com a viabilidade dos mesmos. Neste contexto, o grupo C apresentou os maiores valores de TF e TE, mesmo com a permanência de adesividade dos ovos. Os tratamentos com diferentes tempos de exposição à solução de uréia (T1, T2 e T3) foram parcialmente eficientes para remoção da adesividade e apresentaram TF e TE similares entre si, porém estas foram inferiores à dos controles ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos químicos utilizados neste estudo para descolamento dos ovos nesta espécie ocasionaram taxas reduzidas de fertilidade e eclosão e interferiram negativamente no desenvolvimento embrionário. Desta forma, observamos que diferentemente dos ovos adesivos de diversas outras espécies, os do *P. fasciatum* apresentaram resposta negativa ao tratamento para remoção da adesividade. Por outro lado, concluímos também que os ovos desta espécie apresentam desenvolvimento adequado mesmo com a capa adesiva e que mais estudos devem ser desenvolvidos visando a fabricação de incubadoras com maior área disponível para adesão de ovos e com sistemas específicos para os ovos desta espécie.

**Palavras chave:** *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma reticulatum*, ovos adesivos.

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Aquicultura no Brasil

A aquicultura nacional apresentou significativo crescimento nos últimos anos, passando de 278 mil toneladas em 2003 para 415 mil em 2009, o que equivale a 35% de incremento em menos de uma década. Já a produção da piscicultura atingiu 60,2% de crescimento apenas entre 2007 e 2009. Em conjunto, a aquicultura cresceu 43,8% entre 2007 e 2009, sendo a produção de pescado a que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período (MPA, 2011). O país ocupou a décima segunda posição do ranking mundial na produção aquícola no ano de 2012, totalizando 707.461 toneladas, sendo 611.343 toneladas referentes à produção aquícola continental (FAO, 2014).

No entanto, a produção não atende a demanda nacional, sendo necessário importar pescado para atender o crescente mercado consumidor. O principal item deste mercado importado pelo Brasil em 2010 foi o bacalhau, originário principalmente da Noruega e Portugal, especialmente nas espécies *Gadus morhua* e *G. macrocephalus*. O salmão cultivado segue como o segundo produto mais importado, além de grandes quantidades de truta e outros pescados vindos do Chile. Além disso, o país importa filés congelados da Argentina, China, Chile e Vietnã, e outras conservas e congelados, totalizando 225 mil toneladas em 2010 (MPA, 2012). Por estes motivos, é extremamente necessário expandir a produção de pescado e a maneira mais eficiente é a aquicultura.

Do total produzido pela aquicultura continental nacional, a maior parte é atribuída à produção de espécies exóticas como tilápias, carpas e trutas, sendo o restante distribuído entre as outras espécies de peixes nativos, principalmente o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), além de outras espécies como o surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). No gênero *Pseudoplatystoma*, que compreende algumas das espécies mais importantes para a piscicultura comercial e de subsistência (Nunez *et al.*, 2008; Torrico *et al.*, 2009), se destacam espécies de grande porte como o *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e o *Pseudoplatystoma fasciatum* (cachara). Estas espécies, assim como o *C. macropomum* e o *P. mesopotamicus*, são

amplamente utilizados para a produção de híbridos resultantes do cruzamento interespecífico.

Entre os peixes cultivados no Brasil, os surubins são os peixes de água doce de maior valor comercial, considerados produtos nobres por apresentarem carne saborosa, com baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares, o que os tornam adequados aos mais variados preparos. Estas características atendem as preferências atuais e futuras de mercado de carne de peixe e fazem da carne do surubim um produto com grandes possibilidades de exportação (Kubitza *et al.*, 1998).

## 1.2 A espécie

A ordem dos Siluriformes é representada basicamente pelos chamados peixes de couro, cuja principal característica externa é a ausência de escamas sobre o corpo, sendo revestido por uma pele espessa ou coberto, parcial ou totalmente, com placas ósseas (Britski *et al.*, 1988; Tavares, 1977). O gênero *Pseudoplatystoma*, da ordem dos Siluriformes, compreende os maiores peixes da família Pimelodidae, e podem ser encontrados nas principais bacias hidrográficas sul-americanas (Romagosa *et al.*, 2003). As espécies deste gênero apresentam como aspecto morfológico o corpo alongado e roliço, com cabeça deprimida e largura ao nível da boca apenas ligeiramente menor do que a largura total do corpo, mandíbula mais curta que a maxila superior e dentes viliformes no palato (Tavares, 1977). O *P. fasciatum*, possui características morfológicas próprias da espécie com bandas transversais perpendiculares ao corpo, bem separadas entre si, claras e escuras sobre o tronco. A fontanela não alcança o processo occipital e não apresenta fendas transversais. O corpo é fusiforme e a cabeça deprimida, com três pares de barbilhões dos quais: um no maxilar, preto, e os outros dois mentonianos brancos. A boca é grande, subterminal com pré-maxilar ligeiramente projetado na frente da mandíbula inferior, com dentes viliformes, olhos são pequenos em posição dorsal. A nadadeira anal possui de 11 a 14 raios, sem espinhos; a nadadeira caudal com lóbulos arredondados; as nadadeiras peitorais e dorsal possuem um espinho duro, serrilhado que produz uma ictioxina que funciona como um mecanismo de defesa. Não possui escamas sobre o corpo, o qual é

revestido apenas por pele espessa, ou é coberto, parcial ou totalmente, por placas ósseas (Britski *et al.*, 1988).

Até o ano de 2007, o gênero *Pseudoplatystoma* (Bleeker 1862), era composto por três espécies, sendo *P. fasciatum* (Linnaeus 1766); *P. tigrinum* (Valenciennes 1840) e *P. corruscans* (Spix and Agassiz 1829). Buitrago-Suaréz & Burr (2007), com base na análise morfológica de espécimes coletados nas principais bacias onde ocorrem os animais deste gênero, classificaram o *P. fasciatum* em cinco subespécies: *P. fasciatum* (restrito à região das Guianas), *P. punctifer* (antigo *P. fasciatum* do rio Amazonas), *P. orinocoense* (antigo *P. fasciatum* da bacia do rio Orinoco), *P. magdaleniatum* (antigo *P. fasciatum* do rio Magdalena na Colômbia) e *P. reticulatum* (antigo *P. fasciatum* dos rios Paraná e Amazonas). No mesmo trabalho, o *P. tigrinum*, original da bacia Amazônica, foi dividido em duas espécies: o *P. tigrinum* (restrito à bacia do rio Amazonas) e o *P. metaense* (originário do rio Orinoco). A espécie *P. corruscans* (da bacia do São Francisco) permaneceu sem alterações.

Posteriormente, Torrico *et al.* (2009) utilizaram marcadores moleculares *Cytochrome-b* e sequências parciais recuperadas do *Genbank* para analisar espécimens coletados nas mesmas bacias utilizadas no estudo apresentado por Buitrago-Suaréz & Burr (2007), incluindo espécimens da Amazônia Boliviana. De acordo com Torrico e colaboradores (2009) existem quatro espécies, diferentemente das oito anteriormente descritas por Buitrago-Suaréz & Burr (2007). Dada a inconsistência no número e ocorrência de espécies deste gênero, Carvalho-Costa *et al.* (2011) analisaram novamente amostras coletadas de todas as bacias onde ocorre o gênero *Pseudoplatystoma*, utilizando dois genes nucleares além dos mesmos marcadores do DNA mitocondrial utilizados por Torrico *et al.* (2009). O estudo de 2011 (Carvalho-Costa *et al.*, 2011) confirmou alguns resultados anteriormente apresentados, como a existência de quatro espécies no total: *P. corruscans* e *P. magdaleniatum* (espécies distintas), *P. tigrinum* (mesma espécie que a anteriormente denominada de “*P. metaense*”) e *P. fasciatum* como uma única espécie amplamente distribuída. Desta forma, tanto o *Pseudoplatystoma reticulatum* (Buitrago-Suaréz & Burr, 2007) quanto o *Pseudoplatystoma fasciatum (sensu lato)* (Carvalho-Costa *et al.*, 2011) referem-se à mesma espécie, de acordo com o estudo mais recente de 2011 (Carvalho-Costa *et al.*, 2011).

### 1.3 Reprodução

A utilização dos rios para a geração de energia elétrica tem interferido nas rotas migratórias, reduzindo a captura de grandes migradores como o *P. fasciatum* e *P. corruscans* (Petrere, 1995). Os peixes migradores ou reofílicos são aqueles que durante um determinado período realizam migrações ao longo dos rios para se reproduzir (Vazzoler & Menezes, 1992; Resende *et al.*, 1996; Lucas & Baras, 2001; Vicentin *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2006; Capeleti & Petrere, 2006; Honji, 2007; Godinho, 2007; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). Fatores ambientais como o pH, nível fluviométrico, chuvas, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura são considerados de maior importância para a reprodução de espécies tropicais da América do Sul (Lowe-McConnell, 1987; Barthem & Goulding, 1997; Silva *et al.*, 2011), por outro lado, as espécies nativas de regiões temperadas dependem principalmente da temperatura e fotoperíodo para o processo de maturação sexual e reprodução (Mañanós *et al.*, 1997; Bromage *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2011). Este processo de reprodução natural direciona a produção dos jovens no período do ano mais favorável para a sobrevivência (estação das cheias), quando existe alimento abundante para um crescimento rápido e maior proteção contra predadores (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007).

O *P. fasciatum* apresenta padrões e táticas reprodutivas como desova total única, curto período reprodutivo (dois meses), elevada fecundidade, não proteção à prole, não constrói ninhos e não se reproduz naturalmente quando mantida em cativeiro (Resende *et al.*, 1996; Romagosa *et al.*, 2003; Leonardo *et al.*, 2004). Esta e outras espécies reofílicas apresentam suas gônadas desenvolvidas até estágios avançados de maturação, mas as etapas finais do processo reprodutivo, tais como, a maturação final dos ovócitos, a ovulação e a desova só podem ser atingidas mediante tratamentos hormonais (Godinho *et al.*, 1984; Zaniboni-Filho & Rezende, 1988; Romagosa *et al.*, 1988 e 1990; Romagosa, 1998; Agostinho *et al.*, 2003; Batlouni *et al.*, 2006; Honji, 2007; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007), manipulação ambiental ou aplicação de substâncias análogas aos estímulos hormonais intrínsecos (Andrade & Yasui, 2003). Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas de indução a reprodução

de peixes migradores permitiu um notável incremento qualitativo na piscicultura destas espécies, possibilitando a produção em cativeiro de alevinos destinados ao cultivo (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007).

#### 1.4 Indução Hormonal

Atualmente, o método mais popular de indução hormonal é através da aplicação do extrato bruto de hipófises de carpa (EBHC) diluído em solução fisiológica (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007), pela facilidade de obtenção do produto, bem como pela simplicidade desta metodologia, apesar do seu custo ser elevado (Andrade & Yasui, 2003). Esta técnica, conhecida como hipofisação, foi originalmente desenvolvida a partir da aplicação de extrato de pituitária, retoma a meiose e promove a maturação final do ovócito (von Ihering & Azevedo, 1936).

As formas de indução hormonal podem atuar através da aplicação de substâncias que irão desencadear estímulos na hipófise desses animais, como é o caso de análogos de GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas), inibidores de dopamina, domperidona, pimozida e metoclopramida. A indução pode ainda atuar em nível gonadal, como é o caso de gonadotropinas de peixes, macerado de hipófises desidratadas e gonadotropina coriônica humana (Andrade & Yasui, 2003). De acordo com Carrillo *et al.* (2001) as gonadotropinas (GtH) são hormônios glicoproteicos de origem hipofisária e placentária (em mamíferos) que estimulam o desenvolvimento das gônadas. A hipófise dos teleósteos secreta duas gonadotropinas, sendo o FSH ou hormônio folículo-estimulante (associado com vitelogênese e espermiogênese) e o LH ou hormônio luteinizante (associado com maturação final dos ovócitos e ovulação), sendo que o principal responsável pela secreção e liberação de ambas é o GnRH.

Além de um protocolo de indução hormonal, é necessária a obtenção de reprodutores de qualidade, evitar o estresse pelo manejo inadequado e pela alta densidade de estocagem, assim como pela nutrição inadequada das matrizes, visto que na maturação das gônadas, cada ovócito incorpora vitelo, que fornecerá nutrientes e energia para o desenvolvimento larval (Nikolskii, 1969). Neste contexto, sabe-se que matrizes mal nutridas podem gerar ovos e larvas com quantidades de vitelo insuficiente, podendo comprometer o processo reprodutivo, originando animais com

menores chances de sobrevivência, ou ainda com potencial zootécnico aquém do seu potencial genético (Wooton, 1995).

A seleção dos animais aptos à indução hormonal é extremamente importante na reprodução de peixes migradores, visto que o período de reprodução é curto e os critérios utilizados pelos produtores estão baseados em características subjetivas, tais como: fêmeas com abdômen dilatado e macio que apresentam a papila genital intumescida e avermelhada (Woynarovich & Horváth, 1983). Em machos, é feita através da pressão abdominal dos peixes, de modo que os peixes maduros eliminam pequenas quantidades de sêmen.

Algumas espécies de peixes em condições de cativeiro não liberam os ovócitos espontaneamente após a ovulação, sendo necessária a retirada dos gametas por extrusão (Woynarovich & Horváth, 1983). Esta técnica consiste na expulsão dos ovócitos pela papila genital das fêmeas imediatamente após a ovulação, quando estes estão soltos na luz do ovário, através de pressão abdominal. O mesmo procedimento é utilizado para a retirada do sêmen dos machos, sendo ambos os gametas recolhidos em recipientes para a posterior fertilização. Esta técnica apresenta a vantagem de reduzir a mão-de-obra operacional para a retirada dos ovos e permitir um maior controle da produção, dispensa a necessidade de tanques especiais para a desova, facilita o manejo dos ovos fertilizados, permite o manejo dos gametas para fins de melhoramento genético, utiliza mais eficientemente o sêmen quando este é escasso (através de diluição ou de preservação) e permite o cruzamento entre espécies e entre gêneros diferentes (Harvey & Carolsfeld, 1993).

O momento da desova é estimado por meio do cálculo das horas-grau (HG), considerando-se a temperatura da água e o tempo até a ocorrência da desova, a partir da aplicação da segunda dose de EBHC ( $HG \text{ extrusão dos ovócitos} = \text{temperatura da água, em } ^\circ\text{C} \times \text{tempo, em horas}$ ) (Woynarovich & Horváth, 1983). A fertilização é feita a “seco”, ou seja, os gametas são extrusados e mantidos sem contato com a água. Após a mistura dos ovócitos com o sêmen, se procede a inclusão de água para ativação dos gametas, porém, a quantidade a ser adicionada precisa ser bem dimensionada (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). A inclusão de muita água causa a diluição do sêmen, e a diminuição da possibilidade de que encontrem a micrópila para a fertilização, da mesma forma que a quantidade insuficiente pode causar a obstrução da



micrópila pelo muco do ovário ou pelo contato de outro óvulo (Woynarovich & Horváth, 1983).

## 1.5 Híbridação

A híbridação interespecífica em peixes é uma técnica amplamente utilizada em pisciculturas do Brasil, a fim de obter indivíduos diferenciados e com melhor desempenho que as espécies parentais (Prado *et al.*, 2009). Esta técnica tem sido estudada desde o final do século XIX e, ao contrário dos demais vertebrados, a ocorrência de híbridos naturais e artificiais é um fenômeno bastante comum (Calcagnotto *et al.*, 1999). Algumas pisciculturas nacionais têm realizado cruzamentos artificiais entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* produzindo híbridos interespecíficos que são considerados vantajosos comercialmente (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008). Por não se ter protocolos para a remoção da adesividade e por outras razões, muitas vezes são realizados cruzamentos interespecíficos utilizando ovócitos da fêmea de pintado (*P. corruscans*), que não são adesivos (Rizzo *et al.*, 2002; Rizzo & Godinho, 2003), os quais são fertilizados com sêmen de *P. fasciatum*. Esta mistura resulta no híbrido “pintachara” (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2011). Os híbridos dessas espécies não apresentam alterações morfológicas visíveis durante seu desenvolvimento embrionário (Faustino *et al.*, 2009). Eles apresentam fertilidade parcial e são capazes de cruzar entre si e com as espécies parentais (Prado *et al.*, 2009) gerando um problema que é a falta de informações sobre os produtos genéticos resultantes da híbridação. Os híbridos parcial ou totalmente férteis são os que oferecem maiores riscos, pela possibilidade de retro cruzamentos e contaminação genética dos estoques selvagens. Carvalho *et al.* (2008) relataram a ocorrência de híbridos em rios do Brasil e da venda de animais híbridos como reprodutores “puros”, indicando que cuidados devem ser tomados na utilização destes animais, pois podem conduzir a resultados positivos na piscicultura brasileira, incrementando o desempenho, porém podem causar grandes impactos nos estoques naturais, reduzindo a biodiversidade existente. O possível escape de híbridos de tanques de piscicultura representa uma ameaça à integridade genética de populações locais devido ao potencial risco de retro cruzamento, com conseqüente introgressão de genes. Na bacia

do alto rio Paraná, onde não ocorre naturalmente *P. fasciatum*, o escape de híbridos representa um risco potencial para *P. corruscans*. As consequências são de difícil previsão, podendo resultar em uma única população híbrida, ou até a extinção das espécies parentais (Prado *et al.*, 2009).

## 1.6 Embriogênese e Larvicultura

Estudos sobre a biologia dos ovos de peixes são de grande interesse por fornecerem subsídios para estudos sobre a preservação de gametas, a conservação da ictiofauna e o aprimoramento das técnicas de cultivo (Rizzo & Godinho, 2003). O desenvolvimento embrionário é um processo que se inicia com a fertilização do ovócito e vai até a eclosão das larvas (Kimmel *et al.*, 1995). A embriogênese no *P. fasciatum* ocorre rapidamente, ao redor de 16 horas com médias de temperatura de  $23,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  (Vazzoler, 1996; Resende *et al.*, 1996; Sato, 1999). As larvas dos surubins nascem com tamanho médio de 2,6 a 3,0 mm e, após 2-3 dias de idade e com tamanho de 4,5 mm, já iniciam a alimentação exógena (Crepaldi *et al.*, 2006). Nas primeiras semanas de larvicultura, náuplios de artêmia salina são comumente empregados para alimentar as larvas, obtendo-se resultados bastante satisfatórios (Inoue *et al.*, 2003). Há ocorrência de alto índice de canibalismo nas larvas de cachara já no segundo dia de vida (Romagosa *et al.*, 2002). Apesar das técnicas empregadas, a sobrevivência média de juvenis prontos para a comercialização é aproximadamente de 30 a 40% (Inoue *et al.*, 2003).

## 1.7 Adesividade

Em geral, espécies migradoras possuem alta fecundidade, seus ovos são livres ou não adesivos, pequenos, de desenvolvimento embrionário rápido e não estão sujeitos a cuidado parental (Sato, 1999). Em condições naturais, estes ovos são liberados na coluna de água, enquanto os ovos de espécies sedentárias permanecem no local da desova, ligados a diferentes substratos (Lamas, 1993; Sato, 1999). Em *P. fasciatum*, os ovócitos e ovos apresentam formato esférico e coloração amarelada, com

uma camada gelatinosa sobre o córion, que permite certa aderência aos mesmos. (Faustino *et al.* 2007). Esta é uma característica mais comum em espécies com comportamento sedentário e de cuidado parental (Sato, 1999; Rizzo *et al.*, 2002). Muitas espécies possuem ovos com características semelhantes, tais como várias espécies de esturjão *Acipenser spp.* (Doroshov *et al.*, 1983; Monaco & Doroshov, 1983; Kowtal *et al.*, 1986), *Spirinchus lanceolatus* (Mizuno *et al.*, 2004), sendo necessários tratamentos químicos ou mecânicos para o sucesso da reprodução artificial destas espécies. A adesividade deve ser eliminada para prevenir a formação de aglomerados de ovos que resultam em alto índice de mortalidade causada por asfixia e crescimento de fungos (Doroshov *et al.*, 1983).

Desta forma torna-se importante estabelecer uma tecnologia confiável para descolamento de ovos de *P. fasciatum*, uma vez que a aderência dos mesmos causa a formação de grandes grumos nas incubadoras, reduzindo as taxas de fertilidade e eclosão e dificultando a produção de indivíduos puros. O método utilizado no presente estudo para a remoção da adesividade foi proposto por Woynarovich (1980), que foi elaborado para a dissolução da camada pegajosa dos ovos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e outros ciprinídeos. As concentrações das soluções utilizadas foram feitas baseadas no protocolo de tratamento para carpas (*C. carpio*) descrito por Moreira *et al.* (2001).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Diante do crescimento da piscicultura nacional e o interesse na produção do *P. fasciatum* como um produto de qualidade excepcional, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes protocolos (utilizando uréia e tanino vegetal) para remoção da adesividade de ovos de *P. fasciatum*, assim contribuindo com a elaboração de um pacote tecnológico para a reprodução desta espécie em cativeiro.

## 2.2 Objetivos específicos

- ✓ avaliar a eficácia dos tratamentos na remoção da adesividade dos ovos;
- ✓ avaliar os efeitos dos tratamentos sobre o desenvolvimento dos embriões;
- ✓ comparar tratamentos através das taxas de fertilização e eclosão obtidas ao longo da incubação dos ovos;
- ✓ comparar tratamentos através da morfometria dos embriões.

## 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A., GOMES, L.C., SUZUKI, H.I., JÚLIO, H.F. Migratory fish from the upper Paraná River Basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J., HARVEY, B., ROSS, C., BAER, A., (eds.) **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Victoria: World Fisheries Trust, The World Bank and the International Development Research Center, 2003. p. 19-99.

ALMEIDA, F.L., ANDERSSON, E., MITTELHOLZER, C., KARLSEN, Ø., TARANGER, G.L., SCHULZ, R.W. Pituitary gonadotropin and testicular gonadotropin receptor expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during the first reproductive season: Effects of photoperiod modulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 173, p. 111-119, 2011.

ALVARENGA, E.R., BAZZOLI, N., SANTOS, G.B., RIZZO, E. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 2, p. 314-322, 2006.

ANDRADE, D.R., YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.

Barthem, R., M. Goulding, M. **The catfish connection: Ecology, migration, and conservation of Amazon predators**. New York: Columbia University Press, 1997. p. 144.

BATLOUNI, S.R., ROMAGOSA, E., BORELLA, M.I. (2006). The reproductive cycle of male catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed

by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 116-132, 2006.

BRITSKI, H.A., SATO, Y., ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes na região de Três Marias (com chave de identificação para peixes da Bacia do São Francisco)**. 3. ed. Brasília: CODEVASF, 1984. p. 115.

BROMAGE, N. R., PORTER, M. J. R., RANDALL, C. F. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 63-98, 2001.

BUITRAGO-SUÁREZ, U.A., BURR, B.M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, 1-38, 2007.

CALCAGNOTTO, D., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., BERNARDINO, G., TOLEDO-FILHO, S.A. Biochemical-genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between Neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 174, p. 51-57, 1999.

CAPELETI, A.R., PETRERE JR, M. Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi Guaçu river - São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66 (2B), p. 651-659, 2006.

CARRILLO, M.A., RODRIGUEZ, H., VICTORIA, P. **Fundamentos da Acuicultura Continental**. 2. ed. Bogotá: INPA, 2001. p. 423.

CARVALHO, D.C., SEERIG, A., MELO, D.C., SOUSA, A.B., PIMENTA, D., OLIVEIRA, D.A.A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte v. 32, p. 215-219, 2008.

CARVALHO-COSTA, L.F., PIORSKI, N.M., WILLIS, S.C., GALLETI JR, P.M., ORTÍ, G. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, p. 177-194, 2011.

CREPALDI, D.V., FARIA, P.M.C., TEIXEIRA, E.A., RIBEIRO, L.P., COSTA, A.A.P., MELO, D.C., CINTRA, A.P.R., PRADO, A.S., COSTA, F.A.A., DRUMOND, M.L., LOPES, V.E., MORAES, V.E. A situação da Aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n.3/4, p. 81-85, 2006.

DOROSHOV, S.I., CLARK JR., W.H., LUTES, P.B., SWALLOW, R.L., BEER, K.E., MCGUIRE, A.B., COCHRAN, M.D. Artificial propagation of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson, **Aquaculture**, Amsterdam v. 32, n. 1-2, p. 93-104, 1983.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Rome, 2014, p. 223.

FAUSTINO, F., NAKAGHI, L.S.O., MARQUES, C., MAKINO, L.K., SENHORINI, J.A. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 49-55, 2007.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O. ; MARQUES, C., GANECO, L. N., MAKINO, L. C. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma spp.* hybrids. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 723-730, 2010.

GODINHO, H.M., ROMAGOSA, E., CESTAROLLI, M.A., NARAHARA, M.Y., FENERICH-VERANI, N. Reprodução induzida de curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steind. 1881 sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8 (2), p. 113-119, 1984.

GODINHO, A.L., KYNARD, B., GODINHO, H.P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 80, p. 421-433, 2007.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31 (3), p. 351-360, 2007.

HARVEY, B., CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, 1993. p.144.

Honji, R.M. **Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo de tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativeiro**. 2007. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Fisiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

INOUE, L.A.K.A., CECCARELLI, P.S., SENHORINI, J.A. A larvicultura e a alevinagem do Pintado e do Cachara. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 15-21, 2003.

KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995.

KOWTAL, G.V., CLARK, W.H., CHERR, G.N. Elimination of adhesiveness in eggs from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Chemical treatment of fertilized eggs, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 139-143, 1986.

KUBITZA, F., CAMPOS, J.L., BRUM, J.A. Surubim: produção intensiva no Projeto Pacu Ltda. e Agropeixe Ltda. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 25-32, 1998.

LAMAS, I.R. **Análise de características reprodutivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase ao local de desova**. 1993. 72 f. Dissertação (Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

LEMANOVA, N.A.; SAKUM, O.F. Metodischeske posibile pogor monalnoistimulacjii proizvoditelei Karpa pré rannom polucenii licinok. Izvestiya Gosudartvennogo Nauchno ¾ Isseledivatel Skogo Instituta, v.88, p. 3-23, 1975.

LEONARDO, A.F.G., ROMAGOSA, E., BATLOUNI, S.R., BORELLA, M.I. Characterization and hormonal efficiency in female cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), kept in captivity. **Aquaculture**, Amsterdam, v.42, p. 451-461, 2004.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Ecological Studies in Tropical Fish Communities**. Cambridge, University Press, 1987. p. 382.

LUCAS, M.C., BARAS, E. **Migration of freshwater fishes**. Blackwell Science, 2001. p. 420.

MAÑANÓS, E., ZANUY, S., CARRILLO, M. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 $\alpha$ -estradiol and vitellogenin levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 16, p. 211-222, 1997.

MPA, 2011. **Ministério da Pesca e Aquicultura. Produção**. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/producao> Acesso em 20 mar. 2014.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura de 2010**. Brasília, 2012, p. 129.

MIZUNO, S., SASAKI, Y., OMOTO, N., IMADA, K. (2004). Elimination of adhesiveness in the eggs of shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus* using kaolin treatment to achieve high hatching rate in an environment with a high iron concentration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 242, n 1-4, p. 713-726, 2004.

MONACO, G., DOROSHOV, S.I. Mechanical de-adhesion and incubation of white sturgeon eggs (*Acipenser transmontanus* Richardson) in jar incubators. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 35, p.117-123, 1983.

MOREIRA, H.L.M., VARGAS, L., RIBEIRO, R.P. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ed. ULBRA, 2001, p.106-108.

NAKAMURA, K. Method to eliminate egg adhesion in Japanese dace. **The Aquaculture**, v. 14, p. 37-40, 1966. (In Japanese).

NIKOLSKII, G.V. **Theory of fish population dynamics as the biological background for rational exploitation and management of fishery resources**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1969. p. 320.

NUÑEZ, J., DUGUÉ, R., CORCUY, N., DUPONCHELLE, F., RENNO, J.F., RAYNAUD, T., HUBERT, N., LEGENDRE, M. Induced breeding and larval rearing of surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), from the Bolivian Amazon. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 764-776, 2008.

PRADO, F.D., HASHIMOTO, D.T., SENHORINI, J.A., FORESTI, F., BORTOLOZZI, J., PORTO-FORESTI, F. (2009). Identificação de híbridos entre os peixes neotropicais pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) através de PCR-RFLP: aplicações para a conservação genética. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética.

PRADO, F.D., HASHIMOTO, D.T., MENDONÇA, F.F., SENHORINI, J.A., FORESTI, F., PORTO-FORESTI, F. Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1890-1894, 2011.

PETREIRE, JR. M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 19, p. 28-33, 1995.

PORTO-FORESTI, F., HASHIMOTO, D.T., ALVES, A.L., ALMEIDA, R.B.C., SENHORINI, J.A., BORTOLOZZI, J., FORESTI, F. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, (1 suppl), p. 195-202, 2008.

RESENDE, E.K., CATELLA, A.C., NASCIMENTO, F.L., PALMEIRA, S.S., ALMEIDA, V.L.L. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá. MS: EMBRAPA – CPAP, 1996. Boletim de Pesquisa, Vol. 2, p. 1-75.

RIZZO, E., SATO, Y., BARRETO, P.P., GODINHO, H.P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p.615–632, 2002.

RIZZO, E., GODINHO, H.P. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. In: GODINHO, H.P., GODINHO, A.L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.115-132.



ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H.M., STORFER, E.B. Desenvolvimento de ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (*Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e cultura**, v. 40 (1), p. 60-64, 1988.

ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H.M., GUILHERME, M.C.M. Fecundidade do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), mantido em confinamento, durante o 1o e o 2o período reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.17, p. 99-103, 1990.

ROMAGOSA, E. **Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus*, (Günther, 1869) em cativeiro**. 218 f. Tese. (Doutorado - Universidade Federal de São Carlos) - Vale do Paraíba, São Paulo, 1998.

ROMAGOSA, E. et al. Desenvolvimento de ovos e larvas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia ABRAq, 2002. p. 386.

ROMAGOSA, E., PAIVA, P., ANDRADE-TALMELLI, E.F., GODINHO, H.M. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* mantidas em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 151-159, 2003.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 179 f. Tese (Doutorado - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, 1999.

SILVA, E. B., PICAPEDRA, P. H. S., SANCHES, P. V., REZENDE, R. E. O., GAVIÃO, A. M., MENDONÇA, M. M., GONÇALVES, D. V., CONTE, R. B. Larvae occurrences of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Siluriformes: Heptapteridae) in an area under dam influence in the upper Paraná River region. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, p. 419-426, 2011.

TAVARES, M.P. O surubim. In: Miranda, M.O.T., (ed.) **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1977. p. 9-25.

TORRICO, J.P., HUBERT, N., DESMARAIS, E., DUPONCHELLE, F., NUÑEZ, RODRIGUEZ. J., MONTOYA-BURGOS, J., GARCIA DAVILA, C., CARJAVALLAJOS, F.M., GRAJALES, A.A., BONHOMME, F., RENNO, J-F. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 588-594, 2009.

WOOTON, R.J. **Ecology of teleost fishes**. New York: Chapman & Hall Co. Wales, 1995, p. 396.

WOYNAROVICH, E., WOYNAROVICH, A. Modified technology for elimination of stickiness of common carp (*Cyprinus carpio*) eggs – **Aquacult. Hung**, v. 2, p. 19-21, 1980.

WOYNAROVICH, E., HORVÁTH, L. **A Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983, p. 225.

VAZZOLER, A.E.A.M., MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 52 (4), p. 627-640, 1992.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. São Paulo: CNPq/ Nupelia (UEM), 1996, p. 169.

VICENTIN, W., COSTA, F.E.S., MARQUES, S.P., ZUNTINI, D., BARBOSA, E.G. Fator de condição e relação peso x comprimento de *Prochilodus lineatus*, capturados na cabeceira do Rio Miranda, MS. IV Simpósio Sobre Recursos Naturais e Sócio – econômicos do Pantanal (SIMPAN), Corumbá, 2004.

VON IHERING, R., AZEVEDO, P. (1936). A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. **Arch. Inst. Biol.**, v. 7, p. 107-180, 1936.

ZANIBONI-FILHO, E, RESENDE, E.K. Anatomia de gônadas, escala de maturidade e tipo de desova do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48 (4), p. 833-844, 1988.

ZANIBONI-FILHO, E., WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores (Induced breeding in migratory fishes). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n.3, p. 367-373, 2007.

Este artigo foi redigido conforme as normas de publicação da revista *Journal of Fish Biology*, 2014.  
(I.F. 1.834).

## **CAPÍTULO II**

**Adhesiveness removal in eggs of Cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus 1766)**

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of different protocols using solutions of urea and tannin to remove adhesiveness of the eggs of *Pseudoplatystoma fasciatum*. In the first experiment, three treatments (T1, T2 and T3) were performed by exposing recently fertilized eggs to solution of urea (Urea 0.03% and 0.04% NaCl) for 30, 60 and 90 min respectively. In the treatment 4 (T4), eggs were exposed to the urea solution for 10 min. and then subjected to washing with a solution of tannin (0.05%). In the control group (C) eggs were fertilized in water without chemical exposure. The second experiment was equal to the first, except for the addition of another control group (C'), in which eggs were exposed to the urea solution for 10 min at fertilization. In both experiments, T4 (with tannin) showed the best results for the removal of adhesiveness of the eggs, however the worse concerning fertility (FR) and hatching rates (HR), showing a negative association between adhesiveness loss and viability of the eggs. In this context, the group C showed the highest values of FR and HR even with eggs retaining its adhesiveness. Treatments with different times of exposure to urea solution (T1, T2 and T3) showed some level of adhesiveness removal, FR and HR similar among themselves, but their FR and HR were lower than that of group C ( $p < 0.05$ ). The chemical treatments used in this study to remove the adhesiveness of the eggs have caused reduced fertility and hatching rates and negatively interfered in embryonic development in this species. Thus, we observed that unlike the adhesive eggs of several other species, eggs of *P. fasciatum* showed negative response to the chemical treatments applied. Furthermore, we also concluded that the eggs of this species have adequate development even when keeping the adhesive properties, and further studies are needed concerning the use of incubators with a greater surface area available for the adhesion of the eggs.

**Key words:** *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma reticulatum*, adhesive eggs.

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfometria de ovo de <i>P. fasciatum</i> . Ajuste de contraste (a), diâmetro vertical (b) e horizontal (c), área total do ovo (d), área do embrião (e) e área do saco vitelínico (f). .....	29
<b>Figura 2.</b> Ilustração da disposição dos ovos de <i>P. fasciatum</i> em incubadoras nos dois experimentos. Ovos sem desenvolvimento embrionário (“gorados”) e ovos com desenvolvimento embrionário (“bons”).....	32
<b>Figura 3.</b> Médias das taxas de fertilização (TF) e taxa de eclosão (TE) de <i>P. fasciatum</i> no experimento 1. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas da taxa de fertilização entre os tratamentos ( $p<0,05$ ), e letras minúsculas indicam diferenças significativas da taxa de eclosão entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). As barras representam o erro padrão. ....	33
<b>Figura 4.</b> Médias das taxas de fertilização (TF) e taxa de eclosão (TE) de <i>P. fasciatum</i> no experimento 2. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas da taxa de fertilização entre os tratamentos ( $p<0,05$ ), e letras minúsculas indicam diferenças significativas da taxa de eclosão entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). As barras representam o erro padrão. ....	34
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia de ovos de <i>P. fasciatum</i> viáveis dos tratamentos C (a), T1 (b), T2 (c), T3 (d), T4 (e) e um ovo inviável do T4 (f).....	35
<b>Figura 6.</b> Médias das medidas dos ovos e embriões de <i>P. fasciatum</i> do experimento 1. ....	37
<b>Figura 7.</b> Médias das medidas dos ovos e embriões de <i>P. fasciatum</i> do experimento 2. ....	38

## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Massa corpórea dos reprodutores de <i>P. fasciatum</i> utilizados na reprodução induzida. ....	25
<b>Tabela II.</b> Parâmetros de qualidade de água.....	25
<b>Tabela III.</b> Tratamentos e controles realizados nos dois experimentos.....	28

# 1 INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma espécie migradora, os ovos de *Pseudoplatystoma fasciatum* apresentam uma alta adesividade, que é uma característica mais comum em espécies com comportamento sedentário e de cuidado parental (Rizzo *et al.*, 2002). Muitas espécies possuem ovos com características semelhantes, tais como várias espécies de esturjão *Acipenser spp.* (Doroshov *et al.*, 1983; Monaco & Doroshov, 1983; Kowtal *et al.*, 1986), *Spirinchus lanceolatus* (Mizuno, *et al.*, 2004), sendo necessários tratamentos químicos ou mecânicos para o sucesso da reprodução artificial destas espécies. A adesividade deve ser eliminada para prevenir a formação de aglomerados de ovos que resultam em alto índice de mortalidade causada por asfixia e crescimento de fungos (Doroshov *et al.*, 1983).

Por não se ter protocolos para a remoção da adesividade e por outras razões, frequentemente são realizados cruzamentos interespecíficos utilizando ovócitos da fêmea de pintado (*P. corruscans*), que não são adesivos (Rizzo *et al.*, 2002; Rizzo & Godinho, 2003), os quais são fertilizados com sêmen de *P. fasciatum*. Esta mistura resulta no híbrido “pintachara” (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2011). Os híbridos parcialmente ou totalmente férteis são os que oferecem maiores riscos, pela possibilidade de retro cruzamentos e contaminação genética dos estoques selvagens (Prado *et al.*, 2009). Estes híbridos são produzidos pela maior facilidade na reprodução em relação às espécies puras, e oferecem melhor produtividade comparada com as espécies parentais (Hulata, 2001; Scribner *et al.*, 2001). No entanto, não há estudos comparando o desempenho entre híbridos e animais puros, durante suas diferentes fases de criação.

Desta forma torna-se importante estabelecer uma tecnologia confiável para a remoção da adesividade em ovos de *P. fasciatum*, uma vez que a aderência dos mesmos causa a formação de grumos nas incubadoras, reduzindo as taxas de fertilização e eclosão, conseqüentemente reduzindo a sobrevivência e dificultando a produção de indivíduos puros. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes protocolos (utilizando tratamentos químicos) para remoção da adesividade em ovos de

*P. fasciatum*, assim contribuindo com a elaboração de um pacote tecnológico para a sua reprodução artificial.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local, Animais e Condições de Manejo

O presente estudo foi conduzido ao longo de duas estações reprodutivas (11/2010 à 01/2011 e 10/2013 à 01/2014) no Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Campus de Jaboticabal.

Foram utilizados exemplares de um plantel de *P. fasciatum* mantidos em viveiros escavados (5 x 10 x 1.5 m), alimentados seis (06) dias na semana, em duas porções, equivalentes a 5% da biomassa total nos meses quentes (setembro a fevereiro) e 1% nos meses frios (março a agosto) às 9:00 e 17:00 horas, com ração comercial extrusada (Umidade (máx.) 8% Proteína Bruta (mín.) 32% Extrato Etéreo (mín.) 6,5% Matéria Fibrosa (máx.) 7% Matéria Mineral (máx.) 10% Cálcio (máx.) 1,2% Fósforo (mín.) 0,6%). A ração administrada foi oferecida a lanço, possibilitando maior dispersão e, conseqüentemente, maior utilização da mesma.

Dois experimentos foram realizados individualmente ao longo de duas estações reprodutivas. Para ambos, exemplares deste plantel foram capturados utilizando uma rede de arrasto. Foram selecionados os animais aptos à reprodução pela observação de características como: o abaulamento do ventre e poro genital dilatado e vascularizado nas fêmeas; liberação de sêmen quando realizada pressão no abdômen nos machos. Os exemplares foram transportados ao laboratório em caixas d'água de 500 l. Além disso, para avaliar o estágio de maturação das fêmeas, foram coletadas amostras de ovócitos utilizando sonda uretral humana nº 8, fixados em solução de SERRA (60 ml de álcool 90%; 30 ml de formalina; 10 ml de ácido acético glacial - Lemanova & Sakun, 1975) e analisados no microscópio estereoscópio (Leica M50), onde foi observada a maioria de ovócitos com núcleo excêntrico.



## 2.2 Biometria e coleta de dados

Os animais ficaram acondicionados em caixas de fibra de vidro (1000 l) com circulação de água constante e aeração artificial. Foi registrado o peso total (Tab. I), para posterior cálculo das dosagens hormonais. Durante os dois dias de duração do experimento, foram registrados os parâmetros de qualidade de água (Tab. II) utilizando aparelhos da Yellow Spring Inc. modelo YSI 55 e YSI 63.

**Tabela I.** Massa corpórea dos reprodutores de *P. fasciatum* utilizados na reprodução induzida.

Experimento 1		Experimento 2	
Animal	Massa corpórea (kg)	Animal	Massa corpórea (kg)
fêmea 1	2,6	fêmea 1	3,8
fêmea 2	3,5	fêmea 2	5,3
macho 1	1,9	macho 1	1,9
macho 2	2,1	macho 2	2,9
		macho 3	3,1

**Tabela II.** Parâmetros de qualidade de água.

Parâmetros	Experimento 1	Experimento 2
T(°C)	26,1±0,4	27±0,6
pH	7,18±0,02	6,98±0,15
C(μS.cm <sup>-1</sup> )	62,0±3,0	163±9,0
O <sub>2d</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	6,02±0,32	5,47±0,28
Transparência(cm)	60	60

### 2.3 Reprodução induzida

Nos dois experimentos, procedeu-se à indução da reprodução utilizando-se extrato bruto de hipófises de carpa-comum (EBHC) injetado na cavidade celomática. Os machos receberam dose única de EBHC ( $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peixe) e as fêmeas duas doses ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peixe, com intervalo de 12 horas entre as doses).

Estimou-se o momento da desova por meio do cálculo das horas-grau (HG), e oito horas a partir da aplicação da segunda dose de EBHC (aproximadamente 208 HG em ambos os experimentos), foi iniciada a extrusão dos ovócitos e a coleta de sêmen manualmente. As fêmeas foram removidas da caixa utilizando um puçá, e o local próximo à papila genital foi seco para a realização de massagem abdominal, para a extrusão dos ovócitos, que foram depositados em recipientes de plástico, secos, limpos e pesados previamente. Os machos tiveram o sêmen colhido, e armazenado separadamente para posterior mistura. Após a extrusão, foi obtido o peso da desova de cada fêmea, e então o sêmen foi dividido e adicionado aos recipientes plásticos. Em seguida, misturou-se o sêmen suavemente à desova, com o auxílio de uma pena, para evitar o rompimento dos ovócitos.

### 2.4 Tratamentos

As soluções utilizadas foram feitas baseadas no protocolo de tratamento para carpas (*Cyprinus carpio*) descrito por Moreira *et al.* (2001), pois os ovos de carpa também são adesivos e necessitam passar por um tratamento químico para evitar que se aglomerem. A solução de sal-carbamida (Sol. 1) é composta de 40 g de cloreto de sódio (NaCl) e 30 g de uréia, dissolvidos em 10 l de água, e a (Sol. 2) é uma solução de 0,05% de tanino vegetal em 10 l de água. As soluções foram feitas e homogeneizadas 30 minutos antes do uso.

### 2.4.1 Experimento 1

Um pool de ovócitos foi elaborado, aliquotado e submetido a cinco distintas condições para fertilização e hidratação em bacias plásticas individuais, correspondendo quatro tratamentos e um controle conforme a tabela (Tab. III). Três tratamentos (T1, T2 e T3) consistiram em diferentes tempos de exposição à Sol.1, os ovócitos de cada tratamento foram fertilizados, e hidratados nesta solução, e colocados na incubadora após o tempo previsto por tratamento (30, 60 e 90 minutos). O quarto tratamento (T4) seguiu o protocolo descrito por Moreira *et al.* (2001), onde os ovócitos foram fertilizados e depois hidratados em Sol. 1, e em seguida foram expostos a uma “lavagem” ou substituição gradativa da solução com a solução de tanino vegetal (Sol. 2) por 15 segundos, e por ultimo, um tratamento controle (C), onde os ovócitos foram apenas hidratados em água e colocados nas incubadoras após 10 minutos.

Em cada incubadora (de formato cônico, com volume útil de 2,5 L e renovação constante de água), foram colocados 4 ml de ovos (cerca de 150 ovos/ml), divididos em três repetições por tratamento. A solução de incubação dos ovos dos grupos T1, T2 e T3 foram renovadas durante a incubação para evitar a queda no teor de oxigênio dissolvido.

### 2.4.2 Experimento 2

No experimento anterior, foi observado que o uso da solução de uréia (Sol.1) pareceu retardar o aparecimento da adesividade nos ovos ao serem colocados nas incubadoras, facilitando assim o manejo e a dispersão dos mesmos. Assim, foi adicionado no experimento 2 um novo grupo controle (C'), no qual foi utilizado Sol. 1 por 10 minutos durante a fertilização (ao invés de água, como no grupo C).

Novamente foi elaborado um pool de ovócitos, os quais foram aliquotados e submetidos a seis distintas condições para fertilização e hidratação, correspondendo quatro tratamentos e dois controles (Tab. III). Os tratamentos (T1, T2, T3 e T4) e o controle do primeiro experimento foram repetidos. Os tratamentos e controles foram distribuídos em três repetições com 4 ml de ovos por incubadora.

**Tabela III.** Tratamentos e controles realizados nos dois experimentos.

<b>Experimento 1</b>		<b>Experimento 2</b>
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Tratamento</b>
<b>C</b>	fertilização e hidratação em água (10 minutos)	fertilização e hidratação em água (10 minutos)
<b>T1</b>	fertilização e hidratação em uréia (30 minutos)	fertilização e hidratação em uréia (30 minutos)
<b>T2</b>	fertilização e hidratação em uréia (60 minutos)	fertilização e hidratação em uréia (60 minutos)
<b>T3</b>	fertilização e hidratação em uréia (90 minutos)	fertilização e hidratação em uréia (90 minutos)
<b>T4</b>	fertilização e hidratação em uréia (10 minutos) + lavagem em tanino (15 segundos)	fertilização e hidratação em uréia (10 minutos) + lavagem em tanino (15 segundos)
<b>C'</b>		fertilização e hidratação em uréia (10 minutos)

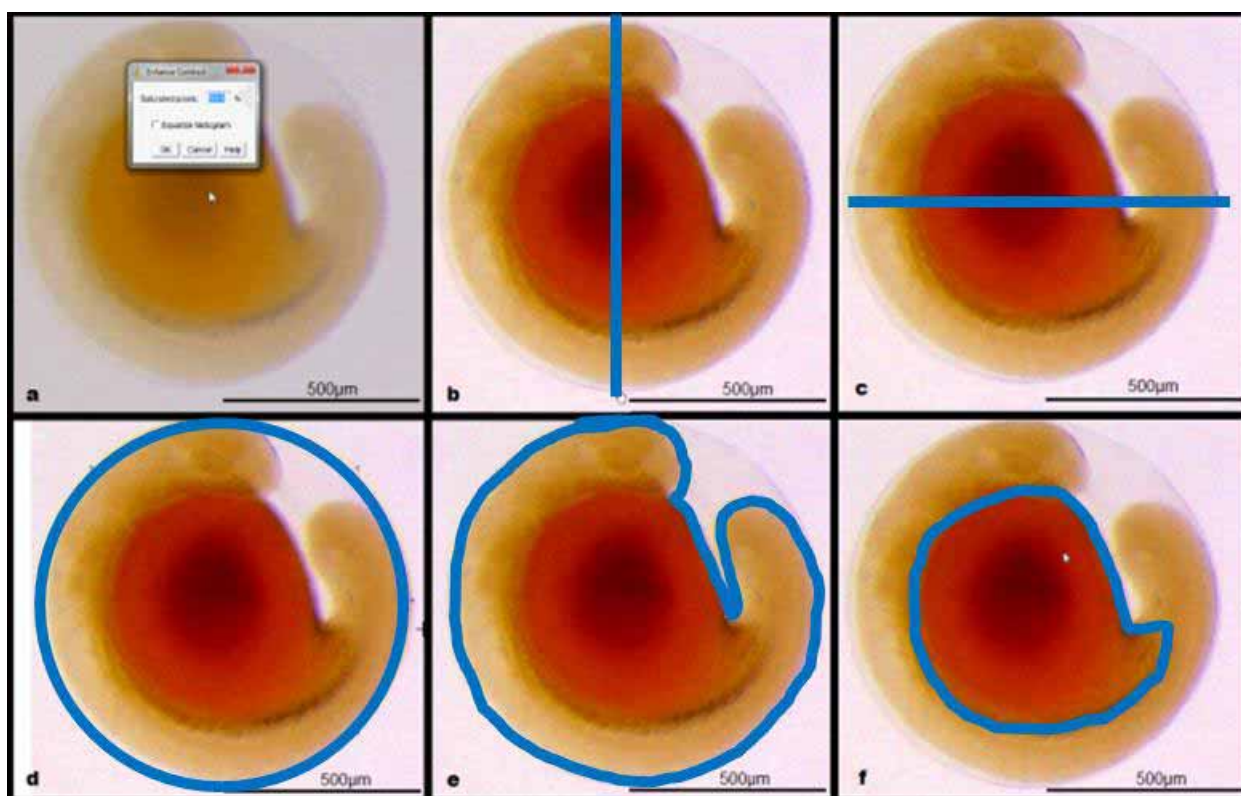
## 2.5 Amostragem e índices reprodutivos

Cinco e 15 horas pós-fertilização, foram calculadas as taxas de fertilização (TF) e eclosão (TE). Foram coletados 100 ovos de cada repetição (300 ovos por tratamento) e analisados sob microscópio estereoscópio, onde foram contabilizados os ovos viáveis (com desenvolvimento embrionário). Em seguida, as amostras foram fixadas em Glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato a 0,05 M e pH 7,2 a 7,4 e armazenadas em geladeira à 5°C. As TF e TE foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{nº de ovos viáveis}}{\text{nº de ovos total}} \times 100$$

## 2.6 Análise morfométrica

Os ovos embrionados que foram coletados em 15 horas pós-fertilização e fixados em Glutaraldeído 2.5% foram lavados em tampão fosfato a 0,05 M e pH 7,2 a 7,4. Quinze ovos por tratamento, escolhidos ao acaso, foram fotografados utilizando um microscópio estereoscópio Leica M50 com sistema de captura IC80 HD. As análises foram feitas com *software* Leica application suite 4.3 (Leica microsystems Limited. Copyright 2003-2013). Estes ovos foram avaliados individualmente quanto ao diâmetro (D) e área total do ovo (AO). Foram também determinadas a área total ocupada pelo embrião (AE) e área do saco vitelínico (AS), utilizando o programa freeware ImageJ (v 1.46r, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Para o cálculo de D, foram utilizadas a média entre os diâmetros horizontal e vertical. As áreas foram calculadas automaticamente pelo programa, conforme a figura (Fig. 1).



**Figura 1.** Morfometria de ovo de *P. fasciatum*. Ajuste de contraste (a), diâmetro vertical (b) e horizontal (c), área total do ovo (d), área do embrião (e) e área do saco vitelínico (f).

## 2.7 Análise genética

A pureza genética dos animais utilizados em ambos os experimentos foi confirmada através desta análise, realizada no Laboratório de Genética de Peixes da Unesp, campus de Bauru. Os animais do plantel de reprodutores do CAUNESP foram microchipados (ANIMALTAG – Korth RFID Ltda., São Carlos, SP) para garantir a identificação de cada animal e rastreabilidade dos alevinos provenientes da reprodução dos mesmos. De cada animal foi coletado um fragmento da nadadeira caudal e armazenada em álcool 100%. A extração do DNA foi conduzida utilizando o Kit de Purificação de DNA Genômico de acordo com o protocolo do fabricante (Promega). A quantidade de DNA foi avaliada com um padrão de marcador molecular (Low DNA Mass Ladder da Invitrogen) por eletroforese em gel de agarose a 1%.

A identificação das amostras foi realizada através da técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) de regiões dos genes nucleares RAG2, 18S, Globina, EF1, do gene mitocondrial 16S, e pelo marcador microssatélite Prt. 36. A análise dos dados foi realizada por comparação das bandas após a PCR, utilizando amostras padrões das duas espécies em questão (*P. fasciatum* e *P. corruscans*) previamente identificadas.

## 2.8 Análise espermática

No momento da extrusão do sêmen uma alíquota foi separada para determinação da qualidade através da concentração espermática, motilidade e índice de sobrevivência, de acordo com Rurangwa et al. (2004).

## 2.9 Larvicultura

Larvas foram acompanhadas por 90 dias após a eclosão. As larvas foram mantidas em caixas d'água de plástico pretas de 30 l, com renovação de água constante e aeração artificial, na densidade de 4 larvas/l. A limpeza do fundo das caixas foi realizada diariamente por sifonação. Foram realizadas duas biometrias dos

animais sobreviventes com 60 e 90 dias pós-eclosão, onde foi observado o peso e comprimento total. Sete dias após a abertura da boca (que ocorreu dois dias pós-eclosão) as larvas foram alimentadas com náupilos de artêmia (500 náupilos/larva - cinco vezes ao dia). Posteriormente as larvas foram alimentadas *ad libitum* com naupilos de artêmia e ração para alevinos com 40% de proteína bruta.

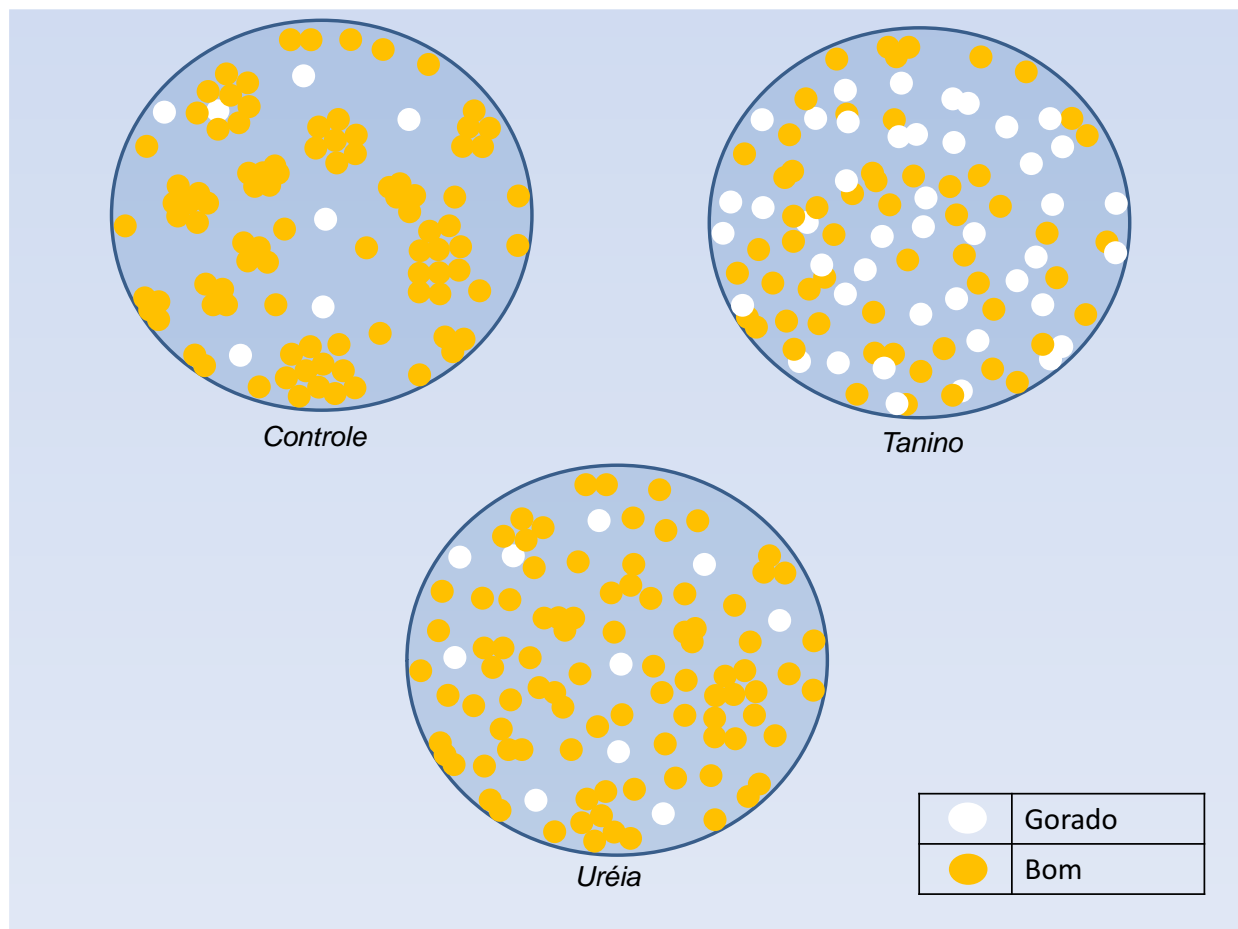
### **2.10 Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições e cinco tratamentos no experimento 1, e seis tratamentos com três repetições no experimento 2. Para as médias das taxas de fertilização e eclosão, os resultados obtidos em percentual foram submetidos à transformação para arco seno e foi encontrada a normalidade e homocedasticidade. Foi utilizado o teste ANOVA one-way, e caso encontrado significância (alfa a 5%), foi aplicado o teste de comparação múltipla de Fisher (LSD – Least Significant Difference) ao nível de significância de 5%. Já para as medidas morfométricas, foi aplicado o teste Tukey HSD (Honestly Significant Difference), também ao nível de significância de 5%.

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Adesividade**

Foram observados muitos ovos aderidos nas paredes da incubadora assim como ovos aderidos em outros ovos, formando “grumos” nas incubadoras do grupo C. Nos T1, T2, e T3 os ovos aderiram entre si e nas paredes das incubadoras em menor quantidade do que no grupo C. No T4, os ovos se descolaram totalmente, ficando livres, sendo possível observar uma coloração mais escura nos ovos, devido à solução de tanino a qual somente esses ovos foram expostos (Fig. 2). No experimento 2, a disposição dos ovos nas incubadoras foi semelhantemente ao experimento 1, e o grupo C’ foi semelhante a T1, T2 e T3.



**Figura 2.** Ilustração da disposição dos ovos de *P. fasciatum* em incubadoras nos dois experimentos. Ovos sem desenvolvimento embrionário (“gorados”) e ovos com desenvolvimento embrionário (“bons”).

## 3.2 Índices Reprodutivos

### 3.2.1 Experimento 1

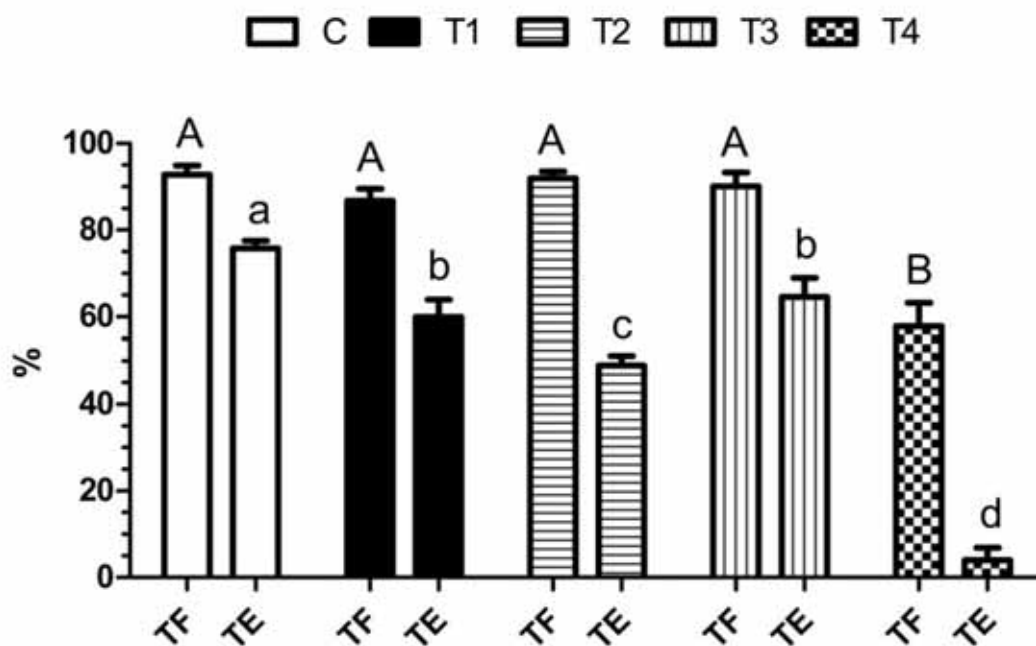
Os tratamentos com uso de uréia apenas (T1, T2 e T3) apresentaram TF média similar ao grupo C ( $92,8 \pm 2,8\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Já o T4 (no qual foi utilizada a solução de tanino vegetal), a TF média ( $57,9 \pm 6,3\%$ ), foi inferior a do grupo C ( $p < 0,05$ ).

Com relação à TE, o grupo C apresentou valores superiores a todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os valores médios de TE de T1, T2 e T3 ( $59,9 \pm 5,3\%$ ,  $49 \pm 2,8\%$  e  $64,5 \pm 5,8\%$ , respectivamente) foram inferiores ao grupo C ( $75,8 \pm 2,3\%$ ). No T4 a TE média foi inferior a todos os outros grupos ( $4,0 \pm 3,6\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3).

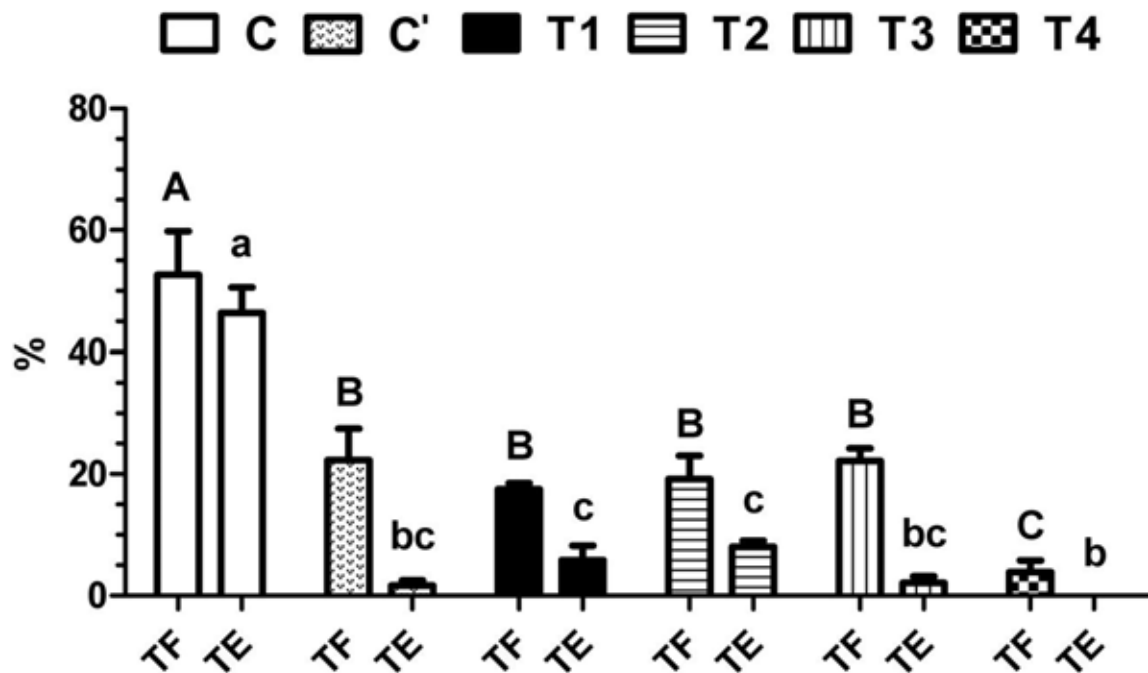


### 3.2.2 Experimento 2

A TF média de C e T4 foram respectivamente superiores ( $52,6 \pm 9,3\%$ ) e inferiores ( $3,8 \pm 2,6\%$ ) à de todos os outros grupos, as quais foram similares entre si ( $p > 0,05$ ). O grupo C apresentou valores médios superiores de TE ( $46,4 \pm 5,3\%$ ). Entre os demais tratamentos, T1 e T2 apresentaram médias de TE similares entre si ( $5,8 \pm 2,8\%$  e  $8,0 \pm 1,4\%$  respectivamente), assim como C', T3 e T4 ( $1,7 \pm 1,1\%$ ,  $2,1 \pm 1,4\%$  e  $0\%$  respectivamente), porém não houve diferença significativa entre C', T1, T2 e T3 (Fig. 4) ( $p < 0,05$ ).



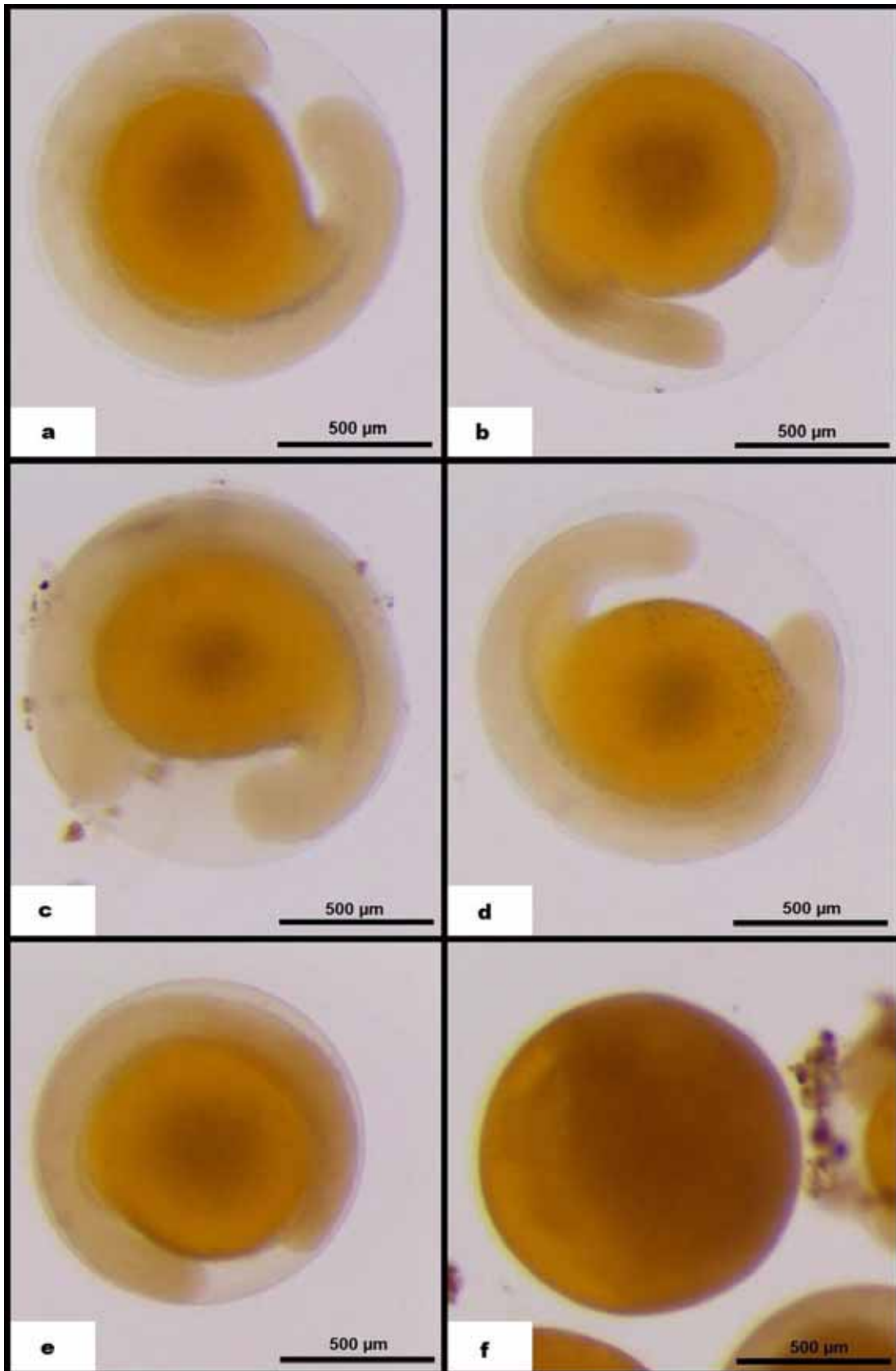
**Figura 3.** Médias das taxas de fertilização (TF) e taxa de eclosão (TE) de *P. fasciatum* no experimento 1. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas da taxa de fertilização entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), e letras minúsculas indicam diferenças significativas da taxa de eclosão entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 4.** Médias das taxas de fertilização (TF) e taxa de eclosão (TE) de *P. fasciatum* no experimento 2. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas da taxa de fertilização entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), e letras minúsculas indicam diferenças significativas da taxa de eclosão entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

### 3.3 Análise morfométrica

Foi possível observar o embrião utilizando o microscópio estereoscópio, pois o córion é fino e transparente (Fig. 5 a, b, c, d, e). Ovos sem desenvolvimento embrionário (Fig. 5 f) foram descartados.



**Figura 5.** Fotomicrografia de ovos de *P. fasciatum* viáveis dos tratamentos C (a), T1 (b), T2 (c), T3 (d), T4 (e) e um ovo inviável do T4 (f).

### 3.3.1 Experimento 1

O D médio de C, T1 e T2 foi similar, o T3 foi superior à C e T2, e também semelhante à T1. Já o T4 foi até 16,6% inferior aos demais tratamentos (Fig. 6 A) ( $p < 0,05$ ).

Com relação à AE, C e T1 e T3 foram semelhantes, assim como T1, T2 e T3. Porém T4 foi até 23,1% inferior aos demais tratamentos (Fig. 6 C) ( $p < 0,05$ ).

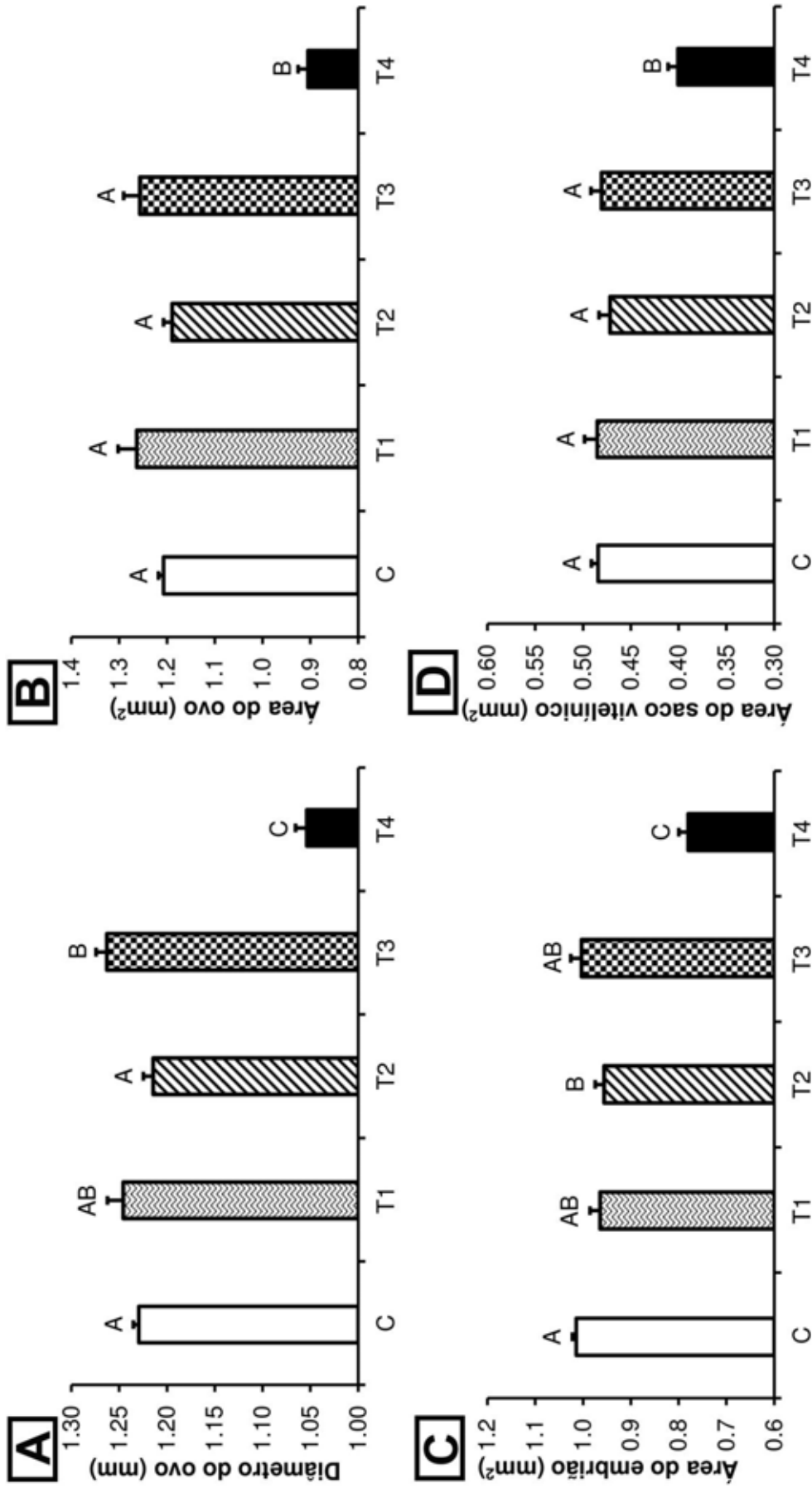
Para as médias de AO e AS, C, T1, T2 e T3 foram semelhantes, e T4 foi 28,3% e 17,4% inferior para as duas medidas respectivamente (Fig. 6 B, D) ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Experimento 2

Os valores médios de D foram semelhantes entre C, T1 e T3, assim como entre C', T1 e T2, e também entre T2 e T3. O grupo C foi significativamente inferior à C' e T2. O grupo C' foi inferior a T3. Já o T4 foi até 18,1% inferior aos demais tratamentos (Fig. 7 A) ( $p < 0,05$ ).

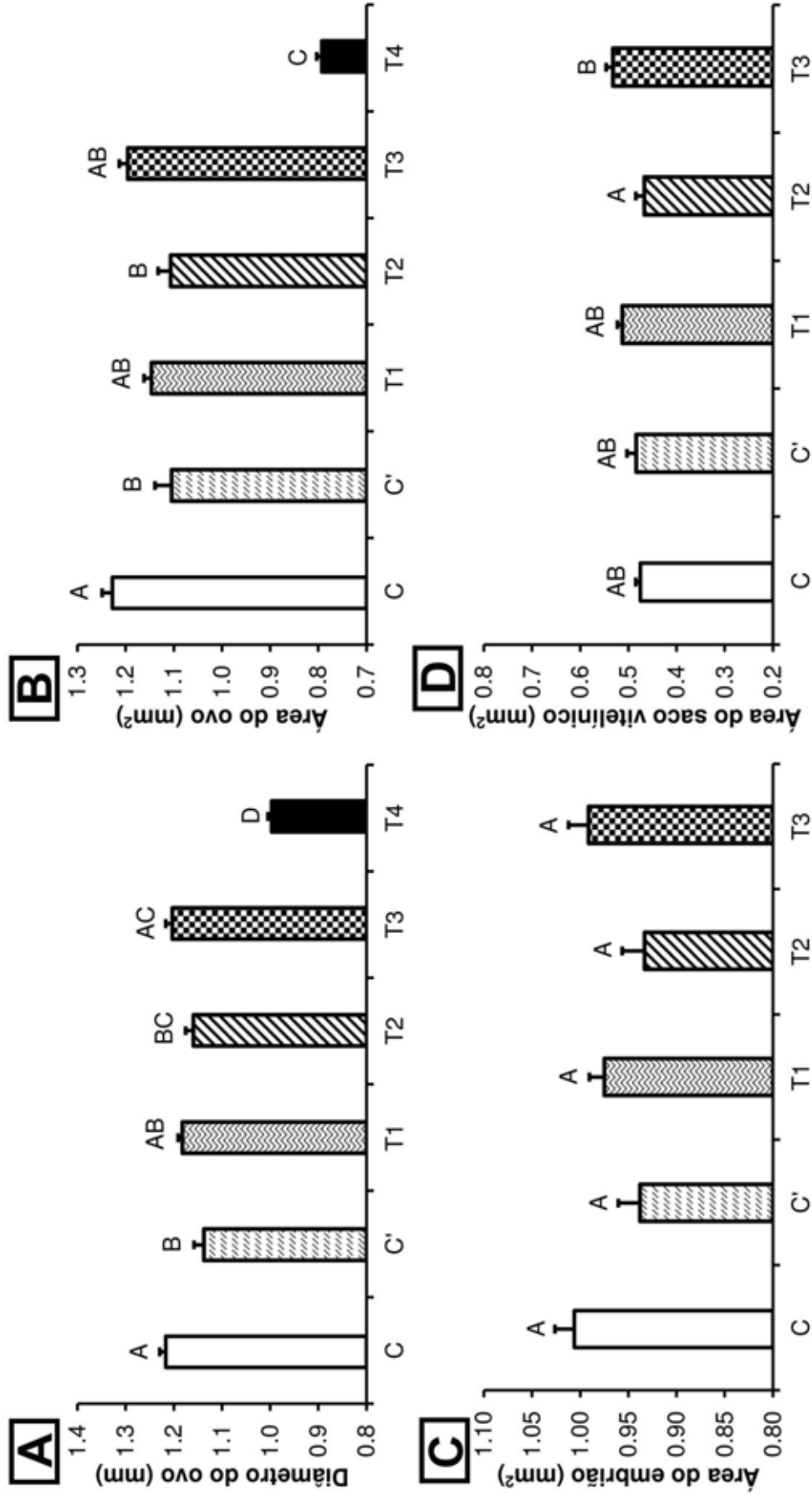
As médias de AO do grupo C foi semelhante à T1 e T3 e superior à C' e T2. Novamente o T4 foi até 35,4% inferior aos demais tratamentos (Fig. 7 B) ( $p < 0,05$ ).

Não foi possível avaliar as variáveis AE e AS, (Fig. 7 C, D) para T4, já que TE foi de zero nestes dois casos, impossibilitando obter medidas de embriões viáveis. Não houve diferença significativa nas médias de AE entre C, C', T1, T2 e T3. Finalmente, para as médias de AS, não houve diferença significativa entre C, C', T1 e T2, assim como entre C, C', T1 e T3, conseqüentemente, T2 foi significativamente diferente de T3.



**Figura 6.** Médias das medidas dos ovos e embriões de *P. fasciatum* do experimento 1.

Médias do diâmetro do ovo (A), da área do ovo (B), da área embrião (C) e da área do saco vitelínico (D). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas das médias entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ). Barras representam o erro padrão.



**Figura 7.** Médias das medidas dos ovos e embriões de *P. fasciatum* do experimento 2. Médias do diâmetro do ovo (A), da área do ovo (B), da área do embrião (C) e da área do saco vitelínico (D). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas das médias entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Barras representam o erro padrão.

### 3.4 Análise genética

Os animais utilizados em ambos os experimentos foram comprovados como sendo espécimes de *P. fasciatum* puros.

### 3.5 Análise espermática

A concentração espermática média foi  $(6,4 \pm 0,7) \times 10^{10}$  e  $(7,1 \pm 1,2) \times 10^{10}$  Spz/ml nos experimentos 1 e 2 respectivamente. A motilidade média foi 32,1 e 46,7 segundos respectivamente. A sobrevivência espermática foi de 98% para ambos os experimentos.

### 3.6 Larvicultura

Devido as baixas TE e alta mortalidade por canibalismo mesmo na densidade de 4 larvas/l, não foi possível acompanhar o desenvolvimento nesta fase entre os tratamentos. Portanto, foi avaliado o desempenho somente do grupo controle, por um período de 90 dias.

O comprimento total médio observado nas biometrias aos 60 e 90 dias pós-eclosão foi de  $5,5 \pm 0,70$  e  $7,2 \pm 0,54$  centímetros respectivamente. O peso total médio foi de  $0,71 \pm 0,13$  e  $2,01 \pm 0,33$  g respectivamente.

## 4 DISCUSSÃO

Em condições naturais, ovos de espécies migradoras são liberados na coluna de água, enquanto os ovos de espécies sedentárias permanecem no local da desova, ligados a diferentes substratos (Lamas, 1993; Sato, 1999). No entanto, a espécie *P. fasciatum* (Siluriformes – Pimelodidae), apesar de ser uma espécie migradora, possui ovos adesivos. Isso pode ser um problema para o sucesso de sua reprodução artificial,

pois o desenvolvimento embrionário é feito tradicionalmente em incubadoras cônicas de plástico ou fibra, e os ovos grudam entre si e nas paredes das incubadoras. A adesividade deve ser eliminada para prevenir a formação de aglomerados de ovos que resultam em alto índice de mortalidade causada por asfixia e crescimento de fungos (Doroshov *et al.*, 1983). Ovos de Siluriformes analisados por Rizzo *et al.*, (2002), apresentaram uma camada gelatinosa espessa cobrindo a zona radiata, mas aparentemente, não há uma relação entre esta estrutura e adesividade. Neste estudo, testamos diferentes protocolos para a remoção desta camada adesiva no córion dos ovos e observamos que os melhores resultados foram obtidos quando os ovos não foram expostos a agentes químicos. De acordo com Woynarovich (1980), a solução sal-carbamida (sal/ uréia) não apresenta nenhum efeito negativo nos ovos de carpa-comum, porém quando usada em ovos de *P. fasciatum* os resultados não foram similares. Em ambos os experimentos, os ovos dos tratamentos que receberam apenas solução de uréia (C', T1, T2 e T3), assim como uma associação de uréia e tanino (T4), apresentaram menores taxas médias de eclosão das larvas.

Com relação à remoção da adesividade, Kowtal *et al.* (1986) observaram que a aplicação da solução sal-carbamida, seguida da solução de tanino, removeu com sucesso a camada gelatinosa dos ovos de *Acipenser transmontanus* (esturjão branco). Nos nossos experimentos, o T4 removeu a adesividade dos ovos com sucesso, porém os efeitos causados pelo tratamento prejudicaram a TF, TE e o desenvolvimento embrionário. O tamanho dos ovos e embriões do T4 foi até 16,56% menor que os demais tratamentos e controles. No T4, os embriões pareciam “apertados” dentro do ovo, sem espaço para um desenvolvimento normal, provavelmente alguma propriedade da solução de tanino impediu a hidratação adequada dos ovos deste tratamento.

Kotwal *et al.* (1986) relataram que o uso da solução sal-carbamida sem a posterior lavagem com tanino removeu parcialmente a adesividade, contudo os ovos se tornaram adesivos novamente após alguns minutos. Nos tratamentos T1, T2 e T3, ocorreu o mesmo, pois foram observados aglomerados de ovos presentes em todas as repetições. Não foi verificada uma relação entre a redução das taxas de fertilidade com o tempo de exposição à solução de uréia (tratamentos T1, T2 e T3). No experimento 1, o uso desta solução, seja por 30 ou por 90 minutos, levou a resultados similares com relação às TFs (~83%) e TEs (60%). Curiosamente, o uso desta solução por 60



minutos apresentou redução na taxa de eclosão (~45%) quando comparado com o uso da mesma por 30 e 90 minutos. Já no experimento 2, não houve diferença estatística entre as taxas de eclosão em todos os tratamentos em que foi utilizado qualquer uma das soluções. Desta forma, não encontramos um perfil lógico que relacionasse TF e TE em relação ao tempo de exposição à uréia.

Com relação ao tratamento T4, onde foi aplicado o protocolo padrão descrito por Moreira *et al.*, (2001) para remover a adesividade dos ovos de carpa comum, os resultados foram muito aquém do esperado. De forma similar, Mizuno *et al.* (2004) relataram que o tratamento de ácido tânico para eliminar a adesividade de ovos de *Spirinchus lanceolatus* resulta em uma baixa taxa de eclosão por características do ambiente aquático. No caso, este seria rico em ferro permitindo a ligação de íons de ferro na superfície do ovo. Na área onde se encontram as represas do CAUNESP predomina um tipo de solo conhecido como latossolo, de textura muito argilosa (Andrioli & Centurion, 1999). Por ser um solo muito antigo e intemperizado, possui altas concentrações de óxidos de ferro, que podem ser carregados pela água da represa, contaminando a água que abastece os viveiros e laboratórios. Infelizmente, existe uma correlação negativa entre o total de ferro na superfície do ovo em a taxa de eclosão, e uma correlação positiva entre a mortalidade durante a eclosão e a quantidade total de ferro na superfície do ovo (Takeda *et al.*, 2002). O tipo de solo da região, juntamente com os efeitos negativos do ferro na superfície dos ovos, poderia explicar o resultado obtido no T4 em ambos os experimentos, e para comprovar esta hipótese seriam necessários novos experimentos para analisar a quantidade de ferro na água utilizada e também na superfície dos ovos.

Mizuno *et al.* (2004) testando o uso de kaolin ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ), um tipo de argila (~ 3  $\mu\text{m}$  de diametro) em ovos de *Spirinchus lanceolatus*, encontraram que 5.0 g/L por 5 a 30 minutos e 10.0 g/L por 10 segundos a 30 minutos é mais efetivo em eliminar a adesividade dos ovos do que o tratamento com ácido tânico em águas com alto teor de ferro. Métodos de eliminação de adesividade do ovo com lama ou silte foram relatados por Nakamura (1966) (*apud* Mizuno *et al.*, 2004), com lama em *Triborodon hakonensis*, Doroshov *et al.* (1983) com silte de rio em *A. transmontanus* e Kudo (1992) (*apud* Mizuno *et al.*, 2004) com kaolin, em *Hypomesus transpacificus*. Estes ovos perdem a

sua adesividade quando a parte adesiva do ovo é completamente coberta de lama ou silte.

No entanto, torna-se difícil o teste de tantas variáveis face ao risco que a espécie corre (em franco declínio) e à difícil ocorrência de matrizes puras de *P. fasciatum* (Fabio P. Foresti, comunicação pessoal, 2011). Desta forma, os testes de novos agentes químicos não parecem ser a melhor alternativa imediata para a reprodução desta espécie. Na mesma vertente, outros fatores como a desova sazonal, os testes para determinação do tempo ideal de exposição de um reagente e a escolha do reagente químico indicam que a melhor alternativa seria estabelecer o volume ideal de ovos por incubadora e/ou aumentar área disponível das mesmas para a adesão destes ovos, mantendo-os com a adesividade natural.

Os resultados de ambos os experimentos indicaram que o controle, no qual os ovos não foram expostos a nenhum agente químico, propiciou melhores condições para a eclosão de larvas. Os resultados de remoção da adesividade obtidos com o uso da solução de tanino mostraram claramente que não há uma associação entre a perda de adesividade dos ovos de *P. fasciatum* com a viabilidade dos mesmos. Conforme dito anteriormente, mesmo após os tratamentos com uso da solução de uréia, os ovos retomaram a adesividade quando entraram em contato com a água. Isso fortalece a hipótese de que, ao invés de remover a adesividade para adequação em incubadoras tradicionais, a adesividade dos ovos desta espécie pode ter um papel positivo durante o desenvolvimento dos mesmos, e deve ser preservada para se obter sucesso na incubação.

Concluindo, verificamos que a utilização das substâncias químicas do atual estudo não trouxe resultados satisfatórios, pois mesmo com a remoção parcial ou total da adesividade dos ovos, estes apresentaram efeitos deletérios ao longo do tempo, inviabilizando os tratamentos. Portanto, novas estratégias para incubação de ovos adesivos em grandes quantidades devem ser estudadas. Devido à elevada fecundidade das fêmeas de *P. fasciatum*, consideramos que uma boa estratégia para sua reprodução seria introduzir substratos ou artefatos plásticos (de simples manuseio) que aumentassem a área disponível para a adesão dos ovos nas incubadoras.

## 5 REFERÊNCIAS

Andrioli, I., Centurion, J.F. (1999). Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, p. 32. Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Doroshov, S.I., Clark Jr., W.H., Lutes, P.B., Swallow, R.L., Beer, K.E., Mcguire, A.B., Cochran, M.D. (1983). Artificial propagation of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson, *Aquaculture*, Vol. 32, n. 1-2, 93-104.

Hulata, G. (2001). Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, Vol. 111, 155–173.

Kowtal, G.V., Clark, W.H., Cherr, G.N. (1986). Elimination of adhesiveness in eggs from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Chemical treatment of fertilized eggs, *Aquaculture*, Vol. 55, n. 2, 139-143.

Kudo, M., 1992. Method to separate and hatch and adhesive egg. *Proc. Jpn. Soc. Sci. Fish* p. 203. (In Japanese).

Lemanova, N.A.; Sakun, O.F. (1975). Metodisceskoe posobie pogor monalnoi stimulacii proizvoditelei karpa pré rannon polucenii licinok. Issledivatel Skogo Instituta, Izvestiya Gosudartvennogo Nauchnom, Vol.88, 3-23.

Mizuno, S., Sasaki, Y., Omoto, N., Imada, K. (2004). Elimination of adhesiveness in the eggs of shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus* using kaolin treatment to achieve high hatching rate in an enviroment with a high iron concentration. *Aquaculture*, Vol. 242, issues 1-4, 713-726.

Monaco, G., Doroshov, S.I. (1983). Mechanical de-adhesion and incubation of white sturgeon eggs (*Acipenser transmontanus* Richardson) in jar incubators. *Aquaculture*, Vol 35, 117-123.

Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P. (2001). Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ed. ULBRA, pp.106-108.

Nakamura, K., 1966. Method to eliminate egg adhesion in Japanese dace. *The Aquaculture*, Vol. 14, 37–40 (In Japanese).

Prado. F.D., Hashimoto, D.T., Senhorini, J.A., Foresti, F., Bortolozzi, J., Porto-foresti, F. (2009). Identificação de híbridos entre os peixes neotropicais pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) através de PCR-RFLP: aplicações para a conservação genética. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética.

Prado, F.D., Hashimoto, D.T., Mendonça, F.F., Senhorini, J.A., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2011). Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture Research*, Vol. 42, pp. 1890–1894.

Porto-Foresti, F., Hashimoto, D.T., Alves, A.L., Almeida, R.B.C., Senhorini, J.A., Bortolozzi, J., Foresti, F. (2008). Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 31, (1 suppl), 195-202.

Rizzo, E., Sato, Y., Barreto, P.P., Godinho, H.P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, Vol. 61, 615–632.

Rizzo, E., Godinho, H.P. (2003). Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. In: Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. (Godinho, H.P., Godinho, A.L., org.). Belo Horizonte: PUC Minas, p.115-132.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, Vol. 234, 1-28.

Sato, Y. (1999). Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões, p.179. (Tese, Universidade Federal de São Carlos), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Scribner, K.T., Page, K.S., Bartron, M.L. (2001). Hybridisation in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish. Biol. Fisher*, Vol. 10, 293–323.

Takeda, N., Kusuda, S., Teranishi, T., Imada, K., 2002. Effect of iron concentrations on hatching rates of adhesive-eliminated Osmerid fish (*Sprinchus lanceolatus*) eggs from the surface. *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery*, Vol. 56, 107–113 (In Japanese with English Abstract).

Woynarovich, E., Woynarovich, A. (1980). Modified technology for elimination of stickiness of common carp (*Cyprinus carpio*) eggs – *Aquacult. Hung*, Vol.2, 19-21.